

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



НОГАЕВА УЛЬЯНА ВАЛЕРЬЕВНА

**РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ КОМБИНИРОВАННОЙ
МЯГКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОСТЕОАРТРИТА**

3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук,

профессор

Флисюк Елена Владимировна

Санкт-Петербург – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|-----------|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 4 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 11 |
| 1. Остеоартрит: этиология и патогенез | 11 |
| 2. Подходы к терапии ОА..... | 14 |
| 3. Комбинированная терапия ОА | 15 |
| 4. Современные МЛФ для наружного применения – гель на гидрофильной основе | 18 |
| 5. Вспомогательные вещества в технологии МЛФ | 24 |
| 6. Последовательность стадий и аппаратурное оформление технологического процесса получения МЛФ (мазей) | 24 |
| ВЫВОДЫ ПО ПЕРВОЙ ГЛАВЕ | 34 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 35 |
| I. Материалы и методы на этапе фармако-технологических исследований..... | 35 |
| 1. Объекты исследования | 35 |
| 2. Вспомогательные вещества (ВВ) | 36 |
| 3. Оборудование | 38 |
| 4. Методы исследования..... | 40 |
| II. Материалы и методы на этапе доклинических исследований..... | 48 |
| ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 2: | 51 |
| ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СОСТАВА, ФАРМАКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ МЛФ | 52 |
| 3.1. Изучение свойств АФС | 52 |
| 3.2. Выбор оптимального состава МЛФ. | 55 |
| 3.2.1. Подбор гелеобразователя | 55 |
| 3.2.2. Определение рН растворов гелеобразователей | 58 |
| 3.2.3. Подбор вспомогательных веществ | 59 |
| 3.2.4. Разработка технологии получения комбинированного геля | 61 |
| 3.3. Технологический контроль качества | 66 |
| 3.3.1. Исследование размера частиц суспензионной фазы мелоксикама | 66 |

| | |
|---|-----|
| 3.3.2. Исследование мембранной проницаемости | 66 |
| 3.3.3. Исследование структурно-механических свойств МЛФ | 68 |
| 3.4. Сравнительная оценка аппаратного оформления в технологии МЛФ. Виброкавитационный гомогенизатор | 70 |
| 1. Влияние режима виброкавитационной обработки на структурно- механические свойства образцов МЛФ..... | 70 |
| 2. Влияние режима виброкавитационной обработки на размер частиц суспензионной фазы (мелоксикама) | 72 |
| 3. Влияние режима виброкавитационной обработки на мембранную проницаемость мелоксикама | 74 |
| 4. Влияние режима виброкавитационной обработки на микробиологические параметры | 75 |
| ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3:..... | 76 |
| ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ГЕЛЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО | 78 |
| 1. Условия хроматографирования мелоксикама..... | 78 |
| 2. Условия хроматографирования аденозина и иммуномодулятора М | 79 |
| 3. Изучение стабильности геля, разработка проекта спецификации качества | 80 |
| ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4:..... | 84 |
| ГЛАВА 5. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ГЕЛЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО | 85 |
| Блок 1: Определение оптимальных дозировок действующих веществ и оценка противовоспалительной активности МЛФ..... | 85 |
| Блок 2: Сравнительная оценка эффективности и безопасности комбинированной мягкой лекарственной формы..... | 91 |
| ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5:..... | 96 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 97 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 99 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 100 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ | 111 |

ВВЕДЕНИЕ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Согласно современному определению, остеоартрит (ОА) – это гетерогенная группа заболеваний различной этиологии со сходными биологическими, морфологическими и клиническими проявлениями и исходом, в основе которых лежит поражение всех компонентов сустава, в первую очередь хряща, а также субхондрального участка кости, синовиальной оболочки, связок, капсулы, периартикулярных мышц [1,2].

ОА традиционно считался дегенеративным заболеванием суставов, но в связи с появлением новых данных экспериментальной и доказательной клинической медицины о том, что в его молекулярном патогенезе важную роль играет воспаление [3-6].

В мире около 300 млн человек страдают ОА, в РФ распространённость этого заболевания составляет 13% [7]. Отчёт немецкой компании Statista свидетельствует о том, что количество зарегистрированных случаев ОА в период с 1990 до 2019 годов возросло от 96,98 млн до 210,37 млн случаев у мужчин и от 150,53 млн до 317,44 млн случаев у женщин [8].

Симптомы болезни, как правило, можно контролировать, однако повреждение суставов нельзя обратить вспять. Задачей современной фармацевтической технологии является создание эффективных и безопасных лекарственных препаратов, которые, влияя на несколько звеньев патогенеза, могут способствовать улучшению качества жизни пациентов.

Вышеизложенное позволяет рассматривать комбинацию трёх активных фармацевтических субстанций (АФС) в качестве перспективного направления исследования в области противовоспалительной терапии.

При этом использование пролонгированной мягкой лекарственной формы (МЛФ), во-первых, может способствовать удобному и самостоятельному нанесению состава, повышению комплаентности пациентов, а во-вторых,

минимизировать вероятность возникновения побочных эффектов за счёт постепенного проникновения действующих веществ к очагу воспаления.

Степень разработанности темы исследования

Поиск и разработка лекарственных препаратов (ЛП) для терапии ОА идёт достаточно давно: Бадочкин В.В. 2009, 2018, 2020, Гончаров Н.А. 2011, Драпкина О.М. и др. 2018, Лиля А.М. 2019, Dantas L.O. et al. 2021, Goldring M.B. et Berenbaum F. 2015, Iturriaga L. et al. 2018, Richardson C. et al. 2019, Vargas Negrin F. et al. 2014, Wu Q. et al. 2022. Сегодня исследователи всего мира активно развивают новые подходы, в частности, рассматривают перспективность терапии на молекулярно-генетическом и клеточном уровнях [Evans C.H. et al. 2023, Huang H. et al. 2023, Mizuno M. et al. 2022, Ramirez-Perez S. et al. 2022], занимаются созданием различных систем доставки: наночастиц [Gai Y. et al., 2023, Kang L.J. et al. 2021, Subbiah L. et al. 2021], микроигл [Khuangsirikul S. et al. 2022, Nogaeva U.V. et al., Priya S. et Singhvi G. 2022, Wang J. et al. 2022, Zhou P. et al. 2021], комбинированных препаратов с модифицированным высвобождением [Huang H. et al. 2022, Jin J. et al. 2022, Zhou T. et al. 2022].

Однако до настоящего времени на фармацевтическом рынке не зарегистрирован ЛП, содержащий в своём составе мелоксикам, аденозин и иммуномодулятор М, при патентном поиске также не встречалось упоминание подобной композиции. Учитывая перспективность сочетания АФС, влияющих на разные звенья ОА, была выявлена необходимость разработки лекарственной формы (ЛФ) на основе этих компонентов и изучение её эффективности.

Цель и задачи исследования

Цель диссертационного исследования – фармацевтическая разработка комбинированного противовоспалительного средства для терапии остеоартрита с доклинической оценкой его эффективности.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить физико-химические свойства мелоксикама, аденозина, иммуномодулятора М для последующего включения в состав геля.

2. Обосновать выбор компонентов основы для мягкой лекарственной формы.
3. Разработать состав и технологию получения комбинированного геля, обладающего пролонгированным противовоспалительным эффектом.
4. Провести сравнительную оценку аппаратного оформления в технологии геля: с использованием мешалки с верхним приводом и виброкавитационного гомогенизатора.
5. Разработать методики определения показателей качества полученного состава и изучить его стабильность.
6. Провести оценку эффективности комбинированного геля на модели экспериментального остеоартрита и проанализировать его профиль безопасности.

Научная новизна исследования

Впервые предложена оригинальная комбинация АФС, включающая мелоксикам, аденозин и иммуномодулятор М в составе МЛФ. С точки зрения безопасности терапии и минимизации системных побочных эффектов, совместное применение нескольких лекарственных средств позволило снизить дозировку нестероидного противовоспалительного препарата (НПВП) – мелоксикама до 0,5%, в то время как в выпускаемых гелях она составляет не менее 1 %.

Использован режим обработки МЛФ с включением стадии виброкавитационного воздействия, этот подход позволил повысить микробиологическую стабильность испытуемых составов по сравнению с образцами, полученными с применением классического перемешивающего устройства – мешалки с верхним приводом.

Проведён сравнительный анализ режимов обработки геля на основе анализа функции распределения частиц по размерам в ходе технологического процесса.

Впервые разработаны методики анализа трёхкомпонентной МЛФ методом ВЭЖХ, а также проект спецификации качества геля противовоспалительного.

Проведена комплексная доклиническая оценка эффективности и безопасности МЛФ, позволяющая определить возможность применения разработанного состава в терапии ОА.

Теоретическая и практическая значимость работы, внедрение результатов исследования

Теоретическая значимость работы заключается в комплексном обосновании оригинального состава и технологической схемы получения, комбинированной МЛФ противовоспалительного действия.

Установлено, что включение в состав геля поверхностно-активных веществ (твин 80, кремофора RH40) и пропиленгликоля увеличивает мембранную проницаемость для вещества нерастворимого в основе и способствует получению структурированной системы, обладающей тиксотропностью.

Показана возможность использования виброкавитационной обработки в режиме 5000 об/мин – 2 минуты в технологии мягких лекарственных форм, при этом установлено повышение микробиологической чистоты готовой продукции.

Практическая значимость диссертационного исследования состоит в разработке оригинального компонентного состава, а также технологии мягкой лекарственной формы для терапии остеоартрита, которая была успешно апробирована на производственной площадке ЗАО «ФАРМА ВАМ» (акт о внедрении 30.01.23). Методология оценки структурно-механических свойств мягких лекарственных форм была использована в научно-исследовательской деятельности кафедры технологии лекарственных форм и GMP тренинг-центра ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (акт о внедрении от 26.01.23). Алгоритм сравнительного изучения свойств мягких лекарственных форм в зависимости от типа используемого оборудования был применён в деятельности службы науки и клинических исследований, а также в лаборатории мягких лекарственных форм АО «Вертекс» (акт о внедрении от 03.03.23).

Отдельные результаты работы нашли применение в учебном процессе образовательных учреждений высшего образования: ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (акт о внедрении от 15.02.23) и Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (акт о внедрении от 10.02.23) при преподавании основной образовательной программы для студентов, обучающихся по специальности 33.05.01 «Фармация».

Методология и методы исследования

В диссертационной работе использованы технологические, биофармацевтические, физико-химические, фармакологические, микробиологические, статистические методы. Обработку результатов исследования проводили с использованием элементарной статистики, а также с применением программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., Ла-Хойя, Калифорния, США).

Экспериментальные работы были проведены на современном технологическом и аналитическом оборудовании, прошедшем аттестацию. Средства измерения, примененные в работе, имеют свидетельства о поверке.

Степень достоверности и апробация полученных результатов

Достоверность полученных результатов определяется их воспроизводимостью, использованием современных методов исследований, а также применением методов статистической обработки данных.

Основные результаты работы доложены и обсуждены на научном коворкинге «Биомедицина» в рамках форума медицинских и фармацевтических вузов Министерства здравоохранения Российской Федерации «Наукабиомед» (Москва, 2022), на XI и XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург 2021 и 2022), на VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «VolgaMedScience» (Нижний Новгород, 2022).

Два исследовательских проекта, включающие фрагменты диссертационного исследования, а именно: «Разработка состава и технологии комбинированного противовоспалительного средства для терапии остеоартроза» (2021) и «Совершенствование технологии мягких лекарственных форм путём виброкавитационной обработки» (2022), были признаны победителями конкурса грантов Комитета по науке и высшей школы для студентов вузов, расположенных на территории Санкт-Петербурга, аспирантов вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработка состава и технологии комбинированной мягкой лекарственной формы для терапии остеоартрита.
2. Сравнительная оценка аппаратного оформления в технологии геля: с использованием мешалки с верхним приводом и виброкавитационного гомогенизатора.
3. Показатели качества геля противовоспалительного и методы их оценки.
4. Результаты фармакологической оценки эффективности и безопасности трёхкомпонентной мягкой лекарственной формы *in vivo*.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов

Автор лично участвовал в формулировке цели исследования и постановке задач, сборе и анализе отечественных и зарубежных литературных данных, планировании экспериментальной работы, постановке экспериментов на базе GMP тренинг-центра, кафедры технологии лекарственных форм и Центра экспериментальной фармакологии ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России. Автором обрабатывались и интерпретировались полученные результаты, а также лично осуществлялось оформление тезисов и статей по тематике исследования. Личный вклад автора составил не менее 90%. Диссертация представляет собой самостоятельный научный труд и включает исследования автора за период с 2020 по 2022 годы.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств, а именно пунктам:

1. Решение задач в области обращения лекарственных средств, обеспечивающих соблюдение надлежащих практик. Разработка инструментов, методов и подходов к оценке безопасности, эффективности и качества лекарственных средств.

2. Проектирование и разработка технологий получения фармацевтических субстанций и лекарственных форм, утилизация производственных отходов с учетом экологической направленности. Стандартизация и валидация процессов и методик, продуктов и материалов. Оптимизация организационных и технологических процессов при разработке и получении лекарственных средств.

3. Исследование биофармацевтических аспектов в технологии получения лекарственных средств, их дизайн и изучение фармацевтических факторов, влияющих на биодоступность. Разработка и валидация бионалитических методик. Исследование стабильности лекарственных средств.

Публикации материалов исследования

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, включая 3 статьи в журналах, включенных в международную базу Scopus, среди которых 2 статьи в журналах перечня рецензируемых научных изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 117 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 42 рисунками и 16 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (4 главы) и заключения, списка литературы, включающего 91 наименование (46 источников зарубежной литературы) и приложения.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Остеоартрит: этиология и патогенез

Остеоартрит – гетерогенная группа заболеваний различной этиологии со сходными биологическими, морфологическими и клиническими проявлениями и исходами, в основе которых лежит поражение всех компонентов сустава: хряща, субхондральной кости, синовиальной оболочки, связок, капсулы, околоуставных мышц [9,10]. В мире около 300 млн человек страдают остеоартритом, в РФ распространённость этого заболевания составляет 13% [11]. В Международной классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10-го пересмотра (МКБ-10) термин «остеоартрит» используется как синоним термина остеоартроз [12].

Выделяют первичный (идиопатический) остеоартрит и вторичный остеоартрит, возникающий на фоне различных заболеваний (метаболические, эндокринные заболевания; врождённые, эндемические заболевания; посттравматический остеоартрит) [13].

Большую роль в возникновении и прогрессировании остеоартрита играют факторы риска. Различают модифицируемые (ожирение, избыточная нагрузка на суставы, спортивная физическая нагрузка, гиподинамия, профессиональные факторы (вибрация и другие), уменьшение минеральной плотности кости, недостаток витамина D) и немодифицируемые (возраст, женский пол, генетическая предрасположенность, гормональный фон, предшествующее повреждение сустава) факторы [14,15].

Пусковым механизмом развития патогенеза остеоартрита является механическое повреждение и/или перегрузка суставов, что приводит к изменениям в субхондральной кости, хряще и синовиальной оболочке сустава [16,17]. На рисунке 1 представлен патогенез ОА.

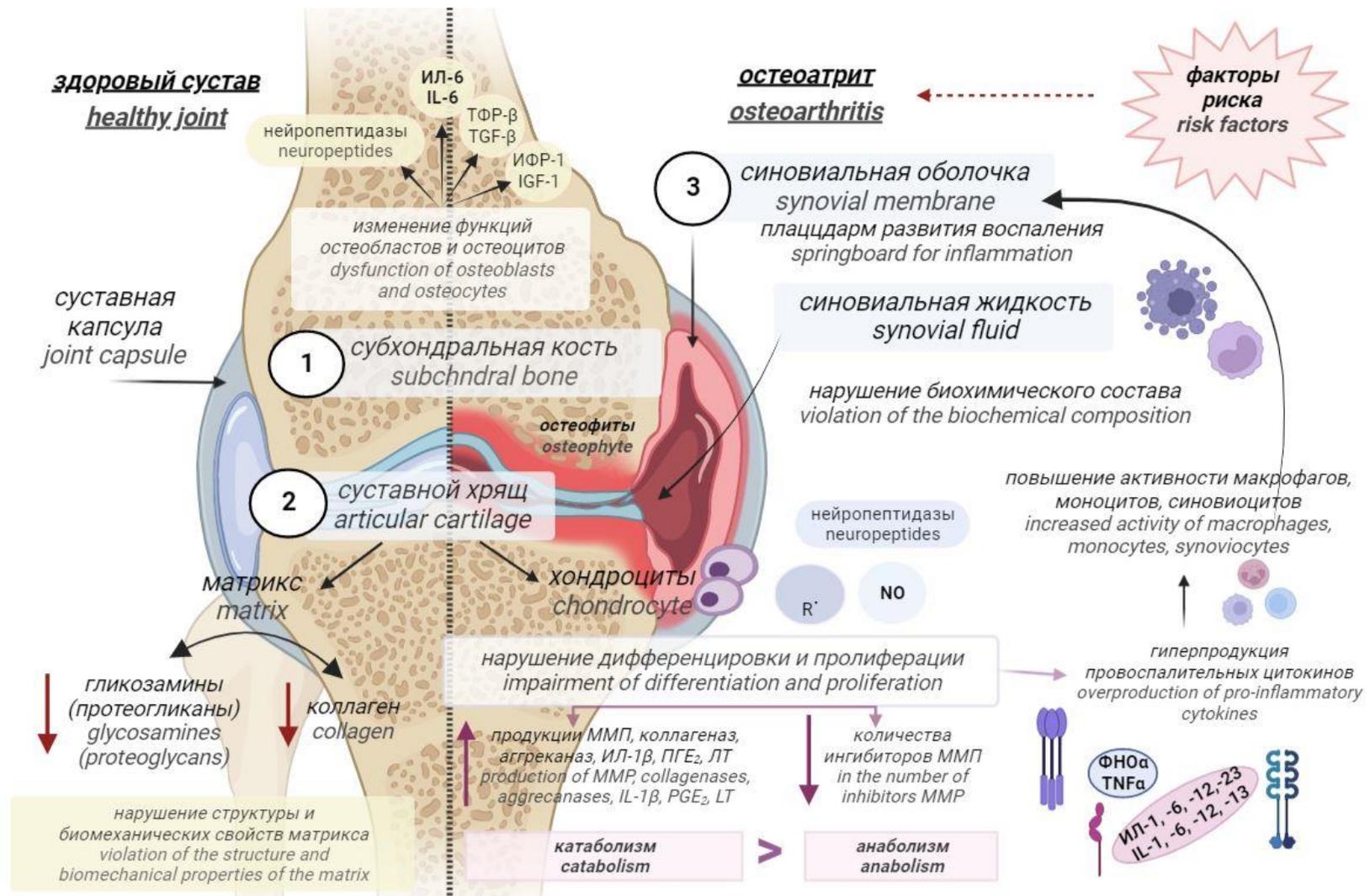


Рисунок 1 – Патогенез ОА (создано с помощью BioRender.com)

Примечания: ИФР-1 – инсулиноподобный фактор роста; ММП – матриксные металлопротеиназы; ПГЕ₂ – простагландин E₂; ТФР-β – трансформирующий фактор роста; ЛТ – лейкотриены.

В субхондральной кости изменяются функции остеобластов и остеоцитов, повышается костная резорбция на первых этапах повреждения и в дальнейшем увеличивается костеобразование, формируются остеофиты, что нарушает плотность кости, приводит к повреждению субхондральных сосудов, формируя костный венозный стаз. Одновременно остеобласты начинают избыточно продуцировать факторы роста и провоспалительные цитокины, повреждающие хрящ [18].

Основная функция хряща в суставе – амортизация механических нагрузок, что обеспечивают такие структурные элементы, как матрикс и хондроциты [19]. Матрикс содержит две главные макромолекулы: гликозамины (протеогликаны) и коллаген. Коллагеновая сеть матрикса удерживает протеогликаны в хряще, выполняя функцию каркаса. При патологии происходит снижение содержания коллагена и протеогликанов, в результате чего нарушается структура и биомеханические свойства матрикса [20].

Основные патологические процессы, приводящие к разрушению хряща, происходят в хондроцитах, которые содержат ферменты, в частности металлопротеиназы: сериновая протеиназа, коллагеназа, простромелизин [21]. В норме эти ферменты находятся под контролем ингибиторов и не оказывают неблагоприятного воздействия, однако при патологии процессы катаболизма превышают анаболизм, хондроцит получает гиперпролиферативный статус [22]. Происходит гиперпродукция цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-23, ФНО- α , липидных медиаторов (простагландин E_2 , лейкотриены), фактора роста (ТФР- β), свободных радикалов, оксида азота, гиперэкспрессия ЦОГ-2, в итоге наблюдается активация ферментов синовиальной жидкости, деградация протеогликанов и коллагена, развиваются процессы ремоделирования, поддерживается иммунное воспаление [23-29]. Клиническая картина при этом включает боль, нарушение функции поражённого сустава, уменьшение объёма движения, утреннюю скованность [30].

2. Подходы к терапии ОА

Основная цель лечения и вторичной профилактики ОА – снизить выраженность клинических проявлений и замедлить разрушение хряща и субхондральной кости, что позволяет уменьшить боль, улучшить функцию сустава, повысить мобильность пациента и качество жизни [31].

В последние годы, благодаря лучшему пониманию патофизиологии, лежащей в основе ОА, был достигнут ряд потенциальных терапевтических достижений [17], которые включают тканевую инженерию (генная и клеточная терапия) [32,33], улучшенную хирургическую технику, фармакологические и немедикаментозные методы лечения [34,35]. Стратегии терапии ОА представлены на рисунке 2.

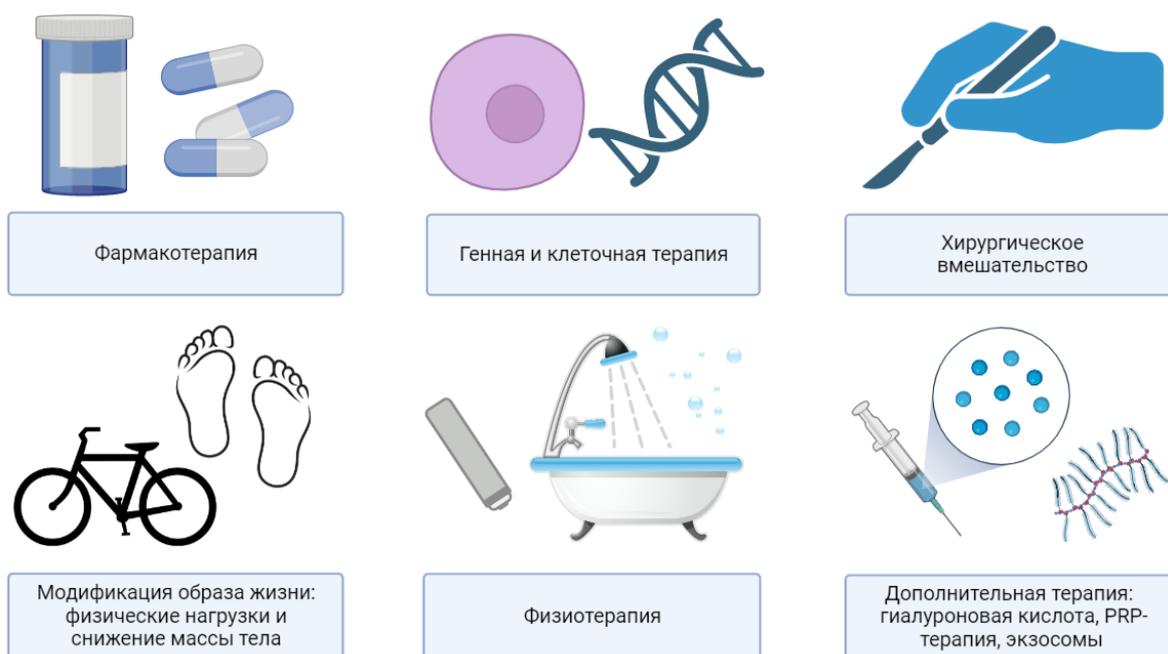


Рисунок 2 – Стратегии терапии остеоартрита

При этом, если генные и клеточные технологии пока находятся на начальной стадии внедрения, то фармакотерапия симптоматическими препаратами замедленного и быстрого действия, а также рекомендации по модификации образа жизни имеют широкую доказательную базу и активно применяются на протяжении достаточно длительного времени.

К симптоматическим лекарственным средствам быстрого действия (noSYSADOA) относят анальгетики (опиодные и неопиодные), НПВП и препараты других групп. Они предназначены для уменьшения боли и сопутствующего воспаления [36].

Для воздействия на метаболизм хряща, чтобы восстановить баланс между анаболическими и катаболическими процессами суставного матрикса, используют симптоматические лекарственные средства замедленного действия (SYSADOA) или хондропротекторы [37,38]. Они стимулируют синтез хондроцитами макромолекул матрикса суставного хряща (гликозаминогликанов, протеогликанов, коллагена). К ним относятся препараты глюкозамина [39], хондроитина [40], гиалуроновой кислоты [41,42], неомыляемые соединения авокадо и бобов сои [43], гликозаминогликан-пептидный комплекс, экстракт из мелких морских рыб [44].

3. Комбинированная терапия ОА

Стратегия комбинированной терапии подразумевает включение в состав одного ЛП нескольких молекул, обладающих разными механизмами действия, при этом за счёт влияния на несколько мишеней, удаётся повысить эффективность терапии [45].

Учитывая вклад воспаления в развитие клинической картины ОА, было решено рассмотреть возможность создания комбинированного препарата, включающего селективный НПВП, аденозин и иммуномодулятор М.

Все НПВП имеют общий механизм действия, открытый J.R. Vane в 1971 году: они действуют как конкурентные и обратимые ингибиторы простагландина G/H-синтазы, также известной как циклооксигеназа (ЦОГ), за счёт чего препятствуют образованию различных простагландинов [46].

Мелоксикам – это один из наиболее изученных селективных ингибиторов ЦОГ-2, принадлежащий к классу еноловой кислоты [47]. На основании многочисленных данных о высокой терапевтической эффективности в сочетании с хорошей переносимостью препараты

мелоксикама включены в стандартные схемы лечения ревматических заболеваний.

По сравнению с другими НПВП, в отношении мелоксикама отмечают высокую селективность [48], более низкую частоту возникновения побочных эффектов [49], а также оказание хондропозитивного эффекта [50-53].

Аденозин – эндогенный модулятор, основной функцией которого является поддержание клеточного и тканевого гомеостаза при патологических и стрессовых состояниях за счёт взаимодействия с трансмембранными аденозиновыми рецепторами, связанными с G-белком [54].

Согласно исследованиям, аденозин оказывает противовоспалительный эффект посредством стимуляции аденозиновых рецепторов типа A_{2A} и A_3 , что ингибирует путь НК-kB за счёт подавления образования провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α [55].

Иммуномодулятор М увеличивает фракцию макрофагов M_2 , стимулирует поглотительную и переваривающую способность макрофагов, что способствует более эффективному удалению воспалительного детрита, а также оказывает «поддержку» аденозину в части восстановления чувствительности к нему рецепторов, так как очаг воспаления богат недоокисленными продуктами: пируват, лактат и др., способными восстанавливать дисульфидные связи и таким образом инактивировать пуринергические поверхностно-клеточные рецепторы.

Таким образом, молекулы, образующие композицию, воздействуют на различные составляющие воспалительной реакции, обеспечивая более полноценный противовоспалительный ответ в сравнении с однокомпонентным мелоксикамом, что было подтверждено в ходе доклинических исследований [56]

Также проведённые исследования позволили установить оптимальные дозировки для каждого из компонентов, что в дальнейшем использовалось при разработке состава и технологии МЛФ.

На этапе выбора ЛФ разрабатываемого препарата для терапии ОА было важно обеспечить несколько параметров [57]: во-первых, высокую эффективность каждого из компонентов, сочетающуюся с минимальными рисками возникновения системных побочных эффектов, что особенно важно при терапии коморбидных пациентов. Во-вторых, самостоятельное применение ЛП пациентом и, в-третьих, безболезненность процедуры и длительный фармакологический эффект.

Учитывая вышеназванные положения, а также включение в комбинацию НПВП, выбор пал на разработку комбинированной мягкой лекарственной формы для наружного применения, которой в отличие от пероральных систем доставки присущ ряд достоинств [58-62]:

- Высокая эффективность, сравнимая с инъекционными и пероральными формами;
- Минимизация возникновения побочных эффектов по сравнению с системными ЛП, отсутствует необходимость оценки желудочно-кишечных и сердечно-сосудистых рисков.

При этом из недостатков МЛФ, включающих НПВП, можно выделить невозможность использования при генерализованном ОА, однако данный тип встречается нечасто и ОА коленного сустава лидирует по распространённости.

На рисунке 2 схематично отражены направления фармакологического действия компонентов перспективной комбинации для терапии ОА.



Рисунок 3 – Направления действия компонентов разрабатываемой МЛФ

4. Современные МЛФ для наружного применения – гель на гидрофильной основе

МЛФ представляют собой сложный комплекс лекарственных веществ с основой, которая обеспечивает оптимальную консистенцию, во многом определяет полноту и скорость высвобождения АФС, а, следовательно, их терапевтическую эффективность [63].

Мази – это разновидность МЛФ, предназначенная для нанесения на кожу, раны и слизистые оболочки.

В зависимости от консистенции различают собственно мази, кремы, гели, пасты, линименты [ГФ Мази].

Основополагающим этапом разработки мазей является выбор основы, которая может быть гидрофобной, гидрофильной, дифильной, эмульсионной или многофазовой [64].

Результаты исследований подчёркивают высокую биодоступность составов на гидрофильных основах (ГО) [65,66], в связи с чем на этапе разработки МЛФ для терапии ОА представляется необходимым рассмотреть их более подробно.

ГО – отдельные вещества и композиции веществ, способные растворяться в воде или образовывать с ней устойчивые суспензии с образованием гелей. Такие основы позволяют вводить в мази большие количества водных растворов, быстро высвобождают ЛВ, обеспечивают их резорбтивное действие, легко наносятся на кожу и удаляются с неё.

ГО, как правило, являются гиперосмолярными, вследствие чего при применении могут абсорбировать значительное количество экссудата.

Выделяют несколько вариантов классификации ГО:

По способности взаимодействовать с водой выделяют:

- Способные к набуханию с последующим растворением в воде (эфир целлюлозы, крахмал, желатин и др.);
- Способные к набуханию и нерастворимые в воде (полиакрилаты, бентониты и др.).

По происхождению:

- Натуральные гели высокомолекулярных углеводов, белков: крахмал, желатин, коллаген; полисахаридов: альгинаты, каррагинаты; животного происхождения: хитозан; растительного происхождения:

- Гели полусинтетических высокомолекулярных соединений (ВМС): эфиры целлюлозы (метилцеллюлоза (МЦ), натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ), гидроксипропилцеллюлоза (ГЭЦ), гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ), гидроксипропилцеллюлоза (ГПЦ) и др.);

- Гели синтетических ВМС: полиакрилаты (карбомеры), поливинилпирролидон (ПВП), поливиниловый спирт (ПВС), полиэтиленоксиды (ПЭО);

- Соли неорганических ВМС: бентониты, диоксид кремния.

По физико-химической природе:

- Системы типа гелей;
- Студни и коллоидные системы.

Каждый гелеобразователь характеризуется рядом особенностей, которые отражаются как на области его использования, так и на технологических приёмах.

Полусинтетические ГО. Производные целлюлозы представляют собой продукты замещения атомов водорода гидроксильных групп целлюлозы различными ацильными или алкильными радикалами. Молекулярная масса заместителей, степень этерификации, полимеризации эфира, а также степень его замещения будут во многом определять свойства полимера.

Согласно данным литературы, *производные целлюлозы* в качестве мазевых основ имеют преимущества перед другими основами, так как они биологически индифферентны, не вызывают раздражающего, аллергизирующего действий, способны поглощать экскреторные и секреторные продукты, способствуют наиболее полному высвобождению

фармацевтических субстанций из мазей, демонстрируют явное псевдопластичное поведение [67].

За счёт способности абсорбировать влагу такие основы, в частности, Na-КМЦ, используют при разработке противомикробных составов, используемых для заживления ран [68].

С технологической точки зрения гели на основе производных целлюлозы достаточно трудоёмки в изготовлении и в зависимости от марки имеют ряд особенностей (Таблица 1).

Таблица 1 – Особенности технологии получения гелей на некоторых марках производных целлюлозы [63,69]

| Марка | Особенности технологии |
|--------|---|
| МЦ | Легко и быстро растворяется в воде t 20-25°C |
| Na-КМЦ | Легко и быстро растворяется в воде t 20-25°C |
| ГЭЦ | Медленно растворяется в холодной воде и при t 20-25°C, лучше растворяется в воде при t 45-55°C |
| ГПМЦ | 1/3 объёма воды рекомендуется нагреть до 80°C и добавить полимер при перемешивании, перемешивать около 30 минут, затем добавить остальной объём воды t 5-10°C |
| ГПЦ | Медленно растворяют в воде нагретой до t 45-60°C до полного растворения и остывания раствора до t 20-25°C |

К недостаткам этой группы гелеобразователей стоит отнести невысокую антимикробную активность, необходимость введения в состав суспензионно-эмульсионных лекарственных форм стабилизаторов агрегативной устойчивости.

Синтетические гелеобразователи.

В фармацевтической технологии широко используются редкосшитые полимеры акриловой кислоты, наибольшее применение с среди них нашли карбополы, по международной классификации называемые также карбомерами.

Карбополы достаточно хорошо диспергируются в воде с образованием вязких дисперсий с рН 2,8-3,2. В отличие от других полимеров, карбополам для образования геля требуется нейтрализация растворами щелочей, триэтиламина или аминометилпропанола, в зависимости от заданных характеристик продукта в количестве, как правило, не превышающем 1,5-2,0 мл на 100 г готового продукта.

Механизм гелеобразования редкосшитых акриловых полимеров представлен на рисунке 4 [70]

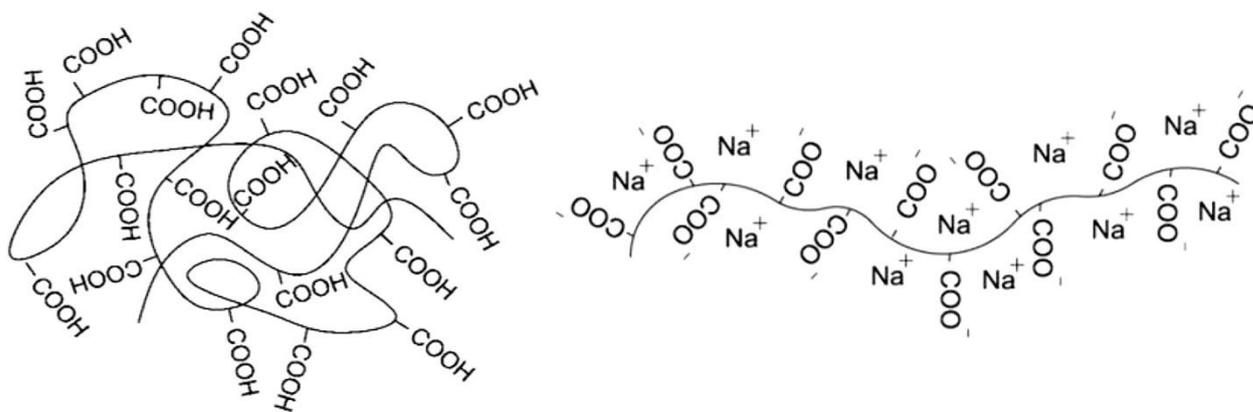


Рисунок 4 – Механизм гелеобразования карбопола

Полимер сильно свернут в порошкообразном состоянии, но сшитая структура начинает раскрываться при диспергировании в воде. Протяженная структура полимерной сетки получается в присутствии основания, где реакция между полимером и основанием приводит к ионизации вдоль основной цепи полимера. Возникающие в результате отрицательные заряды приводят к электростатическому отталкиванию и, следовательно, расширению полимерных цепей до протяженной структуры

Карбополы широко применяют для получения дерматологических ЛФ [71] и ЛФ, наносимых на слизистые оболочки [72]. В октябре 2020 года, согласно данным ГРЛС на российском фармацевтическом рынке было зарегистрировано 4 состава МЛФ, содержащих мелоксикам, в сентябре 2022 года был зарегистрирован ещё один препарат, итого доля МЛФ, содержащих мелоксикам, составила 6,9% от общего числа препаратов [73].

Примечательно то, что в составе четырёх из пяти композиций в качестве вспомогательного вещества используется гелеобразователь карбопол.

В таблице 2 представлен состав оригинального препарата Амелотекс, разработанного и выпускаемого компанией ЗАО «ФармФирма «Сотекс», Россия.

Таблица 2 – Характеристика препарата сравнения
Амелотекс® гель 1% [74].

| Компонент | Количество | Назначение |
|--|---|---|
| Мелоксикам | 1,000 | Действующее вещество (НПВП из группы оксикамов) |
| Карбомер | 0,900 | Гелеобразователь |
| Трометамол | 2,100 (допускается содержание от 1,6 до 2,6) | Корригент рН и нейтрализатор мелоксикама, усилитель проникновения активного вещества препарата через кожу |
| Метилпирролидон | 15,000 | Гидрофильные неводные растворители, способствующие растворению и пенетрации мелоксикама, также выполняющие роль антимикробных консервантов |
| Этанол 95% | 25,000 | |
| Апельсина цветков масло, лаванды масло | q.s. | Отдушки |
| Вода очищенная | до 100,000 | Растворитель и дисперсионная среда гелевой основы |

В представляемой научно-исследовательской работе препарат Амелотекс® гель 1% использовали в качестве референтного в время проведения доклинических исследований, а также при этапе оценки структурно-механических свойств комбинированной МЛФ для терапии ОА.

Натуральные гелеобразователи

Среди натуральных гелеобразователей особый интерес представляют альгинаты, являющиеся солью альгиновой кислоты, извлекаемой из бурой водоросли *Laminaria japonica*. Альгинаты образуют гели в широком диапазоне вязкостей, и их вязкость остаётся постоянной при температуре от 20 до 80°C [63].

Технологическим преимуществом таких гелей является отсутствие необходимости нагревания для гелеобразования. Гели альгинатов физически безвредны, относительно кислотоустойчивы, обладают антибактериальным действием, что иногда позволяет отказаться от введения консервантов, а также смягчающим и увлажняющим действием при нанесении на кожу [63].

В исследованиях отмечают возможность использования альгинатов в качестве компонентов для получения систем доставки с модифицированным высвобождением [75-77].

С недавнего времени в состав косметических и фармацевтических рецептур в качестве гелеобразователя и эмульгатора стали включать ксантановую камедь, представляющую собой мелкодисперсный порошок от белого до светло-желтого цвета, растворимый в воде и нерастворимый в маслах. рН водного раствора находится в интервале 6,0-8,0.

Ксантановая камедь – это анионный полисахарид с высокой молекулярной массой, получаемый путем ферментации с использованием бактерии *Xanthomonas campestris*. Включение ксантановой камеди в рецептуры может способствовать модификации их структурно-механических свойств [78].

5. Вспомогательные вещества в технологии МЛФ

В разделе вспомогательные вещества ни ГФ РФ, ни зарубежные фармакопеи жёстких ограничений не налагают, предлагаю к использованию разрешённые в фармацевтической технологии вспомогательные ингредиенты.

В МЛФ (мазях и гелях) вспомогательные вещества составляют более 90% и регулируют все основные свойства, в том числе полноту, скорость всасывания и фармакологическую активность лекарственных веществ.

ВВ должны обеспечивать необходимую массу мази, её консистенцию, оптимальные реологические свойства; должны способствовать обеспечению терапевтического эффекта мази; не должны проявлять токсического, раздражающего и сенсибилизирующего действия на организм, не взаимодействовать друг с другом, с ЛВ, с материалом упаковок; не изменяться под воздействием факторов внешней среды, и не ухудшать внешний вид и запах ЛФ [63].

По функциональному назначению все ВВ в технологии мазей разделяют на несколько групп: основы-носители и гелеобразователи, растворители, эмульгаторы, антимикробные консерванты, антиоксиданты, солюбилизаторы, вещества для создания и стабилизации определённого значения рН, активаторы всасывания, а также корригенты цвета, запаха и вкуса, в случае, если МЛФ для внутреннего применения.

6. Последовательность стадий и аппаратное оформление технологического процесса получения МЛФ (мазей)

Технологический процесс производства МЛФ на фармацевтическом предприятии составляют следующие технологические стадии:

1. санитарная обработка производства;
2. подготовка сырья и материалов (лекарственные вещества, основа, тара, упаковка и т.д.);
3. введение лекарственных веществ в основу;
4. гомогенизация;

5. стандартизация готового продукта;
6. фасовка, маркировка и упаковка готовой продукции.

При этом этапы №1, 5 и 6 стандартны для производства любых ЛП, а стадии №2, 3 и 4 являются ключевыми и специфическими для технологии МЛФ, поэтому представляется необходимым остановиться на них подробнее.

Подготовка лекарственных веществ включает измельчение, просеивание, если АФС входят в мазь по типу суспензии; растворение в воде или в компоненте основы, если это мазь-эмульсия или мазь-раствор.

Подготовка основы включает операции растворения или сплавления компонентов с последующим удалением механических примесей методом фильтрования – для липофильных основ, включающих тугоплавкие компоненты.

Подготовка гидрогелевых основ во многом зависит от типа, используемого гелеобразователя и включает, как правило, стадии набухания и перемешивания, для гелей карбомера так же добавляется этап нейтрализации. Отличительной особенностью подготовки эмульсионных основ является стадия эмульгирования (диспергирования).

Введение лекарственных веществ в основу.

Лекарственные вещества вводят в МЛФ с учётом их количества и физико-химических свойств. Они бывают трёх типов (Рисунок 5).

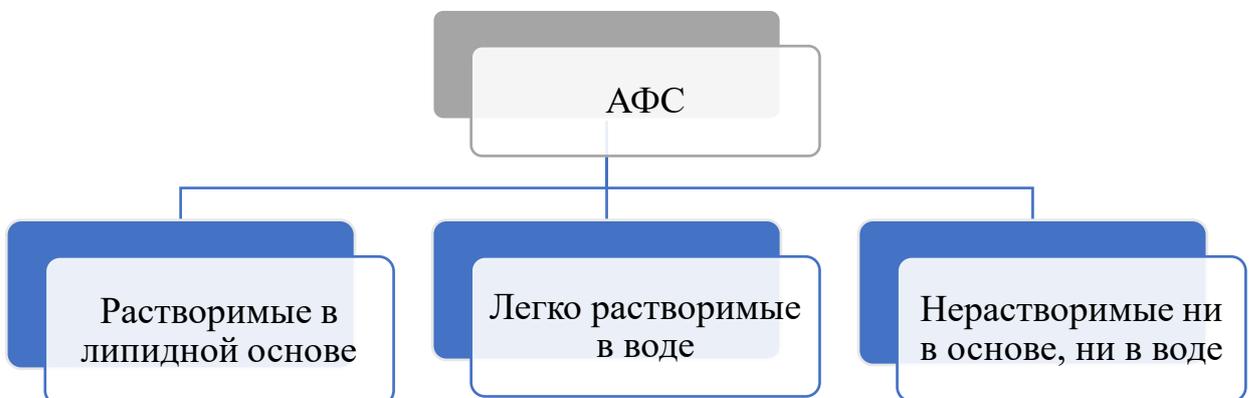


Рисунок 5 – Типы введения АФС в основу

На данном этапе особое внимание обращают на:

- Степень дисперсности лекарственных веществ;
- Их равномерное распределение по всей массе основы;
- Способ введения лекарственных веществ в основу;
- Время, скорость и порядок смешивания компонентов;
- Температурный режим.

Добавление твёрдых лекарственных веществ или их растворов к основе происходит при постоянном перемешивании в смесителях либо реакторах с паровой рубашкой или электрическим обогревом. При этом используются мощные мешалки (якорные, планетарные, пропеллерные или рамные), способные перемешивать в сильновязких средах во всём объёме при различных температурах (Рисунок 6).

А



Б



Рисунок 6 – Примеры мешалок: А – якорная, Б – пропеллерная

При внесении твёрдых веществ к основе получают мазь-суспензию, при растворении веществ в основе – мазь-раствор. В случаях изготовления комбинированных мазей могут осуществляться оба процесса.

Путём перемешивания достигают гомогенизации поддающихся смешению масс или осуществляют турбулирование сред при распределении введённых в них твёрдых частиц.

Следующей стадией производства мазей является гомогенизация. Это специфическая стадия, поскольку при перемешивании не всегда достигается нужная степень дисперсности лекарственных веществ.

Гомогенизацией называют технологическую стадию, при которой широкое полидисперсное распределение размера частиц преобразуется в узкое, монодисперсное распределение. Гомогенизация – важнейший технологический процесс при производстве мазей. Очень важно распределить лекарственные вещества таким образом, чтобы их процентное содержание оставалось постоянным в любой, даже самой малой дозе готового продукта. Применение инновационного технологического оборудования для гомогенизации позволяет придать выпускаемой продукции конкурентоспособные преимущества.

Мазетерка трёхвалковая. Принцип действия: в пространство между валками и ограничителями укладывается растираемое вещество. Мазетерка представляет собой систему из трех соприкасающихся между собой валков, оси которых лежат в одной плоскости. Два крайних валка прижимаются к среднему пружинами. Зазор между средними крайними валками регулируется. Мази и пасты растираются в зоне контакта валков. Растертая мазь соскабливается с валка скребком, укрепленным на корпусе (Рисунок 7).

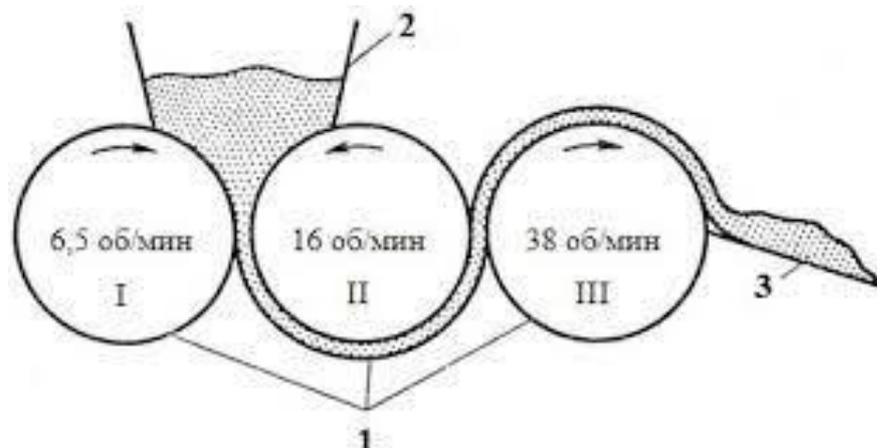


Рисунок 7 – Схема работы трехвалковой мазетерки

Для создания оптимальной температуры мази, поступающей на валки, их изготавливают полыми, чтобы при необходимости вовнутрь можно было подавать воду. При работе валки вращаются с разной скоростью: 6,5, 16 и 38

об/мин, что обеспечивает переход мази с одного вала на другой. С третьего вала мазь поступает по направляющему желобу в приёмник фасочной машины (Рисунок X). В результате раздавливающего, разламывающего и растирающего действия, усиленного дополнительными колебательными движениями третьего вала вдоль оси, образуется равномерная и тонкодисперсная мазь.

Производительность трёхвалковых мазетёрок зависит от марки и составляет от 1,5 до 80 кг мази в час.

Мельница жерновая имеет два жернова, верхний отлит вместе с загрузочной воронкой, неподвижен, нижний вращается в горизонтальном направлении. На поверхности жерновов имеются бороздки, более глубокие в центре, у краев исчезающие. Мазь гомогенизируется в просвете между жерновами и выдавливается к краям, где с помощью скребка собирается в приёмник (Рисунок 8).

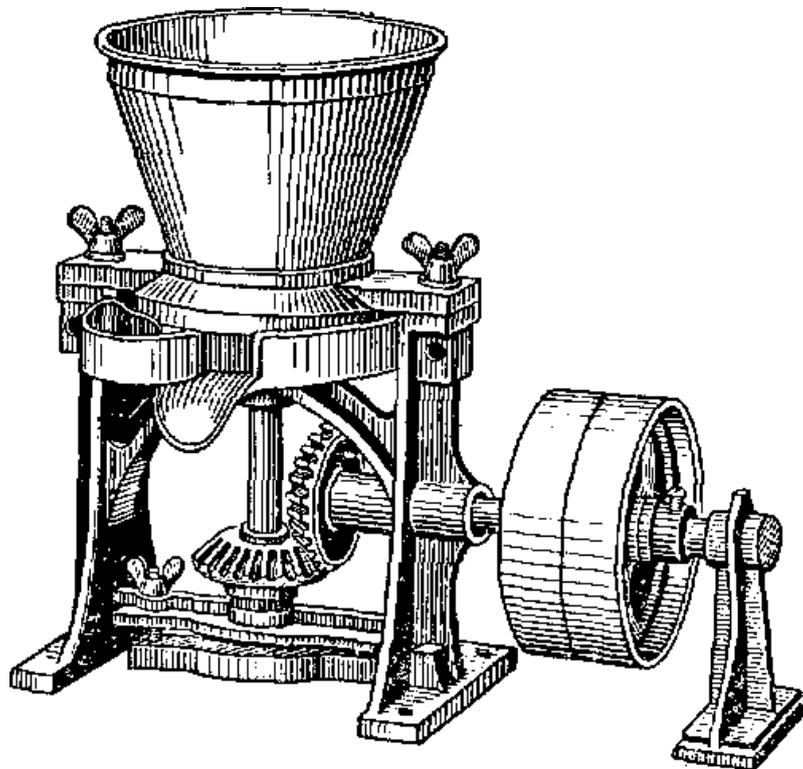


Рисунок 8 – Жерновая мельница

Степень дисперсности частиц в мази определяются расстоянием между жерновами. Производительность мельницы 60-80 кг/ч.

Для получения суспензионных мазей часто используют коллоидные мельницы (Рисунок 9), работающие по принципу истирания твёрдых частиц, удара, кавитации.



Рисунок 9 – Коллоидная мельница

В коллоидную мельницу, работающую по принципу удара, смесь подаётся между вращающимся диском и корпусом с насаженными на них пальцами. При вращении диска частицы дисперсной фазы подвергаются мощному гидравлическому воздействию, возникающему в результате многочисленных ударов пальцев по жидкости, образуя тонкую дисперсию [63].

Роторно-пульсационные аппараты (РПА) нашли широкое применение в фармацевтической технологии при приготовлении суспензионных и эмульсионных мазей.

По сравнению с мешалками гомогенизаторы создают более высокие силы сдвига и поэтому служат для эмульгирования и диспергирования жидких и твёрдых веществ в средах с вязкостью от средней до высокой.

Большинство гомогенизаторов построено по принципу «ротор/статор»: между двумя поверхностями, одна из которых закреплена неподвижно (статор), а другая вращается (ротор), действуют сильные сдвиговые

напряжения, отражение и трение, в результате чего происходит интенсивное диспергирование жидких или твёрдых частиц. Поверхности ротора и статора в зоне диспергирующего зазора снабжены зубьями для повышения результативности диспергирования. Кроме того, зазор между этими двумя поверхностями часто может регулироваться.

На рисунке 10 представлен пример РПА, являющегося универсальным высокоэффективным смесителем, измельчителем, диспергатором и гомогенизатором.

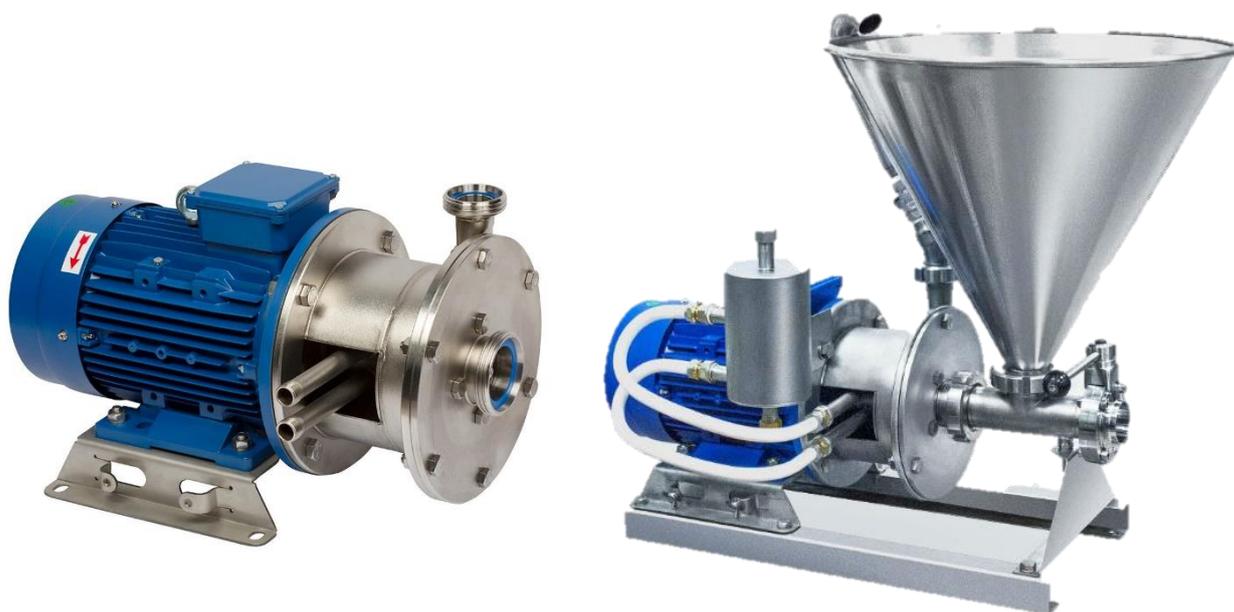


Рисунок 10 – Роторно-пульсационный аппарат, Россия [79]

В фармацевтической промышленности стадии смешения и гомогенизации часто проводят в одном аппарате. При этом обычно отдают предпочтение производственным машинам и установкам, которые позволяют осуществлять сразу несколько технологических операций, поскольку их конструктивные элементы и рабочие параметры уже согласованы между собой. По этой же причине удобны комплексные решения от одного производителя в целом или отдельных не взаимосвязанных между собой этапов производства. В качестве примера на рисунке 11 изображён реактор типа KFT 50 Pilot-L с рабочим объёмом равным 50 литров.

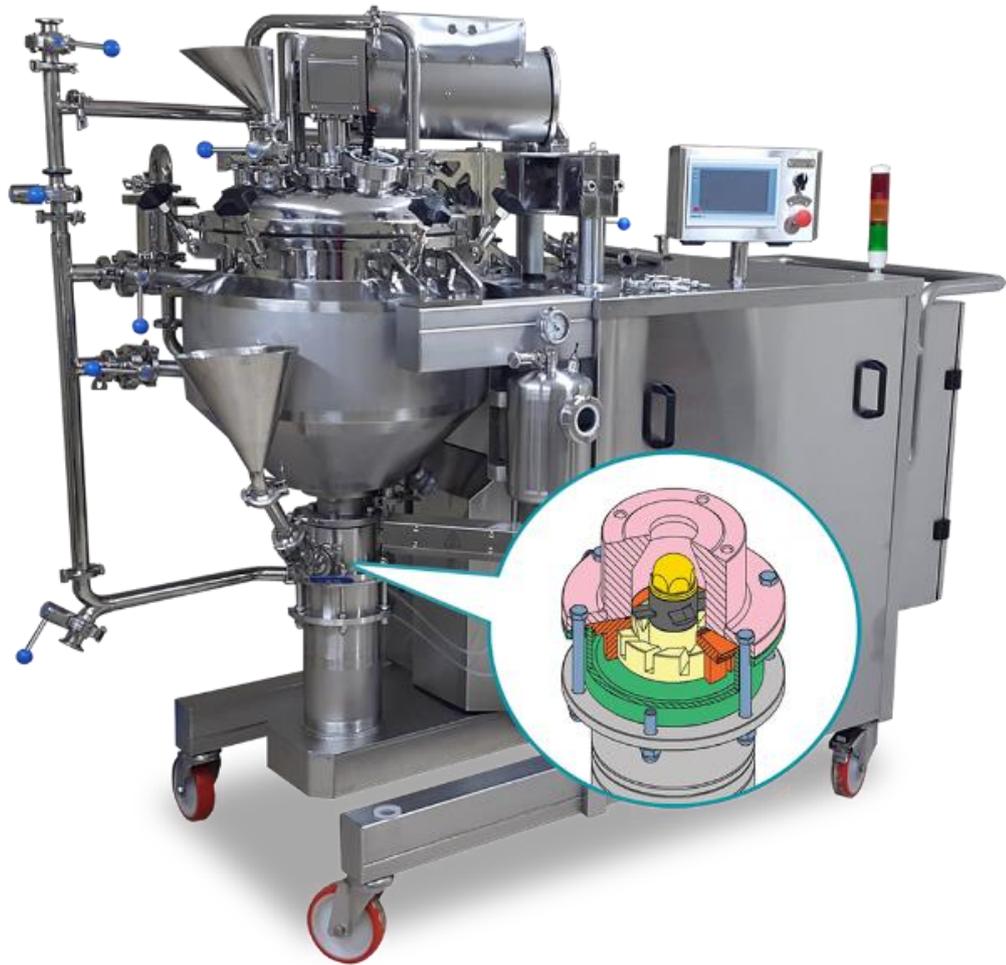


Рисунок 11 – Миксер-гомогенизатор типа KFT 50 Pilot-L

Камера гомогенизатора имеет две ступени, в первой расположена двухлопастная двухуровневая мешалка, где происходит предварительное смешивание и увлажнение мелкодисперсной среды сыпучих продуктов с жидкостью, во второй, то есть гомогенизаторе, продукт ускоряется аксиально и проталкивается к зазорам между зубцами статора. Скорость вращения ротора при этом может достигать 4000 об/мин, что способствует быстрому распределению дисперсной фазы в дисперсионной среде [80].

На рисунке 12 представлен пример ещё одного промышленного смесителя-гомогенизатора с рабочим объёмом от 300 до 5000 литров.



Рисунок 12 – Смеситель-гомогенизатор типа MZUTS (URLIŃSKI, Польша) [81]

Установка используется как для смешения, так и для гомогенизации. За счёт якорной мешалки с волнорезами и направляющими смесительными лопастями обеспечивается интенсивное перемешивание массы в горизонтальной и вертикальной плоскостях (отсутствуют мёртвые точки в зоне смешивания).

Кавитационная технология гомогенизации, в общем случае, основана на явлении кавитации, которую в гидродинамике связывают с появлением в жидкости при определённых условиях различного рода многочисленных кавитационных пузырьков малого размера. Пузырьки пульсируют, искилируют, растут, расщепляются, схлопываются, а также совершают различные движения и взаимодействия друг с другом, что обуславливает появление различных физико-химических и химических эффектов.

Зона зарождения пузырьков характеризуется существенных разрежением относительно давления окружающей среды. Кавитационное

разрушение поверхности обуславливается действием кумулятивной микроструи жидкости, образующейся при схлопывании кавитационного пузырька. Это сопровождается также акустическими колебаниями различной частоты и амплитуды. В момент схлопывания внутри пузырька возникают высокие давления и температуры. Пульсация и схлопывание кавитационных пузырьков сопровождается рядом энергоёмких процессов, а именно: эмиссия света, эрозия поверхностей, диспергирование твёрдых тел, эмульгирование несмешивающихся жидкостей, появление различных химических, биологических и других эффектов.

Ранее было показано, что применение кавитации, а точнее виброкавитации, может способствовать повышению эффективности экстракции действующих веществ из лекарственного растительного сырья [82]. Исследование проводилось на лабораторном виброкавитационном гомогенизаторе (рисунок 13).

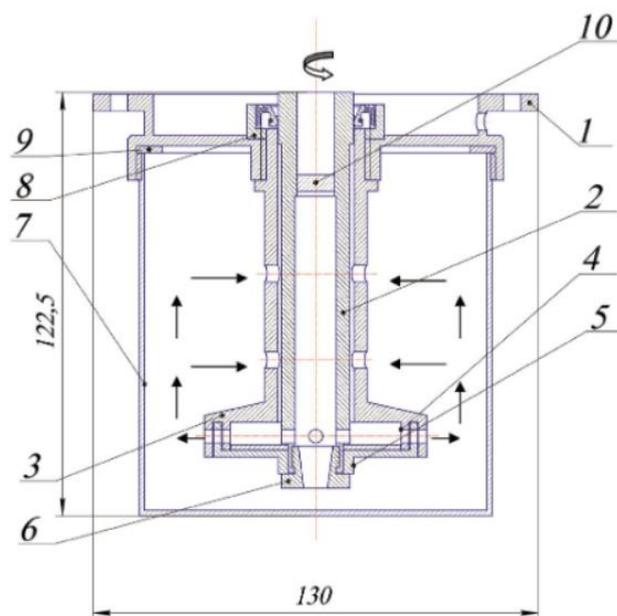


Рисунок 13 – Схема виброкавитационного гомогенизатора: 1 – крышка; 2 – втулка; 3 – статор; 4 – крыльчатка; 5 – ротор; 6 – нижняя втулка; 7 – стакан; 8 – втулка сальниковая; 9 – прокладка; 10 – заглушка [82]

При анализе литературных источников и патентном поиске не данных о влиянии виброкавитации на свойства МЛФ встречено не было.

ВЫВОДЫ ПО ПЕРВОЙ ГЛАВЕ 1:

ОА является широко распространённым социально-значимым заболеванием, терапия которого включает применения комплекса медикаментозных и немедикаментозных подходов. Результаты современных исследований свидетельствуют о важной роли воспаления в развитии патогенеза ОА, в связи с чем при фармакотерапии особое значение приобретает группа НПВП.

Использование противовоспалительных компонентов в составе МЛФ по сравнению с пероральными и инъекционными системами доставки, характеризуется благоприятным профилем безопасности при одновременном достижении высокого терапевтического эффекта, сопровождающегося удобством применения для пациента.

Перспективна комбинированная терапия, предполагающая включение в состав одного ЛП нескольких молекул, обладающих разными механизмами действия. В этой связи представляет интерес создания ЛП в МЛФ, содержащего мелоксикам, аденозин и иммуномодулятор М.

Изучение ассортимента современных мазевых основ показало, что наиболее перспективными являются гидрофильные основы, природного, синтетического и полусинтетического происхождения.

Технология МЛФ включает ряд стадий, ключевыми из которых является смешение и гомогенизация. Аппаратурное оформление этих процессов представлено широко известными устройствами (мезетерки, мельницы, РПА), при этом развиваются новые подходы. В частности, кавитационная обработка (виброкавитация) является перспективным подходом, который может найти своё применение в технологии МЛФ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

I. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ НА ЭТАПЕ ФАРМАКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Объекты исследования

Для получения комбинированной МЛФ было взято три АФС, обладающие разными свойствами:

1. **Мелоксикам** – НПВП, светло-желтое вещество, практически нерастворимое в воде, очень хорошо растворимое в сильных кислотах и щелочах, очень незначительно растворимое в метаноле [64].

Структурная формула мелоксикама – 4-гидрокси-2-метил-N-(5-метил-2-тиазол)-2H-1,2-бензотиазин-3-карбоксамид-1,1-диоксида представлена на рисунке 14.

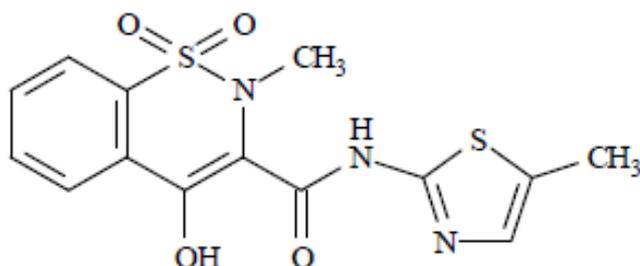


Рисунок 14 – Структурная формула мелоксикама

2. **Аденозин** – белый кристаллический порошок. Растворим в воде и практически нерастворим в этаноле. Растворимость повышается при нагревании и снижении pH раствора. Молекулярная масса 267,24. Структурная формула аденозина – 6-Амино-9-бета-D-рибофуранозил-9H-пурина представлена на рисунке 15.

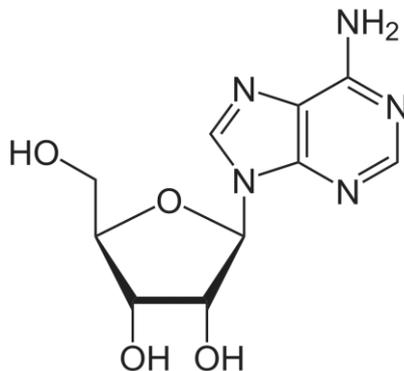


Рисунок 15 – Структурная формула аденозина

3. Иммуномодулятор М – оригинальная субстанция, представляющая собой белый крупнокристаллический порошок, легко растворимый в воде.

2. Вспомогательные вещества (ВВ)

Известно, что терапевтическая активность, стабильность, удобство применения препарата во многом определяются технологией его получения, а также выбранной лекарственной формой. Подбор ВВ при разработке МЛФ осуществлялся с учетом свойств используемых компонентов, стабильности полученных композиций, а также физико-химических характеристик полученных образцов.

ВВ, используемые в работе, разрешены к медицинскому применению и соответствуют требованиям мировых фармакопей (Европейской, Соединенных Штатов), в том числе ГФ РФ XIV издания:

- *Альгинат натрия (Protanal PH 1033, Ирландия)*

Натриевая соль альгиновой кислоты, представляет собой природный полисахарид из морских бурых водорослей [83]. По внешнему виду это мелкодисперсный порошок от белого до светло-коричневого цвета. Альгинат является одновременно биополимером и полиэлектролитом, которые считаются биосовместимыми, нетоксичными, неиммуногенными и биоразлагаемыми [84].

- *Ксантановая камедь (Foodchem[®], Китай)*

Мелкодисперсный порошок от белого до светло-желтого цвета, растворим в воде, нерастворим в маслах, рН водного раствора находится в интервале 6,0-8,0. В фармацевтической промышленности применяется в качестве гелеобразователя и эмульгатора [85].

- *Гидроксиэтилцеллюлоза (ГЭЦ) (Natrosol 250, Ashland, США);*

Полусинтетический гелеобразователь, представляющий собой мелкий кристаллический порошок от белого до желтоватого цвета, без запаха. Растворим в воде с образованием геля. Водный раствор имеет рН в интервале 6,0 – 8,5. Вязкость водного раствора может находиться в диапазоне от 1 000 до

5 000 мПа*сек. Применяется в качестве гелеобразователей, загустителей, компонентов пленочных оболочек [63].

- *Твин 80 (полисорбат – 80) (Tween® 80, Merck, Германия)*

Представляет собой маслянистую вязкую прозрачную жидкость от светло-желтого до янтарного цвета с характерным запахом. Относится к неионогенным ПАВ, применяется в качестве эмульгатора I рода. Растворим в воде, этаноле, бензоле, хлороформе, смешивается с жирными маслами [86].

- *Кремофор RH40 (Kolliphor® RH 40, Merck, Германия)*

Кремофор RH40 (гидрогенизированное касторовое масло, ПЭГ-40) представляет собой опалесцирующую пастообразную массу. Имеет характерный запах. Хорошо растворим в воде, маслах, спиртах. Гидрогенизированное касторовое масло является неионогенным ПАВом растительного происхождения – эффективный солюбилизатор и эмульгатор, обладает способностью усиливать фармакологическое действие лекарственных средств, что позволяет снижать их дозировки [63].

- *Пропиленгликоль (АО «Экос-1», Россия)*

Пропиленгликоль принадлежит к категории многоатомных спиртов. Это прозрачная, гигроскопичная жидкость, смешивающаяся с водой, этанолом и многими эфирными маслами. В концентрации более 5% он выполняет свойства «увлажнителя», в дерматологических МЛФ характеризуется способностью усиливать кожную проницаемость, также является пластификатором и позволяет усилить антибактериальный эффект [56,63].

- *Глицерин (АО «Экос-1», Россия);*

Бесцветная, вязкая гигроскопичная жидкость, неограниченно растворимая в воде [64].

- *Диметилсульфоксид (ДМСО) (АО «Экос-1», Россия)*

ДМСО – это диполярное органическое соединение со структурной формулой: $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$. Он полностью смешивается с водой в любой пропорции и действует как акцептор водородных связей, является активатором всасывания ЛП, обладает антиоксидантными и противовоспалительными

свойствами. ДМСО быстро абсорбируется через кожу. При трансдермальном введении он проявляет невысокую токсичность, после его нанесения происходит образование пор в липидном бислое мембран клеток кожи [87].

- *Вода очищенная.*

3. Оборудование

На этапе разработки состава и технологии:

1. Весы OHAUS PA-214, США;
2. Мешалка с верхним приводом Heidolph RZR 2000, Германия;
3. pH-метр Аквилон 410, Россия;
4. Цифровой микроскоп 40x-1600x Bresser[®] LCD MICRO 5MP, Германия;
6. Лазерный анализатор частиц «Микросайзер» модель 201С ООО «ВА Инсталт», Россия;
7. Вискозиметр Anton Paar DV-2P (Anton Paar GmbH, Австрия);
8. Программируемый реометр Brookfield DV-III Ultra Base Unit Rev.B, США с программным обеспечением (ПО) Brookfield Reocalc[®], США;
9. Лабораторный консистометр, сконструированный в ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России под руководством профессора В.А. Вайнштейна [88,89];

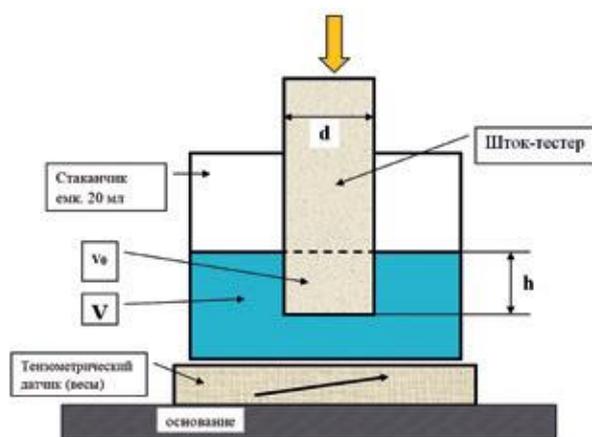


Рисунок 16 – Схема и макет прибора для измерения сопротивления упруго пластичных материалов

10. Камера термостатируемая Memmert HPP110, Германия;
11. Центрифуга MPW-352R, Польша;

12. Диффузионная ячейка Франца PermeGear, США (исследования проведено с использованием силиконовой мембраны);

13. Виброкавитационный гомогенизатор – лабораторный образец аппарата, изготовленного в СПбГТИ(ТУ).

Основная часть экспериментальных работ проводилась на базе структурных подразделений, входящих в Центр коллективного пользования ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России, в частности, на участке мягких лекарственных форм GMP тренинг-центра (рисунок 17).



Рисунок 17 – Участок мягких лекарственных форм
GMP тренинг-центра СПХФУ

На этапе оценки показателей качества МЛФ:

1. Аналитический высокоэффективный жидкостный хроматограф системы Prominence фирмы Shimadzu (Япония), оснащенный насосом LC-20AD с градиентом низкого давления, автосамплером SIL-20A, термостатом CTO-20AC и диодно-матричным детектором SPD-M20A;

2. ИК-спектрометр Spectrum 3 (Perkin Elmer, США) с применением приставки НПВО (нарушенное полное внутреннее отражение) в диапазоне длин волн от 400 см^{-1} до 4000 см^{-1} .

4. Методы исследования

1. Растворимость АФС определяли по методике, изложенной в ГФ РФ XIV издания ОФС 1.2.1.0005.15 «Растворимость» для веществ с неизвестной растворимостью.

2. Исследование кристаллических действующих веществ, а также оценку размера частиц мелоксикама в составе МЛФ осуществляли согласно методике, предложенной ГФ РФ XIV издания ОФС 1.2.1.0009.15 «Оптическая микроскопия».

3. Водородный показатель (рН). Определение рН проводили потенциометрически с использованием рН-метра Аквилон рН-410 при температуре 20°C , в соответствии с ГФ РФ XIV издания ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия». рН-метр снабжен комбинированным электродом, что позволяет применять его для определения рН в мазях и гелях. Калибровка прибора проводилась по стандартным буферным растворам.

4. Изучение реологических и консистентных свойств.

В настоящее время консистенцию рассматривают как комплекс структурно-механических (реологических) свойств МЛФ. В соответствии с терминологией, предложенной академиком П.А. Ребиндером, к структурно-механическим свойствам дисперсных систем относят вязкость, пластичность, упругость, прочность, то есть реологические свойства, связанные со структурой [63].

Зависимость скорости сдвига от напряжения сдвига измеряли с использованием реометра с ультраконусной пластиной (СЕР-40), объём пробы составлял 0,5 мл. Скорость вращения шпинделя подбирали с использованием ПО, так чтобы значения крутящего момента находились в диапазоне от 10 до 100%.

Зависимость вязкости от скорости вращения шпинделя оценивали с использованием шпинделя LV-4 (64), который погружали в стакан с испытуемым образцом. Для анализа были выбраны стаканы объёмом 100 мл, при этом объём испытуемого образца составлял около 75 мл, что позволяло погрузить шпиндель на необходимую глубину.

Сопротивление структуры гелей (консистенцию) определяли на приборе (Рисунок 8) по методике, описанной В.А. Вайнштейном [87].

5. Биофармацевтические исследования

Исследование мембранной проницаемости мелоксикама из геля было изучено на базе лаборатории Химии олигосахаридов и функциональных материалов на их основе Института химии растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук с помощью термостатируемой диффузионной ячейки Франца (рисунок 18).

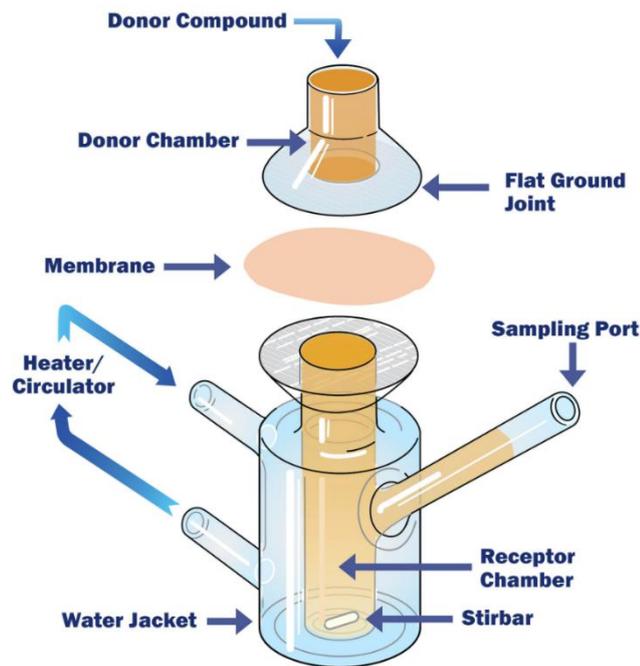


Рисунок 18 – Схематическое представление диффузионной ячейки Франца

Ячейка Франца состоит из донорной и акцепторной камеры, которые отделяет друг от друга барьер (мембрана) [90]. Донорную камеру, объемом 1 мл, заполняли исследуемым образцом, масса которого была определена путём предварительного взвешивания на аналитических весах тюрбика с образцом до и после заполнения донорной камеры. Разница полученных значений

принималась за массу исследуемого образца и в каждом опыте была неизменной – $1,0 \pm 0,1$ г. Акцепторную камеру объемом 5 мл заполняли фосфатным буферным раствором ($\text{pH}=7,4$). Буферный раствор был необходим поддержания необходимой осмолярности и для готовился на основе дистиллированной воды и солей: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (18 г/л), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (25 г/л) и NaCl (10 г/л). Соли имели высокую степень чистоты (ЧДА) и использовались без дополнительной очистки. pH раствора контролировался с помощью pH -метра (Five Easy Mettler Toledo).

Акцепторная камера была оснащена водяной рубашкой для термостатирования (термостат LOIP LT, Россия) при 32°C в течение всего эксперимента. Кроме того, во время эксперимента раствор в акцепторной камере активно перемешивался с постоянной скоростью при помощи магнитной мешалки (500 об/мин), что было необходимо для равномерного распределения определяемого вещества в объеме. В составе акцепторной камеры так же находился порт для отбора пробы, он же поспособствовал поддержанию определенного давления раствора на мембрану снизу.

Исследуемые образцы до начала эксперимента хранили в холодильнике (4°C), а перед использованием выдерживали 1 час при комнатной температуре. В начале эксперимента акцепторную камеру заполняли буферным раствором и термостатировали 15 минут. В это время определяли массу образца. Затем на поверхность акцепторной камеры устанавливали синтетическую силиконовую мембрану. Далее, на мембрану через уплотнительное кольцо помещали донорную камеру. Плотный контакт двух камер был реализован с помощью зажима. Затем, одновременно с началом отсчета времени, образец равномерно наносили на поверхность мембраны в донорной камере. Сверху донорная камера была закрыта парафином.

Через каждые 30 минут через порт отбора пробы акцепторной камеры с помощью шприца с тонкой иглой переносили аликвоту (0,5 мл) в кювету спектрофотометра (Shimadzu UV1800, Япония). Одновременно с этим, в порт отбора пробы, вносили равное количество (0,5 мл) чистого буферного

раствора. Во время эксперимента не допускали образования пузырьков воздуха в области контакта мембраны и раствора. Эксперимент проводили в течение 9 часов, соблюдая двукратную повторяемость.

Концентрацию мелоксикама в отобранных пробах оценивали спектрофотометрически, используя предварительно полученные коэффициенты поглощения (экстинкции) ε ((см×моль)⁻¹×л) мелоксикама в фосфатном буферном растворе (рН=7,4).

С этой целью, весовым способом (аналитические весы Shimadzu, Япония) была приготовлена серия из 8 растворов мелоксикама в фосфатном буферном растворе. Растворы тщательно перемешивались в течение 5 часов до полного растворения АФС. Диапазон концентраций серии растворов составлял $1.5 \times 10^{-5} - 6.5 \times 10^{-5}$ моль/кг. Затем были зарегистрированы УФ-спектры полученных растворов в области длин волн от 200 до 600 нм и установлено, что спектры мелоксикама имеют два характерных пика при 362 нм и 270 нм. Таким образом, была получена зависимость оптической плотности от концентрации мелоксикама (Рисунок 19). Тангенс угла наклона данной зависимости является коэффициентом поглощения.

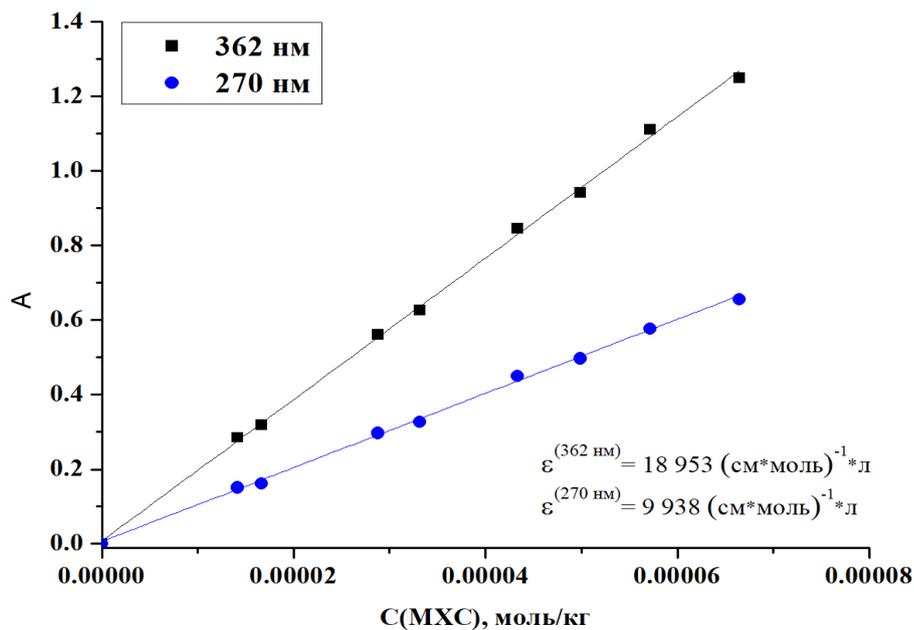


Рисунок 19 – Калибровочный график мелоксикама в буферном растворе рН=7.4 при 25 °С.

На основе полученных УФ спектров, по закону Бугера-Ламберта-Бэра рассчитывали концентрацию мелоксикама в каждой пробе, при этом учитывали потери вещества, возникающие после каждого отбора пробы. Отношение массы мелоксикама в каждой пробе к исходной массе в донорной камере выражали в процентном соотношении, результаты представляли в графическом виде (см. Глава 3).

6. Микробиологические методы исследования

ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота» Государственной фармакопеи XIV издания являлась основополагающим документом в определении микробиологической чистоты комбинированного геля.

Определение микробиологической чистоты

Испытание на микробиологическую чистоту проводили в асептических условиях двухслойным агаровым методом с использованием агаризованных питательных сред. Для определения аэробных бактерий использовали плотную питательную среду МПА, для определения дрожжевых и плесневых грибов – среда Сабуро.

Метод исследования: Среды вносили в количестве 15-20 мл в каждую стерильную чашку Петри диаметром 90 мм и оставляли до застывания. Образец МЛФ, приготовленный для анализа, в количестве 1 мл вносили в пробирку с 4 мл соответствующей расплавленной и охлажденной питательной среды, быстро перемешивали содержимое пробирки и переносили на поверхность застывшего и подсушенного агара в чашке Петри, равномерно распределяя верхний слой среды вращательными движениями. После застывания чашки переворачивали и помещают в термостат для инкубации. выдерживание в термостате при температуре $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ – для культивирования бактерий, $(22,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ – для культивирования грибов. Для каждого разведения образца использовали не менее двух чашек Петри с определенной средой.

Для выявления *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* применяли среды №3. Для выявления *Staphylococcus aureus* – среды №8.

Посевы инкубировали в течение 18-24 ч. Термин «рост» обозначает наличие и размножении жизнеспособных микроорганизмов.

Определение антимикробного действия (АМА) геля

АМА гели определяли методом диффузии в агар к трем стандартным тест штаммам микроорганизмов *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *C. Albicans* (Таблица 3).

Таблица 3 – Рабочий музей лаборатории

| Тест-штаммы | Источник получения |
|--|--|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P | Государственная коллекция патогенных микроорганизмов ГИСК им. Л.А. Тарасевича, Россия, г. Москва |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | Всероссийский микологический Центр, Россия, г. Санкт-Петербург |

Агар (МПА и САБУРО) разливали по чашкам слоем толщиной 4 мм (на чашку диаметром 90 мм – 20 мл). Чашки оставляли при комнатной температуре для застывания. Затем с помощью специального стерильного приспособления вырезали лунки, в которые закладывали гель.

Важным для тестирования являлась стандартизация суспензии исследуемого микроорганизма, её концентрация должна составлять $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Практически наиболее приемлемым методом оценки концентрации бактериальной суспензии является измерение ее оптической плотности. Оптическая плотность бактериальной суспензии с концентрацией $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл при визуальном контроле соответствовала стандарту мутности 0,5 по МакФарланду. Бактериальную суспензию готовили из агаровой культуры.

Микробную культуру разводили в разной концентрации от 500 000 000 до 10.000 КОЕ. Образование зоны подавления роста происходило в результате диффузии гели в питательную среду.

Зону задержки роста микробов оценивали в мм с помощью штангенциркуля (кратность измерений равна 5).

7. Анализ размера частиц суспензионной фазы

Во время измерения размера частиц в МЛФ была апробирована методика с использованием лазерного анализатора частиц. Для её реализации был подобран растворитель (вода очищенная), который растворял гелевую основу и при этом не влиял на размер частиц мелоксикама.

Навеску геля около 3,0 помещали в химический стакан объёмом 100 мл и добавляли воду объёмом около 50 мл. Смесь перемешивали стеклянной палочкой до полного растворения гелевой основы, после чего полученному взвесь частями вносили в ячейку анализатора до достижения требуемого уровня затемнения.

Размеры частиц суспензионной фазы рассчитывались прибором автоматически посредством программы «Micro», версия 8.0, Россия.

8. Качественный и количественный анализ.

Качественный и количественный анализ разрабатываемого геля противовоспалительного проводили согласно ГФ РФ ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография» и ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография».

Испытуемый раствор: около 0,5 геля (точная навеска) переносили в мерную колбу на 50 мл, добавляли 20 мл воды очищенной (95С°), перемешивали содержимое до растворения навески геля, доводили объём до метки спиртом этиловым 95%.

Растворы стандартных образцов (СО): около 0,2 СО мелоксикама (точная навеска), 0,5 СО аденозина (точная навеска), 0,5 СО иммуномодулятора М (точная навеска) помещали в мерную колбу на 50 мл, добавляли 20 мл воды очищенной, перемешивали содержимое, доводили объём до метки спиртом этиловым 95%.

Содержание мелоксикама, аденозина и иммуномодулятора М в (%) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_x \times a_x \times 100}{S_{cm} \times a_{co}} \quad (1),$$

C_{cm} – содержание компонента в растворе стандартного образца, мг/мл;

S_x – площадь пика определяемого компонента, mAU мин

S_{cm} – площадь пика соответствующего СО, mAU мин

a_x – масса навески геля, г;

a_{co} – масса навески соответствующего стандартного образца, г;

9. Изучение стабильности МЛФ.

Оценка стабильности МЛФ проводилась в соответствии с ОФС.1.1.0009.18 «Стабильность и сроки годности лекарственных средств» при условии хранения в холодильнике при температуре $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ в течение 1 года.

10. Статистическую обработку результатов исследования проводили в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента». Числовые данные, приводимые в таблицах, представлены в виде: средняя арифметическая (M) \pm ошибка среднего (m). Уровень доверительной вероятности был задан равным 95%.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ НА ЭТАПЕ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальные работы, посвящённые комплексной оценке эффективности и безопасности комбинированной МЛФ были проведены на базе Центра экспериментальной фармакологии СПХФУ.

В качестве тест-системы были выбраны лабораторные аутбредные крысы самцы (источник получения – Российская академия медицинских наук Питомник лабораторных животных «Рапполово»).

Процедуры с животными были рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (протокол Rats-01/CA-21 от 18.02.2021, протокол RATS-OA-01-2022 от 07.02.2022).

Количество животных, используемых в исследовании, составило 100, что было достаточным для получения статистически достоверных результатов, и при этом минимальным по биоэтическим принципам. Группы животных формировали случайным образом, отклонение массы тела животных от среднего значения в группах допускалось не более чем на $\pm 10\%$. После адаптации каждому отобранному в исследование животному был присвоен индивидуальный идентификационный номер, который был нанесён специальным нетоксичным маркером на хвост животного.

ОА моделировали с помощью сочетанного введения в полость скакательного (заплюсневого) сустава крыс самцов линии Brown Norway Catholic Rats по 0,1 мл смеси полного адьюванта Фрейнда с 10 % суспензией талька в изотоническом растворе натрия хлорида в соотношении 1:10 (Рисунок 20).



Рисунок 20 – Доклиническое моделирование ОА:

1. Внутрисуставное введение суспензии талька и адьюванта Фрейда;
2. Внешний вид сустава через 24 часа после моделирования патологии;
3. Измерение размера повреждённого сустава с использованием штангенциркуля.

После моделирования патологии животным в течение 28 дней 1 раз в сутки нанося на кожу, втирая до полного впитывания, в зависимости от группы, наносили определённый состав МЛФ (см. Глава 5). Данный путь введения аналогичен пути введения разрабатываемого препарата человеку. Объём наносимой дозы для каждого животного был рассчитан, исходя из значения массы тела, и составлял около 0,1 мл. На протяжении эксперимента еженедельно проводился клинический осмотр. В качестве препарата сравнения был выбран Амелотекс® гель 1% (ЗАО «ФармФирма «Сотекс», Россия, серия 140520, годен до 05/23 и серия 661120, годен до 10/2023). Выбор оптимального состава геля, а также сравнительную оценку эффективности исследуемых составов проводили, основываясь на комплексе параметров.

1. Измерение размера повреждённого сустава.

Для оценки противовоспалительной эффективности гелей на 1ый и 28ой день эксперимента с использованием штангенциркуля (погрешность измерений $\pm 0,03$ мм) измеряли размеры повреждённого скакательного сустава крыс в сравнении с животными контрольной группы и неповреждённым суставом второй задней конечности.

2. Толерантность к физической нагрузке.

Физическую выносливость изучали путём однократного помещения животных на тредмил (Treadmill System for rats, TSE, Германия). Скорость движения транспортерной ленты – 0,7 м/сек, угол наклона – 15°. Критерием полного утомления животного служило отсутствие реакции крысы на удар током 3 мА. Регистрировали время окончания бега в секундах, затем животное удаляли с транспортера.

3. Иммуноферментный анализ (ИФА) уровня

На 28 день исследования у крыс брали кровь, для отделения сыворотки пробы обрабатывали путём центрифугирования в режиме – 1000 об/мин 20 минут. Для определения концентрации провоспалительных цитокинов: интерлейкина (ИЛ) 1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и фактора некроза опухолей альфа (ФНО- α) использовали стандартные планшетные наборы ELISA, каталожные номера: SEA071Ra, SEA563Ra, SEA079Ra, SEA133Ra, производитель Cloud-Clone Corp (США). Результаты считывали с помощью фотометра Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) и программного обеспечения SkanIt™ Software (Thermo Fisher Scientific, США).

4. Гистологический анализ

На 29-й день после начала нанесения МЛФ животные подвергались эвтаназии путем усыпления углекислым газом в CO₂-боксе модели THF3481-V01 (производитель BIOSCAPE (EHRET), Германия). После эвтаназии у животных выделяли поражённый сустав. Образцы хранились в 10% нейтральном формалине забуференном до передачи в гистологическую лабораторию.

Гистологические препараты от всех животных были исследованы методом световой микроскопии (x100) после стандартной проводки, нарезания на ротационном микротоме и окраски гематоксилином-эозином.

Статистическую обработку результатов ДИ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., Ла-Хойя, Калифорния, США), различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 2:

Исследовательская работа проводилась по нескольким направлениям.

Во-первых, фармако-технологическая разработка состава и технологии МЛФ, при которой объектами исследования стали три АФС (мелоксикам, аденозин, иммуномодулятор М), а также ряд вспомогательных веществ (гелеобразователи, растворители, поверхностно-активные вещества – ПАВы). Технологические операции проводились как с использованием широко известного оборудования (мешалка с верхним приводом), так и на некоторых модельных приборах: виброкавитатор, прибор для измерения сопротивления упруго-пластичных материалов.

Во-вторых, осуществление контроля качества разрабатываемых составов с использованием современного аналитического оборудования методами ВЭЖХ.

В-третьих, постановка экспериментальной модели ОА и сравнительная оценка эффективности и профиля безопасности разрабатываемых МЛФ.

На всех этапах выполнения НИР использовались актуальные методы анализа: физико-химические, химические, микробиологические, фармакологические, статистические.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА СОСТАВА, ФАРМАКО- ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ МЛФ

3.1. Изучение свойств АФС

Разработка состава и технологии МЛФ, как правило, начинается и изучения физико-химических свойств действующих веществ (Рисунок 21).

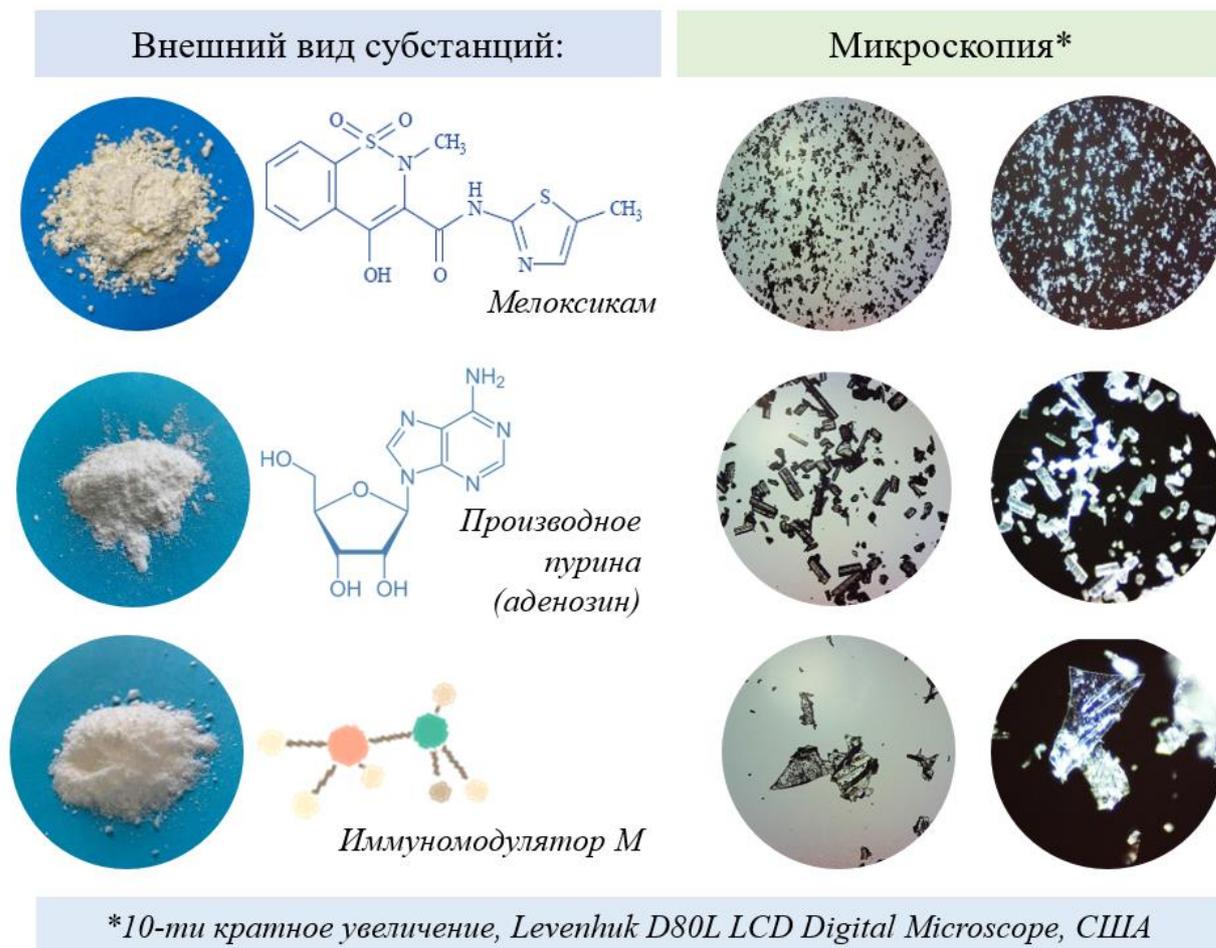


Рисунок 21 – Внешний вид АФС и их микроскопическое строение

Для определения оптимального способа введения действующих веществ в основу в соответствии с ГФ РФ XIV изд. ОФС.1.2.1.0005.15 «Растворимость» было проведено изучение растворимости АФС. Брали навески каждой из трех субстанций в количестве 1,0 г и добавляли по 1 мл растворителя до полного растворения при температуре $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$. В качестве потенциальных растворителей, помимо воды очищенной, рассматривали несколько веществ (Таблица 4).

Таблица 4 – Растворимость АФС

| Растворитель | Мелоксикам | Аденозин | Иммуномодулятор М |
|-----------------|------------|----------|-------------------|
| Вода очищенная | ПНП | Р | ЛР |
| ДМСО | ЛР | ЛР | ЛР |
| Пропиленгликоль | ОМР | МР | УР |
| Твин-80 | ПНР | ОМР | ОМР |

Примечание: ЛР – легко растворим, Р – растворим, УР – умеренно растворим, ОМР – очень мало растворим, ПНР – практически нерастворим.

Согласно полученным данным, в составе МЛФ было бы перспективно использовать ДМСО, поскольку в нём легко растворяются все три вещества. Однако в ходе проведения испытания была обнаружена несовместимость: при растворении иммуномодулятора М в ДМСО происходило окрашивание раствора в голубой цвет, что, вероятно, может быть связано с процессом окисления аминокислот, входящими в состав субстанции. Из указанного следует, что вводить ДМСО в состав разрабатываемой композиции не представляется возможным.

Аденозин и иммуномодулятор М являются водорастворимыми компонентами, что позволяет ввести их в состав гидрофильной основы в виде водного раствора или же непосредственно смешать с раствором гелеобразователя.

Мелоксикам практически нерастворим в воде, по результатам проведённых испытаний он также нерастворим в твин 80, мало растворим в пропиленгликоле. Для мелоксикама было проведено дополнительное исследование, в ходе которого установлено, что образец АФС помимо ДМСО, легко растворим в диметилформамиде (ДМФА) и в 10% растворе триэтаноламина (ТЭА). В таких веществах, как полиэтиленгликоль 400, твин 20, деканол, оливковое масло и олеиновая кислота мелоксикам практически нерастворим и образует суспензии с разным размером и количеством частиц.

Для мелоксикама методом лазерной дифракции было дополнительно проведено изучение размера частиц в пропиленгликоле, которое свидетельствовало о том, что основная масса частиц соответствует размерам около 10 мкм, что допустимо при разработке суспензионных МЛФ. На рисунке 22 представлено распределение частиц мелоксикама в суспензии с пропиленгликолем.

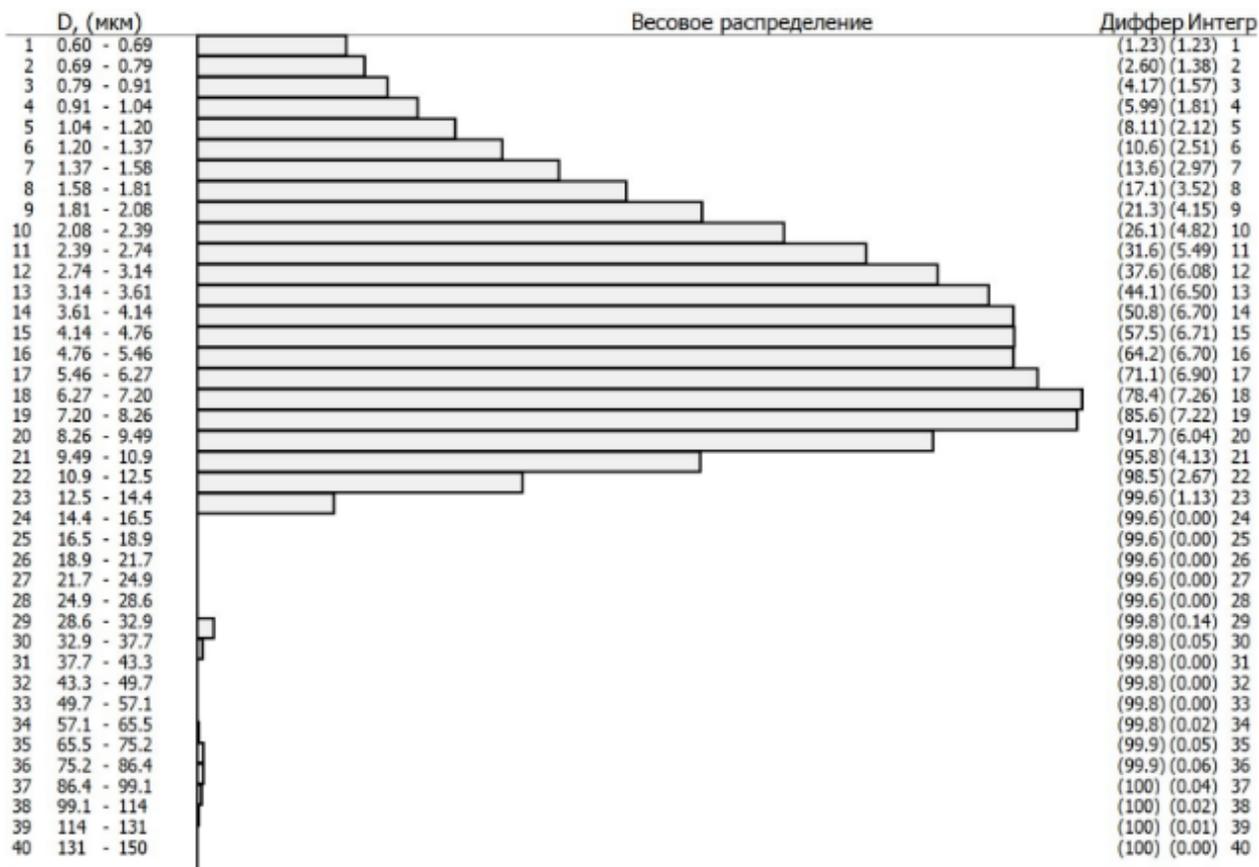


Таблица соответствия размеров частиц (D, мкм) заданным значениям весовых долей

| | | | | | | | | | | |
|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| D, мкм | 1.33 | 2.00 | 2.64 | 3.31 | 4.08 | 5.02 | 6.14 | 7.43 | 9.15 | 150 |
| P, % | 10.0 | 20.0 | 30.0 | 40.0 | 50.0 | 60.0 | 70.0 | 80.0 | 90.0 | 100 |

Рисунок 22 – График распределения частиц мелоксикама в пропиленгликоле

На основе полученных данных, было принято решение о разработке комбинированной лекарственной формы: геля на гидрофильной основе, включающего тонкую суспензию мелоксикама в пропиленгликоле и водный раствор, содержащий аденозин и иммуномодулятор М.

3.2. Выбор оптимального состава МЛФ.

В ходе фармацевтической разработки геля противовоспалительного базировались на том, что основообразующие вещества должны обладать приятными органолептическими свойствами (внешний вид, цвет, запах) и оптимальными структурно-механическими характеристиками (текучесть, распределяемость, вязкость), равномерно высвобождать лекарственные вещества, не обладать раздражающим действием и токсичностью, быть стабильными и микробиологически устойчивыми при хранении.

Подбор состава МЛФ проходил в несколько этапов, схематично представленных на рисунке 23.

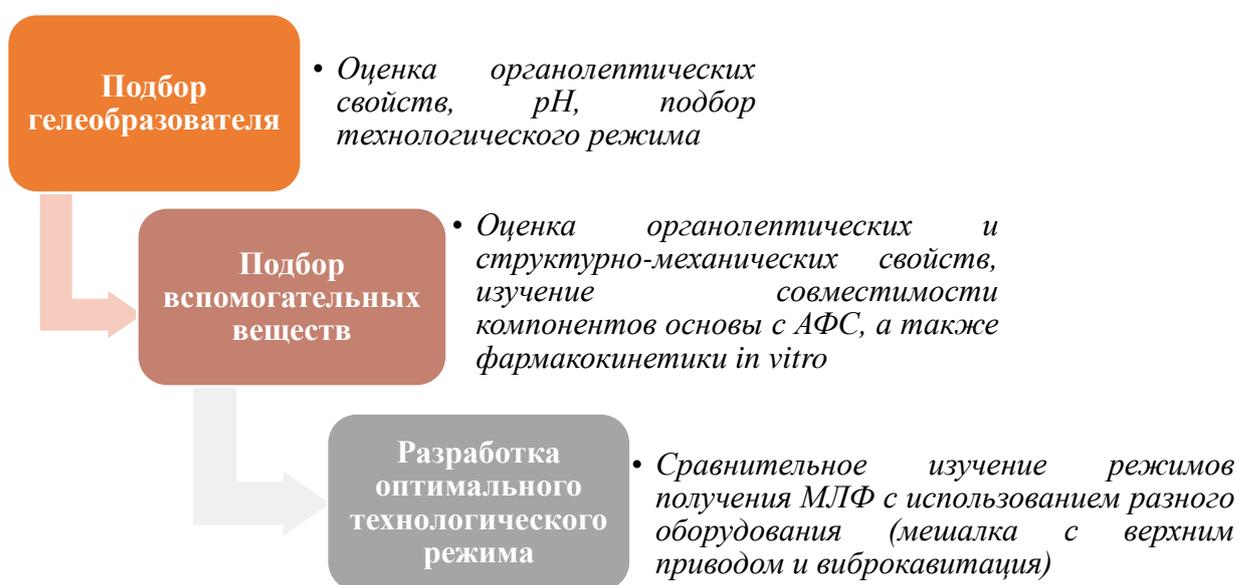


Рисунок 23 – Схема фармацевтической разработки состава и технологии трёхкомпонентной противовоспалительной МЛФ

3.2.1. Подбор гелеобразователя

Ввиду того, что на фармацевтическом рынке уже имеются гели мелоксикама на основе карбомера, было интересно рассмотреть иные гидрофильные основы, в частности, природного (альгинат натрия и ксантановая камедь) и полусинтетического происхождения – гидроксиэтилцеллюлоза.

Для каждого гелеобразователя рассматривали концентрации в диапазоне от 0,5% до 2% и два технологических режима. На основе сравнительной

характеристики полученных составов делали вывод о пригодности или непригодности полученных композиции для дальнейших исследований.

Испытуемые технологические режимы:

I режим – к навеске гелеобразователя приливали 40 мл холодной воды и оставляли набухать в течение 20 часов. После набухания тщательно перемешивали в ламинарном режиме (без образования пузырей).

II режим – отмеривали 40 мл горячей воды в мерный стакан (60-70°C) и устанавливали на мешалку. Включали мешалку (300 об/мин), навеску гелеобразователя вносили при перемешивании в образующуюся воронку порциями, таким образом, чтобы не образовывалось комков. При необходимости оставляли набухать в течение 60 мин.

Для всех гелеобразователей было обнаружено, что при концентрации 0,5% гели не обладали достаточной упругостью и стекали с поверхности кожи, в связи с чем полученные составы были исключены из дальнейших испытаний.

Гели ксантана с концентрацией 1%, независимо от режима получения, представляли собой мутные композиции желтоватого цвета, без запаха, обладающие достаточной упругостью и хорошо распределяющиеся на коже, что делало возможным их дальнейшее исследование.

Гели ксантана с концентрацией 2%, независимо от режима получения, были схожими с 1% составами, однако они тяжело распределились на коже и при нанесении ощущались частицы гелеобразователя, в связи с чем составы были признаны непригодными для разработки.

Композиции, содержащие ГЭЦ, представляли собой прозрачные гели с желтоватым оттенком, без запаха. При 1% концентрации составы растекались, при 2% содержании – обладали удовлетворительными свойствами. Для ГЭЦ режим I оказался не подходящим: гель плохо перемешивался и трудно гомогенизировался. В итоге было решено оставить только гель с 2% содержанием гидроксиэтилцеллюлозы, полученный с применением режима II.

Гели, содержащие альгинат натрия, по внешнему виду были прозрачными и бесцветными, обладали слабым характерным запахом, достаточной упругостью и способностью равномерно распределяться на коже. Независимо от концентрации альгината натрия: от 0,5 до 3,0% характер зависимости вязкости от скорости сдвига был одинаковым и напоминал реограмму течения неньютоновской жидкости. Для сравнительной характеристики составов были выбраны значения динамической вязкости при скорости 0,04 об/мин, при это значении для всех составов величина крутящего момента находилась в диапазоне от 10,0% до 100,0% (Рисунок 24).

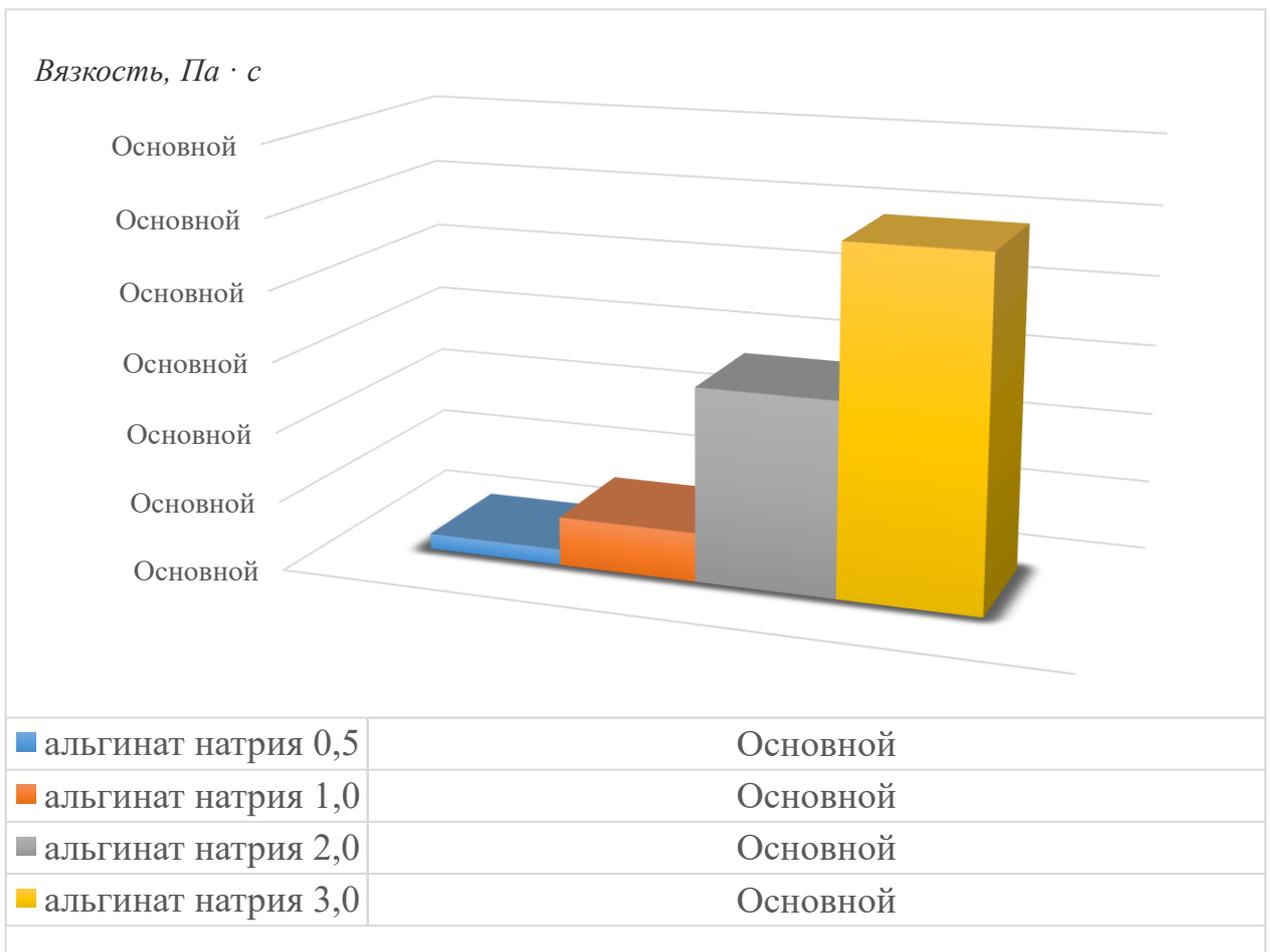


Рисунок 24 – Диаграмма значений динамической вязкости при скорости движения шпинделя CR-40 0,04 об/мин.

Раствор гелеобразователя с концентрацией альгината равной 3,0% оказался очень плотным и неудобным для нанесения. Наиболее приятной консистенцией обладал состав с содержанием альгината натрия 2%.

3.2.2. Определение pH растворов гелеобразователей

Согласно ГФ XIV издания, конкретные требования к pH МЛФ должны быть указаны в соответствующей фармакопейной статье или иной нормативной документации []. Требования ГОСТа 31695-2012 «Гели косметические. Общие технические условия» регламентируют то, что водородный показатель гелей, наносимых на кожу должен быть в диапазоне от 5,0 до 9,0 [].

С целью определения оптимального гелеобразователя было проведено потенциометрическое измерение pH растворов гелеобразователей путём погружения электрода непосредственно в испытуемый образец. В ходе анализа результатов исследования было выявлено, что режим получения значимо не влияет на водородный показатель, а с увеличением концентрации каждого гелеобразователя от 0,5 до 2,0% pH возрастает на 0,2 единицы (Таблица 5).

Таблица 5 – Значения pH растворов гелеобразователей

| Концентрация гелеобразователя | Режим получения | Значения pH | | |
|-------------------------------|-----------------|-------------|-----------|-----------------|
| | | Ксантан | Натросол | Альгинат натрия |
| 0,5 | I | 6,0 ± 0,1 | 6,1 ± 0,1 | 6,5 ± 0,1 |
| | II | 5,9 ± 0,2 | 6,2 ± 0,1 | 6,4 ± 0,1 |
| 1,0 | I | 6,2 ± 0,1 | 6,1 ± 0,2 | 6,7 ± 0,3 |
| | II | 6,3 ± 0,1 | 6,1 ± 0,3 | 6,7 ± 0,2 |
| 2,0 | I | 6,5 ± 0,1 | 6,0 ± 0,1 | 6,8 ± 0,2 |
| | II | 6,3 ± 0,2 | 6,3 ± 0,2 | 6,7 ± 0,2 |

Исследование показало, что все растворы гелеобразователей обладают приемлемым значением pH и не требуют подщелачивания.

Однако из химической структуры субстанций мелоксикам и аденозин видно, что данные вещества активнее при более высоких значениях pH. Таким образом, по результатам проведенных экспериментов в качестве

оптимального гелеобразователя для дальнейшей разработки МЛФ было решено оставить альгинат натрия.

3.2.3. Подбор вспомогательных веществ

В МЛФ вспомогательные вещества составляют более 90% и регулируют все основные свойства, в том числе полноту, скорость всасывания и фармакологическую активность лекарственных веществ.

Учитывая свойства выбранного гелеобразователя – альгината натрия, помимо пропиленгликоля, необходимого для суспензионного введения мелоксикама, дополнительно была рассмотрена возможность включения ПАВ: твин 80 и кремофор RH40.

С целью подбора оптимальной основы геля было изучено 9 составов с различной концентрацией ВВ (Таблица 6).

Таблица 6 – Составы гелевых основ, содержащих альгинат натрия

| Состав, % | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-----------------|-----------------|------|------|-----|------|------|-----|------|------|
| Натрия альгинат | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 |
| Пропиленгликоль | 5,0 | 10,0 | 10,0 | 5,0 | 10,0 | 10,0 | 5,0 | 10,0 | 10,0 |
| Твин 80 | 2,0 | 2,0 | - | 2,0 | 2,0 | - | 2,0 | 2,0 | - |
| Кремофор RH40 | - | 2,0 | - | - | 2,0 | - | - | 2,0 | - |
| Вода очищенная | <i>до 100,0</i> | | | | | | | | |

Составы, содержащие твин 80 (№ 1, 2, 4, 5, 7 и 8) обладали слабым желтоватым оттенком, в то время как №2, 6 и 9 были прозрачными. Составы № 1, 2 и 3 легко распределялись на коже, однако при этом не держали форму и растекались. Композиции №7, 8 и 9, наоборот, оказались очень вязкими и трудно распределялись на коже. Основы №4, 5 и 6 легко распределялись на коже, при этом сохраняли форму, благодаря чему 2% концентрация альгината натрия была определена как оптимальная.

Алгоритм получения основы: В соответствии с составами отвешивали необходимое количество компонентов основы. В стеклянный стакан отмеривали около 30 мл горячей воды очищенной (~50-60°C). стакан

устанавливали на мешалку с верхним приводом. При перемешивании на скорости около 550 об/мин в образующуюся воронку вносили навеску гелеобразователя, затем уменьшали скорость мешалки до 220-250 об/мин и оставляли состав на 30-40 минут до полного растворения гелеобразователя. Затем при перемешивании в соответствии с составами вносили остальные компоненты основы (пропиленгликоль, твин 80, кремофор RH 40), проверяли массу основы и при необходимости доводили её до 100,0 путём добавления воды очищенной. По результатам анализа состав №5 оказался самым приемлемым с точки зрения органолептических и реологических свойств.

Образец №1, содержащий альгинат натрия в концентрации 0,5% напоминает ньютоновскую жидкость, образец №2 демонстрирует более высокую степень структурированности, однако недостаточную для МЛФ.

Разработанные композиции №3 и №4, содержащие альгинат натрия в концентрации 2% без добавления и с добавлением вспомогательных веществ (состав №5) характеризуются достаточной тиксотропностью, о чём свидетельствует площадь поверхности, которая находится между восходящей и нисходящими кривыми реограмм течения. При этом стоит отметить, что включение в состав раствора гелеобразователя пропиленгликоля, твин 80 и кремофора RH 40 способствовало формированию более стабильного состава.

На рисунке 25 приведены результаты оценки структурно-механических свойств нескольких составов МЛФ, отличающихся концентрацией альгината натрия.

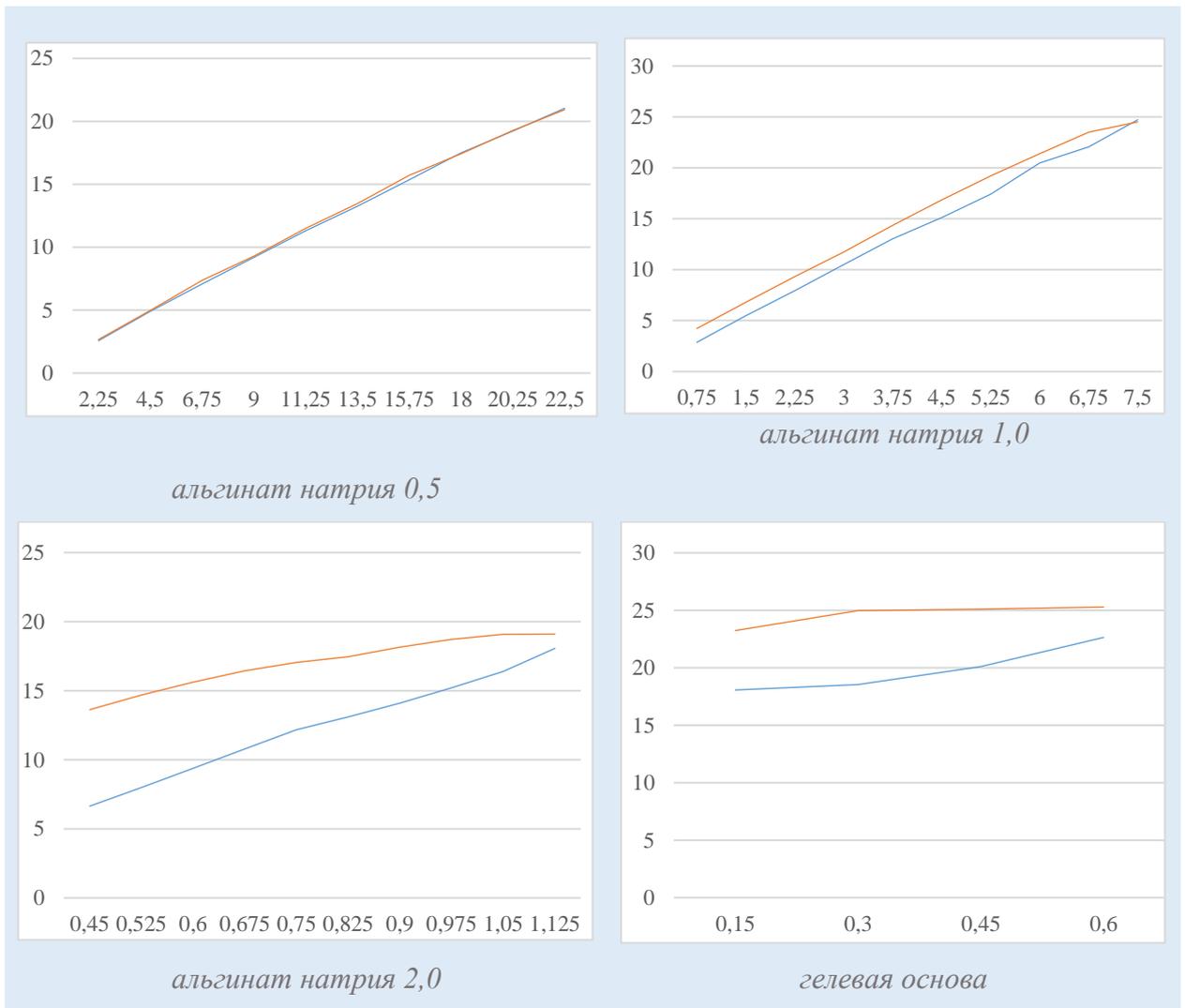


Рисунок 25 – График зависимости напряжения сдвига (*Shear stress*) по оси Y от скорости сдвига (*Shear rate*) по оси X для составов с разной концентрацией гелеобразователя

3.2.4. Разработка технологии получения комбинированного геля

На основе результатов изучения свойств АФС и гелеобразователя альгината натрия рассматривали несколько режимов получения МЛФ.

Режим 1. Компоненты смеси отвечивали в соответствии с составом. Субстанции аденозин и иммуномодулятор М помещали в емкость и растворяли в воде очищенной (примерно 2/3 от указанного количества). Полученный раствор устанавливали на мешалку. Задавали скорость вращения мешалки – 300 об/мин. При перемешивании вносили в емкость расчетное количество альгината натрия. Перемешивали до полного набухания и растворения альгината натрия.

К полученному раствору АФС и гелеобразователя добавляли рассчитанное количество кремофора RH40 и твин 80.

В отдельной емкости готовили суспензию мелоксикама в пропиленгликоле. Полученную суспензию вносили в емкость с раствором гелеобразователя. Добавляли оставшееся количество воды очищенной. Перемешивали до однородности (Гель 1).

Режим 2. Компоненты смеси отвешивали в соответствии с составом. В термостойком стакане нагревали воду очищенную (примерно 2/3 от рассчитанного количества) до температуры (50 – 60)°С. Емкость с нагретой водой очищенной устанавливали на мешалку. Задавали скорость вращения мешалки – 300 об/мин. При перемешивании вносили в емкость расчетное количество альгината натрия. Перемешивали до полного набухания и растворения альгината натрия.

К полученному раствору гелеобразователя добавляли рассчитанное количество кремофора RH40 и твин 80.

В отдельной емкости готовили суспензию мелоксикама в пропиленгликоле. Полученную суспензию вносили в емкость с раствором гелеобразователя.

В другой емкости готовили раствор аденозина и иммуномодулятора М в оставшемся количестве воды очищенной. Перемешивали до растворения компонентов. Полученный раствор вносили в емкость с раствором гелеобразователя и мелоксикама. Гель перемешивали до однородности (Гель 2).

Режим 3. Компоненты смеси отвешивали в соответствии с составом. В термостойком стакане нагревали воду очищенную (примерно 2/3 от рассчитанного количества) до температуры (50 – 60)°С. Емкость с нагретой водой очищенной устанавливали на мешалку. Задавали скорость вращения мешалки – 300 об/мин. При перемешивании вносили в емкость расчетное количество альгината натрия. Перемешивали до полного набухания и растворения альгината натрия.

К полученному раствору гелеобразователя добавляли рассчитанное количество кремофора RH40 и твин 80.

В отдельной емкости готовили суспензию мелоксикама в пропиленгликоле. Полученную суспензию вносили в емкость с раствором гелеобразователя.

В сухую чистую ступку помещали рассчитанное количество аденозина и иммуномодулятора М. АФС дополнительно растирали пестиком. Вносили раствор гелеобразователя и мелоксикама в ступку небольшими порциями при постоянном перемешивании. Добавляли оставшееся количество воды очищенной и снова перемешивали до однородности (Гель 3). Далее проводили сравнение полученных гелей (Таблица 7).

Таблица 7 – Сравнительная оценка гелей

| Показатели | Гель 1 | Гель 2 | Гель 3 |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Цвет | Желтый | Желтый | Желтый |
| Прозрачность | Непрозрачный | Непрозрачный | Непрозрачный |
| Однородность | Однородный | Однородный | Однородный |
| Запах | Слабый, характерный | Слабый, характерный | Слабый, характерный |
| Растекаемость | Не растекается, упругий | Не растекается, упругий | Не растекается, упругий |
| Распределение на коже | Легко распределяется | Легко распределяется | Легко распределяется |
| pH | 6,4 ± 0,3 | 6,2 ± 0,2 | 6,5 ± 0,3 |

Существенных отличий между гелями, полученными по разным технологиям, выявлено не было. В качестве оптимального был рекомендован технологический режим №3, который включал меньшее количество операций, что будет способствовать его воспроизводимости как в условиях лаборатории, так и на производстве.

Технологическая схема получения геля представлена на рисунке 26.

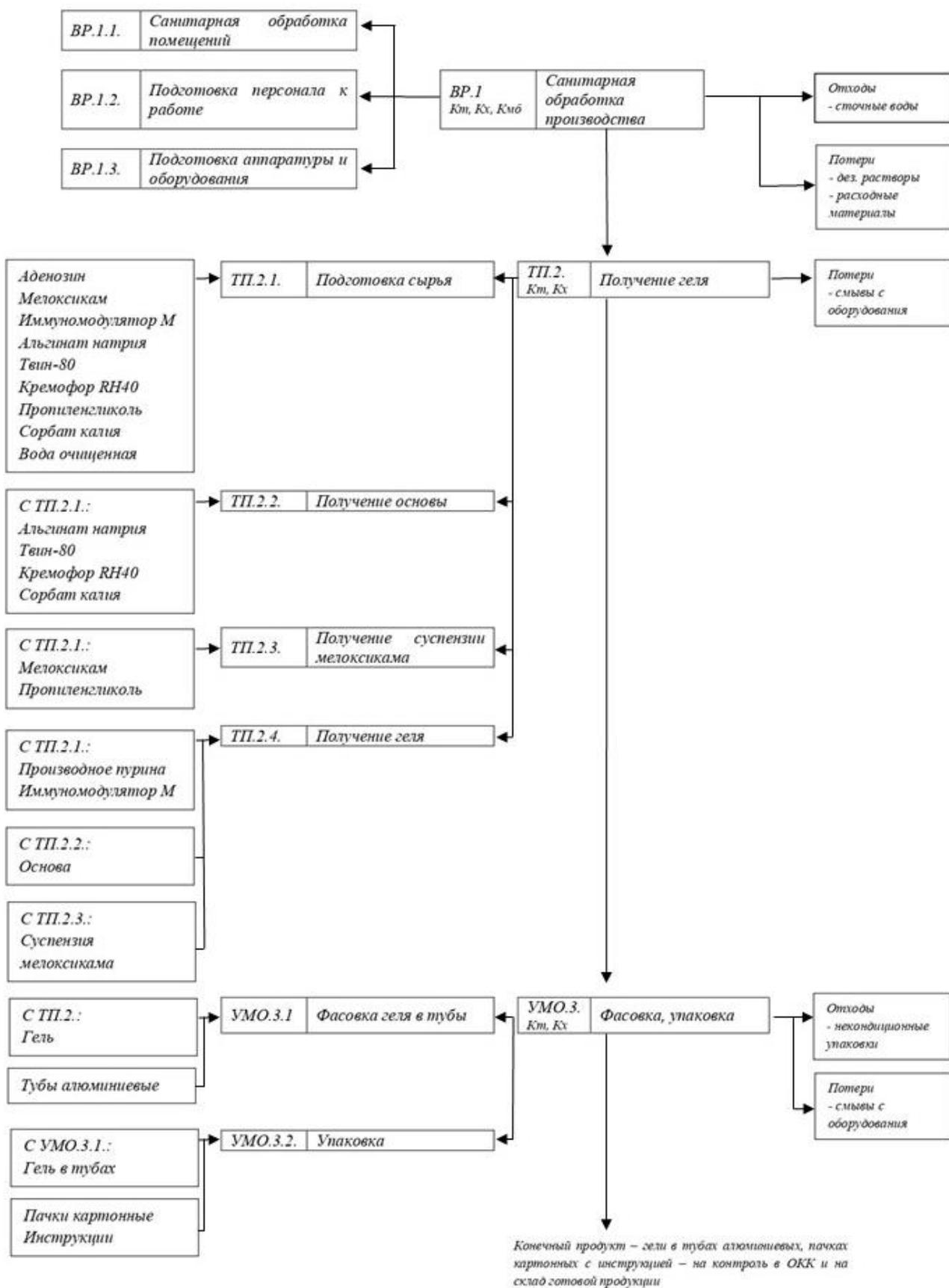


Рисунок 26 – Технологическая схема получения комбинированного геля

На основании комплексных исследований разработан состав геля при следующем соотношении компонентов:

| | |
|-------------------|-------|
| Мелоксикам | 0,5 |
| Аденозин | 3,0 |
| Иммуномодулятор М | 5,0 |
| Альгинат натрия | 2,0 |
| Пропиленгликоль | 10,0 |
| Твин 80 | 2,0 |
| Кремофор RH40 | 2,0 |
| Сорбат калия* | 0,2 |
| Вода очищенная до | 100,0 |

**Примечание: добавление сорбата калия обусловлено результатами микробиологических исследований*

3.3. Технологический контроль качества

3.3.1. Исследование размера частиц суспензионной фазы мелоксикама

Методом лазерной дифракции была проведена сравнительная оценка распределения частиц мелоксикама по размерам в среде пропиленгликоля, а также и в составе комбинированной МЛФ.

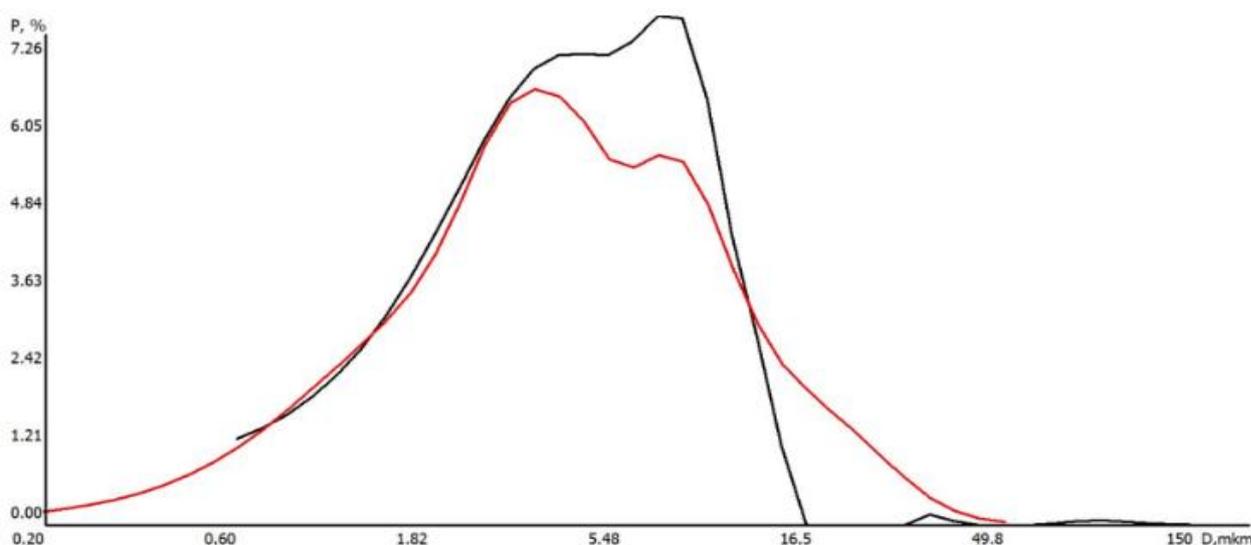


Таблица соответствия размеров частиц (D, мкм) заданным значениям весовых долей

| | | | | | | | | | | |
|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| образец 8 (мелоксикам + пропиленгликоль) 09.02 УЗ 100 Вт | 1.33 | 2.00 | 2.64 | 3.31 | 4.08 | 5.02 | 6.14 | 7.43 | 9.15 | 150 |
| Гель 1 (мешалка с верхним приводом) | 1.07 | 1.77 | 2.45 | 3.12 | 3.91 | 4.96 | 6.48 | 8.46 | 12.3 | 50.0 |
| P, % | 10.0 | 20.0 | 30.0 | 40.0 | 50.0 | 60.0 | 70.0 | 80.0 | 90.0 | 100 |

Рисунок 27 – Характеристика размера частиц мелоксикама

В геле не наблюдалось укрупнения частиц мелоксикама, что подтверждает рациональность его введения совместно с пропиленгликолем.

Согласно полученным результатам, основная доля частиц мелоксикама, как в геле, так и в пропиленгликоле, находилась в диапазоне размеров до 50 мкм, в то время как по требованиям ГФ РФ XIV издания размер частиц суспензионной фазы в МЛФ не должен превышать 100 мкм.

3.3.2. Исследование мембранной проницаемости

Для двух образцов МЛФ (1 – гелевая основа + мелоксикам; 2 – раствор альгината натрия 2% + мелоксикам) было проведено сравнительное

исследование фармакокинетики *in vitro* с использованием вертикальной диффузионной ячейки Франца.

На основе полученных УФ спектров, по закону Бугера-Ламберта-Бэра была рассчитана концентрация мелоксикама в каждой пробе эксперимента. При расчете концентрации учитывались потери вещества, возникающие после каждого отбора пробы. Отношение массы мелоксикама в пробах, в момент времени, к исходной массе мелоксикама в донорной камере было выражено в процентном соотношении (рисунок 28).

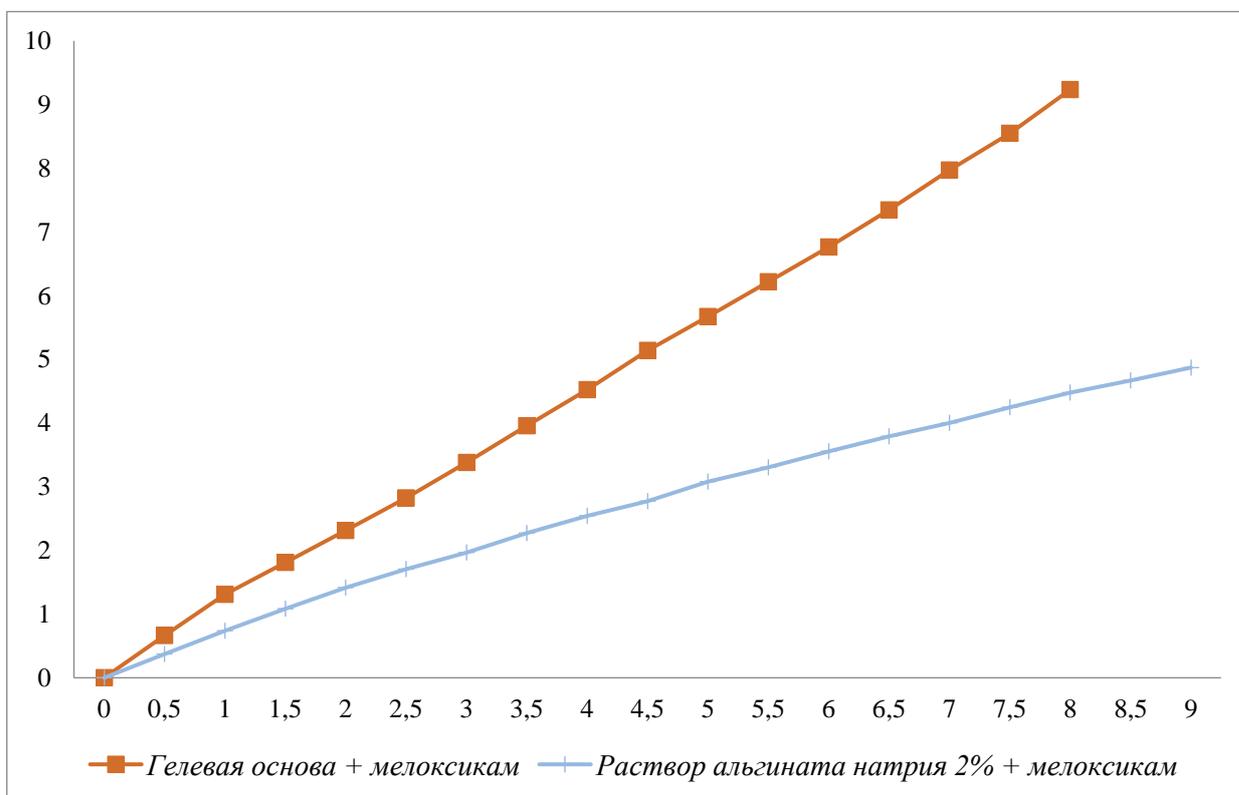


Рисунок 28 – Массовая доля мелоксикама прошедшего через мембрану из образца гелевой основы (со вспомогательными веществами) и раствора альгината натрия 2%

Полученные данные свидетельствуют о том, что за 9 часов через синтетическую мембрану проходит около 10% массы мелоксикама. Лучшие трансмембранные свойства демонстрировал образец гелевой основы, содержащий, помимо альгината натрия, вспомогательные вещества: пропиленгликоль, твин 80 и кремофор RH40 (состав №5).

3.3.3. Исследование структурно-механических свойств МЛФ

Включение действующих веществ в состав гелевой основы способствовало повышению вязкости при сохранении структурированности системы. На рисунке 29 представлена кривая течения разработанного геля при нескольких температурах:

- а) 20°C – при хранении при комнатной температуре;
- б) 32°C – температура поверхности кожи, на которую будет наноситься трёхкомпонентная МЛФ.

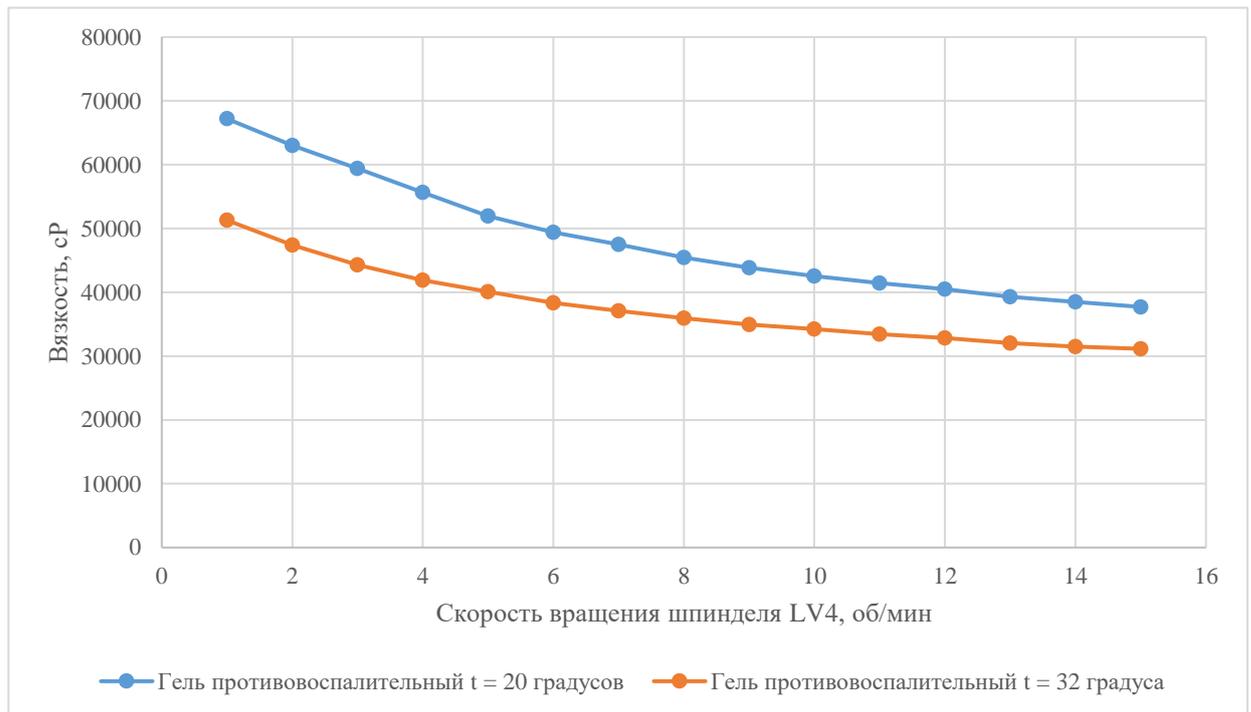


Рисунок 29 – Зависимость динамической вязкости МЛФ от скорости вращения шпинделя

При увеличении температуры вязкость образца снижалась, после охлаждения до 20°C достигала первоначальных значений, следовательно, система обладает тиксотропными свойствами.

Наряду с изучением вязкости составов была проведена дополнительная оценка структурно-механических свойств, а именно измерение сопротивления, обусловленного внутренней структурой упруго-пластичных материалов. Величина предела текучести может рассматриваться как «структурная вязкость» [88].

На рисунке 30 отражены результаты измерения напряжения гелей. Анализ полученных данных показал, что разработанный гель имеет меньшее напряжение сопротивления и предел текучести, что связано с природой используемого гелеобразователя (альгинат натрия в разработанном геле, карбомер в геле Амелотекс®).

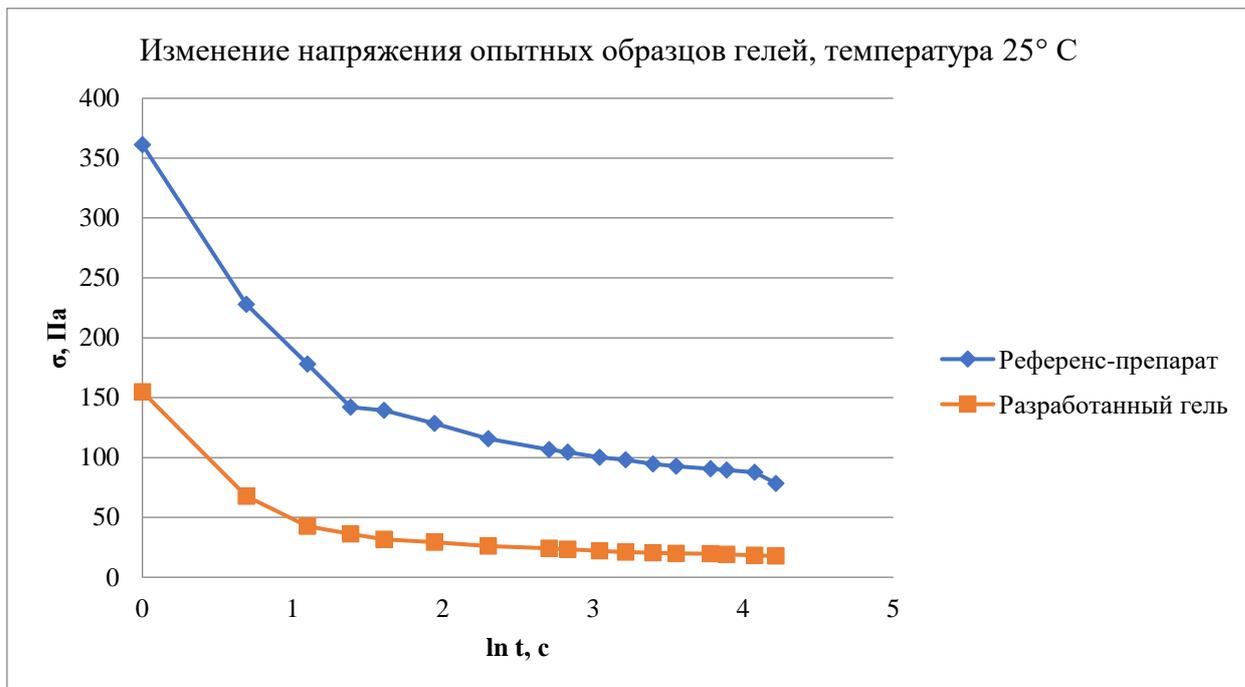


Рисунок 30 – Результаты измерения напряжения опытных образцов гелей (референс-препарат – Амелотекс® гель, 1 %). По оси ординат – напряжение в Па, по оси абсцисс – $\ln t$, с.

Кроме того, разработанный гель имеет меньший период полурелаксации – около 11 секунд, в то время, как у референтного препарата наблюдалось восстановление на 50% за 17 секунд.

Такие свойства МЛФ позволяют сделать вывод о том, что данный гель обладает более мягкой консистенцией и будет удобен для применения: состав легче распределяется на коже, не вызывает затруднений при извлечении из первичной упаковки.

3.4. Сравнительная оценка аппаратного оформления в технологии МЛФ. Виброкавитационный гомогенизатор

Согласно литературным данным кавитационная обработка представляет интерес с точки зрения её включения в технологию МЛФ.

Нами было предположено, что виброкавитация может способствовать модификации ряда параметров, представленных на рисунке 31.



Рисунок 31 – Предполагаемые эффекты, наблюдаемые после виброкавитационной обработки МЛФ

1. Влияние режима виброкавитационной обработки на структурно-механические свойства образцов МЛФ

Методика эксперимента: на верхнеприводной мешалке было получено 700,0 гелевой основы (состав №5, Таблица 6), которую разделили равные части по 100,0 и в каждую порцию внесли мелоксикам в концентрации 0,5%. Один образец (№7) обработали на мешалке с верхним приводом в режиме 250 об/мин 5 мин. Остальные 6 образцов были направлены на виброкавитационную обработку в режиме 2500 об/мин и частоте вращения ротора около 45 Гц в течение 2, 5 и 10 минут, а также при 5000 об/мин и частоте вращения ротора около 90 Гц в течение 2, 5 и 10 минут.

На следующий день путём измерения динамической вязкости проводили сравнительную оценку структурно-механических свойств образцов. Диапазон

скоростей сдвига подбирался на основе значений крутящего момента, который должен был находиться в диапазоне от 10 до 100%.

На рисунке 32 отражены результаты, свидетельствующие о том, что длительная обработка основы в режиме: 5000 об/мин 10 минут приводит к повышению вязкости состава, что может быть связано с потерей воды, ввиду нагревания смеси.

Реологические данные по образцам №3 и №4 свидетельствуют о том, что краткосрочная 2-х-минутная обработка состава на максимальной скорости – 5000 об/мин даёт эффект, схожий с более длительной 10-минутной обработкой на скорости 2500 об/мин.

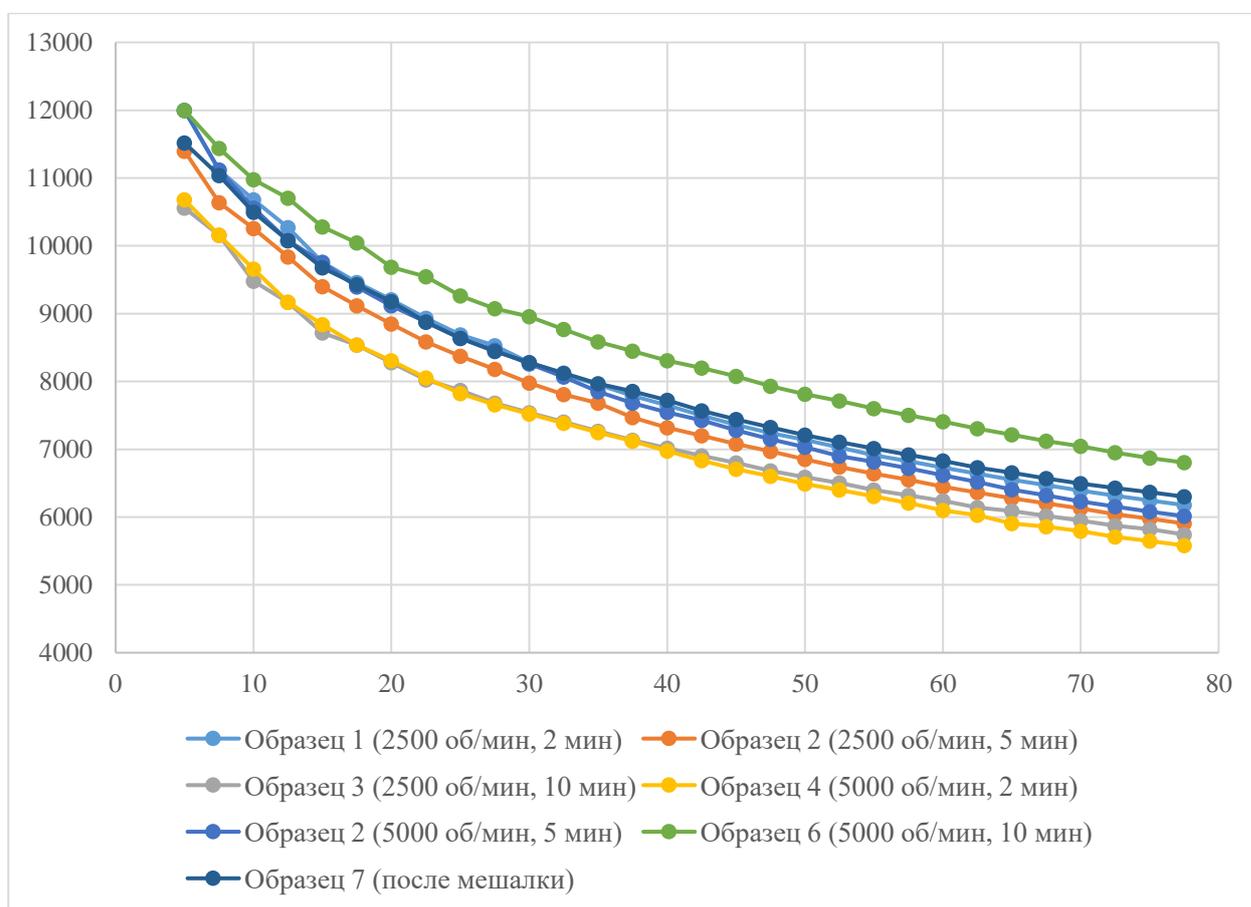


Рисунок 32. Зависимость вязкости МЛФ от скорости вращения шпинделя LV4

2-х минутная обработка на скорости 2500 об/мин и 5-ти минутная на скорости 5000 об/мин не приводят к возникновению отличий по сравнению с первоначальным составом, полученным на мешалке с верхним приводом.

Таким образом, для снижения значения вязкости и получения более структурированных гомогенных систем можно рекомендовать режим обработки 2500 об/мин – 10 минут (образец №3) или 5000 об/мин – 2 минуты (образец №4).

2. Влияние режима виброкавитационной обработки на размер частиц суспензионной фазы (мелоксикама)

Образцы №1-7 полученные с применением разных технологических режимов оценивали по параметру распределения размера частиц методом лазерной дифракции.

Измерения производили в диапазоне до 150 мкм, при включённом УЗ с частотой 100 кГц, без добавления фосфатного буфера рН = 7,4, ввиду того, что при предварительных исследованиях наблюдалось растворение частиц мелоксикама. УЗ обработка повышала стабильность суспензии и её включение на 60 секунд во время пробы не оказывало влияние на результаты исследования, поэтому использовали обработку с средней частотой – 50 кГц.

На рисунке 33 представлена диаграмма распределения частиц в зависимости от аппаратного оформления: верхнеприводная мешалка и виброкавитатор.

Было обнаружено, что виброкавитация, по сравнению с верхнеприводной мешалкой, способствует сужению диапазона распределения частиц, при этом максимальные размеры суспензионной фазы составляют не более 17 мкм, одновременно наблюдается увеличение доли частиц, находящихся в диапазоне 0,2 до 1,5 мкм.

При изучение разных скоростей и времени виброкавитационной обработки значимых отличий в распределении частиц выявлено не было (Рисунок 34). Полученные результаты позволяют рекомендовать краткосрочную высокоскоростную обработку, как более выгодную с экономической точки зрения.

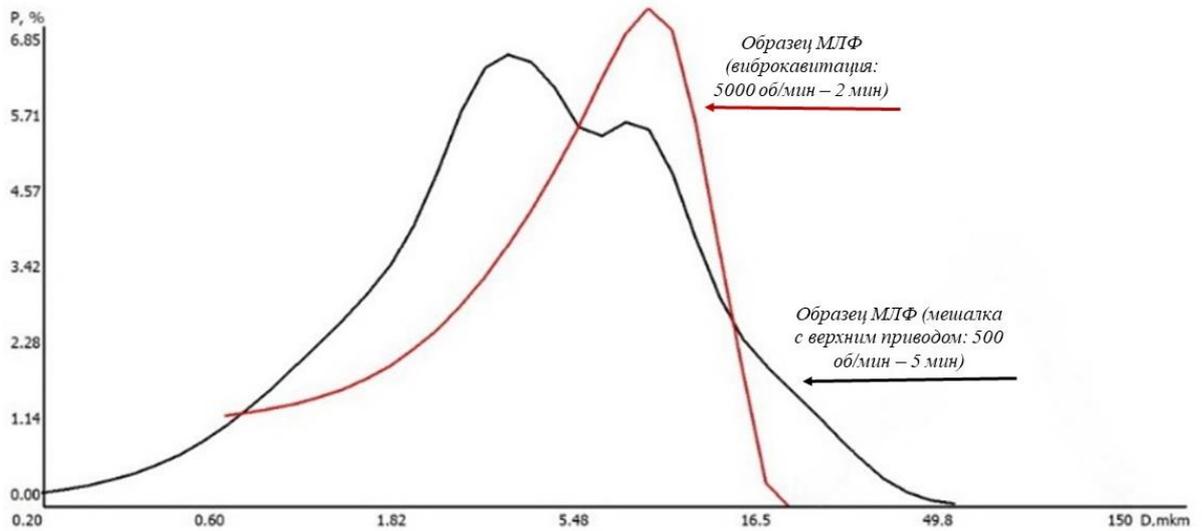


Рисунок 33 – Диаграмма распределения частиц мелоксикама в составах МЛФ, путём обработки на мешалке с верхним приводом и с использованием виброкавитатора

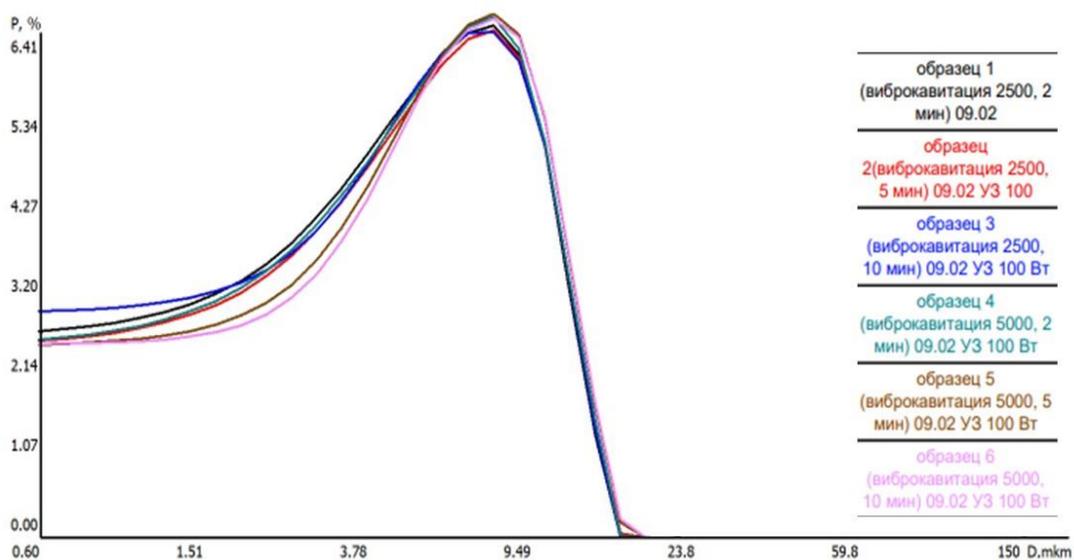


Рисунок 34 – Сравнительный анализ распределения частиц при использовании разных режимов виброкавитационной обработки

3. Влияние режима виброкавитационной обработки на мембранную проницаемость мелоксикама

Виброкавитация является методом гомогенизации при котором, как показали предыдущие эксперименты, возможно изменение характера распределения частиц по размерам, а, следовательно, за счёт микронизации и повышение их мембранной проницаемости.

Сравнительное исследование мембранной проницаемости было проведено с использованием ячейки Франца с включением в анализ двух образцов МЛФ, полученных с применением верхнеприводной мешалки и виброкавитатора, содержащих мелоксикам (как компонент с наиболее неблагоприятным биофармацевтическим профилем).

Результаты (Рисунок 35) свидетельствовали о схожем профиле пролонгированного высвобождения, обусловленного, в первую очередь, типом выбранной основы.

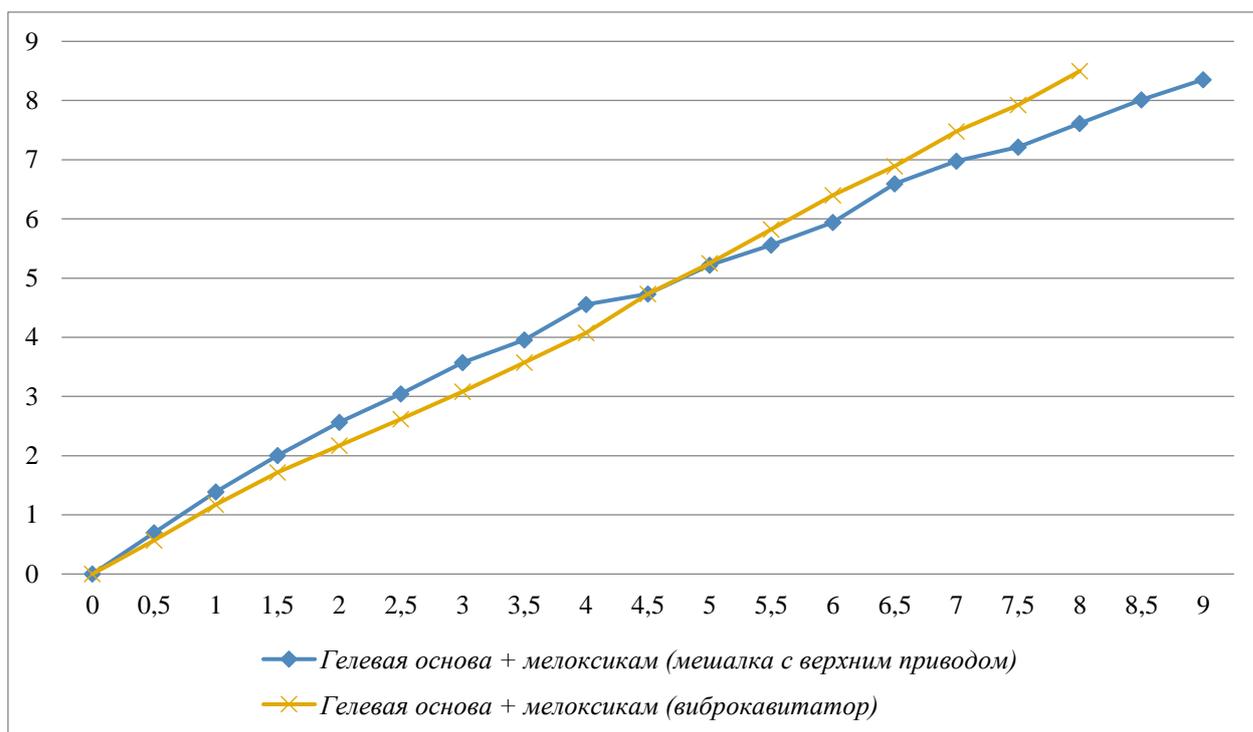


Рисунок 35 – Массовая доля мелоксикама прошедшего через мембрану из образца МЛФ, полученных на мешалке с верхним приводом и с помощью виброкавитатора

4. Влияние режима виброкавитационной обработки на микробиологические параметры

Виброкавитационная обработка, помимо механического воздействия, сопровождается ультразвуковым, что важно с точки зрения повышения микробиологической чистоты образцов МЛФ.

Сравнительный анализ показал, что образец №1, полученный на мешалке с верхним приводом, и образец №2, обработанный на виброкавитаторе по показателю «микробиологическая чистота» соответствовали требованиям ГФ РФ IV (Категория II – для применения местно, наружно, интравагинально). категории (Таблица 8).

Таблица 8 – Микробиологическая чистота гели

| Образцы | Рекомендуемые нормы | Количество колоний на МПА | Количество колоний на Сабуро | Рост на среде №3 | Рост на среде №8 |
|-----------------------|--|---------------------------|------------------------------|------------------|------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| №1 | КАТЕГОРИЯ 2 1. Общее число аэробных бактерий и грибов (суммарно) – не более 10^2 в 1г или в 1мл 2. Отсутствие энтеробактерий и других Гр ⁻ бактерий 3. Отсутствие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1г или в 1мл) 4. Отсутствие <i>Staphylococcus aureus</i> в 1г или в 1мл | 2 | 1 | - | - |
| Общее микробное число | | 30 | | | |
| №2 | КАТЕГОРИЯ 2 | 1 | - | - | - |
| Общее микробное число | | 10 | | | |

Примечание: Отсутствие роста на питательных средах

При анализе антимикробной активности, было установлено, что оба образца обладали антимикробным действием к Гр⁺ и Гр⁻ микроорганизмам *S. aureus* ATCC 6538-P и *E. coli* ATCC 25922 в концентрации от 100 000 микробных клеток (Таблица 9).

При этом оба состава оказались не активными к грибам рода *Candida* ATCC 10231, на основе чего было решено добавить в состав геля консервант – сорбат калия.

Таблица 9 – Антимикробная активность гелей

| Тест штаммы | Микробная нагрузка (КОЕ мл/мг) | | | | | |
|------------------------------------|--|------------|------------------|----------------------|-------------------|-------------------------|
| | 500.000 | | 100.000 | | 50.000 | |
| | образец №1 | образец №2 | образец №1 | образец №2 | образец №1 | образец №2 |
| | диаметр зоны задержки роста вокруг лунки | | | | | |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | + | + | 10,07± 1,12мм | от 12, 31± 0,98мм | 18,42± 1,01 мм | от 19,15 ± 1,13мм |
| <i>S. aureus</i> ATCC 6538-P | + | + | 8,52± 1,02 мм | 12,39±0,8 7мм | 17,91± 1,39мм | 20,05± 0,93 мм |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | + | + | + | + | + | + |

Примечание «+» показывает сплошной рост микроорганизмов

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3:

В результате комплексных исследований, основанных на применении физико-химических, технологических, структурно-механических, биофармацевтических подходов, был обоснован качественный и количественный состав МЛФ, включающей 0,5 мелоксикама, 3,0 аденозина, 5,0 иммуномодулятора М, 2,0 альгината натрия, 2,0 твин 80, 2,0 кремофор РН40, 10,0 пропиленгликоля, 0,2 сорбата калия и воду очищенную до 100,0.

Исследования реологических параметров, характера распределения частиц, а также мембранной проницаемости суспензионного компонента – мелоксикама показали рациональность использования выбранных вспомогательных веществ, обеспечивающих оптимальные характеристики составов: система характеризуется стабильностью, тиксотропность, пролонгированным высвобождением действующих веществ.

Была предложена технологическая схема получения комбинированной МЛФ, на основе использования мешалки с верхним приводом.

Разносторонняя сравнительная оценка аппаратного оформления технологии геля показала, что включение стадии виброкавитации позволяет модифицировать распределение размера частиц в суспензионных составах, а также характеризуется тенденцией к повышению микробиологической чистоты. При этом влияние виброкавитации на реологические и биофармацевтические характеристики разработанного геля сопоставимы между собой, что позволяет в дальнейшем использовать оба подхода.

В дальнейшем можно рекомендовать использовать виброкавиционную обработку как на стадии гомогенизации готового продукта (суспензии или эмульсии), так и на этапе обработки основы для МЛФ.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ГЕЛЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО

Как уже было показано ранее (Глава 2), АФС, входящие в состав МЛФ, обладают разными свойствами, в частности, отличаются по полярности, что отразилось на процессе разработки методов качественного и количественного анализа.

Не удалось предложить методику совместного одновременного определения трёх действующих веществ, поэтому проводилось два хроматографических анализа.

1. Условия хроматографирования мелоксикама

Аналитические ВЭЖХ хроматограммы, вместе с УФ-спектрами, были получены на жидкостном хроматографе Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония) с колонкой Supelcosil C18 (250 x 4,6, 5 мкм), оснащённым диодно-матричным детектором SPD-M20A.

Условия аналитической хроматографии представлены в таблице 10: подвижная фаза А - 0,1% об. ТФУ в сверхчистой H₂O; подвижная фаза В - 0,1% об. ТФА в ацетонитриле класса "для ВЭЖХ", скорость подвижной фазы составляла 1 мл/мин.

Таблица 10 – Условия аналитической ВЭЖХ мелоксикама

| Состав подвижной фазы, %В | Время, мин. |
|---------------------------|-------------|
| 5 | 0 |
| 5 | 5 |
| 100 | 45.75 |
| 100 | 50 |
| 5 | 60 |
| 5 | 65 |

На рисунке 36 представлены хроматограммы СО мелоксикама и комбинированной МЛФ. Совпадение времен удерживания (29,36 мин) является критерием подлинности одного из компонентов геля.

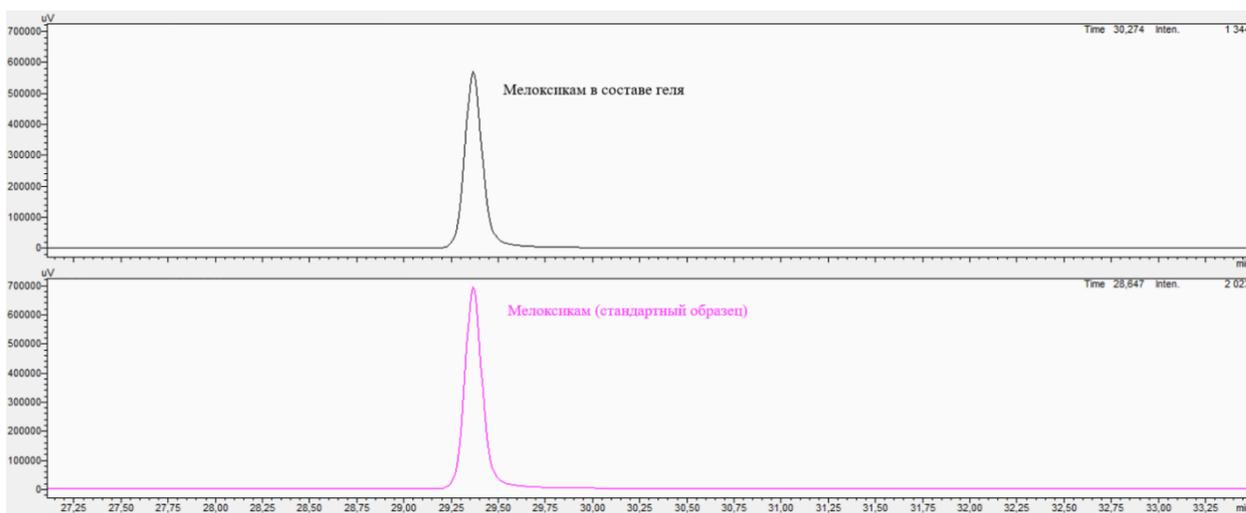


Рисунок 36 – Хроматограмма СО мелоксикама и МЛФ

2. Условия хроматографирования аденозина и иммуномодулятора М

Оценку подлинности и количественного содержания аденозина и иммуномодулятора М проводили совместно.

Аналитические ВЭЖХ хроматограммы, вместе с УФ-спектрами, были получены на жидкостном хроматографе Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония) с колонкой Supelcosil LC-NH₂ (250 x 4,6, 5 мкм), оснащенный диодно-матричным детектором SPD-M20A. Условия аналитической хроматографии представлены в таблице 2: подвижная фаза – 0,1% об. ТФУ в сверхчистой H₂O, скорость подвижной фазы составляла 1 мл/мин, время элюирования составило 25 минут. Хроматограммы СО и МЛФ представлены на рисунке 37.

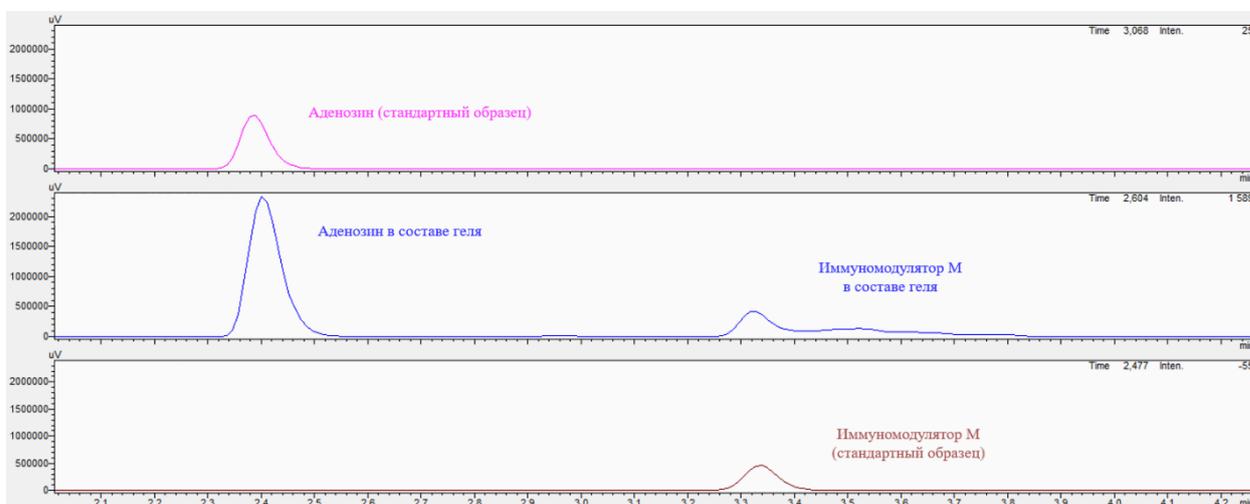


Рисунок 37. Хроматограммы геля и СО аденозина и иммуномодулятора М.

3. Изучение стабильности геля, разработка проекта спецификации качества

Одним из важных показателей МЛФ является способность сохранять свою физическую стабильность, химические свойства, микробиологическую чистоту, а также индифферентность к упаковке при длительном хранении и использовании.

Для разработанного состава в течение 1 года была проведена комплексная оценка стабильности, включающая определение таких показателей, как описание, подлинность, масса содержимого упаковки, размер частиц суспензионной фазы, рН, микробиологическая чистота и количественное определение. На основе полученных результатов (Таблица 12), был предложен проект спецификации качества геля противовоспалительного (Таблица 13).

На рисунке 38 показан пример упаковки и маркировки комбинированной МЛФ в тубы алюминиевые.

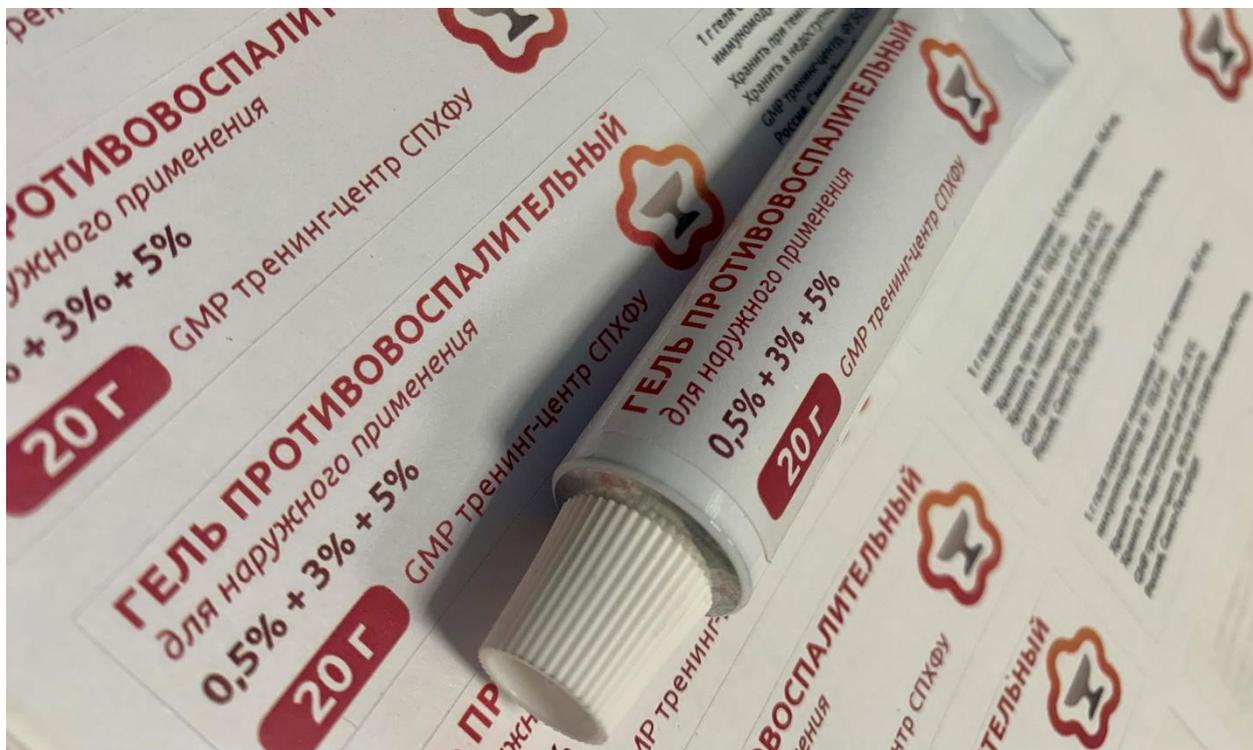


Рисунок 38 – Пример упаковки и маркировки разработанной МЛФ

Таблица 12 – Результаты изучения стабильности геля противовоспалительного

| <i>Показатели</i> | <i>Нормы</i> | <i>Результаты исследования</i> | | | | |
|----------------------------------|--|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | <i>0</i> | <i>3 мес</i> | <i>6 мес</i> | <i>9 мес</i> | <i>12 мес</i> |
| Описание | Однородный, непрозрачный гель светло-жёлтого цвета с зеленоватым оттенком и слабым запахом эфирных масел | соответствует | соответствует | соответствует | соответствует | соответствует |
| Подлинность | Время удерживания пиков геля противовоспалительного должно соответствовать временам удерживания стандартных образцов мелоксикама, аденозина и иммуномодулятора М | соответствует | соответствует | соответствует | соответствует | соответствует |
| Масса содержимого упаковки | От 18,0 до 20,00 | 19,2 ± 0,1 | 19,2 ± 0,1 | 19,2 ± 0,1 | 19,0 ± 0,2 | 19,0 ± 0,2 |
| Размер частиц суспензионной фазы | Не более 100 мкм | не более 50 мкм | не более 50 мкм | не более 55 мкм | не более 55 мкм | не более 55 мкм |

| | | | | | | |
|----------------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| pH | От 5,5 до 7,0 | $6,80 \pm 0,01$ | $6,81 \pm 0,01$ | $6,80 \pm 0,01$ | $6,8 \pm 0,01$ | $6,8 \pm 0,01$ |
| Микробиологическая чистота | Вторая категория чистоты, соответствующая препаратам местного применения. | соответствует | соответствует | соответствует | соответствует | соответствует |
| Количественное определение | Содержание мелоксикама (%) должно быть от 0,497 до 0,503 в 100,0 геля | $0,501 \pm 0,001$ | $0,501 \pm 0,001$ | $0,500 \pm 0,001$ | $0,500 \pm 0,001$ | $0,500 \pm 0,001$ |
| | Содержание аденозина (%) должно быть от 2,997 до 3,003 в 100,0 геля | $3,001 \pm 0,001$ | $3,001 \pm 0,001$ | $3,000 \pm 0,001$ | $3,000 \pm 0,001$ | $2,999 \pm 0,001$ |
| | Содержание иммуномодулятора М (%) должно быть от 4,995 до 5,005 в 100,0 геля | $5,000 \pm 0,001$ | $5,000 \pm 0,001$ | $5,000 \pm 0,001$ | $4,999 \pm 0,001$ | $4,999 \pm 0,002$ |

Таблица 13 – Проект спецификации геля противовоспалительного

| № | Показатели | Методы | Нормы |
|----|----------------------------------|--|---|
| 1 | Описание | Визуальный | Однородный, непрозрачный гель светло-жёлтого цвета с зеленоватым оттенком и слабым запахом эфирных масел |
| 2 | Подлинность | ВЭЖХ | Время удерживания пиков геля противовоспалительного должно соответствовать временам удерживания стандартных образцов мелоксикама ($29,36 \pm 0,02$), аденозина ($2,5 \pm 0,1$) и иммуномодулятора М ($3,5 \pm 0,1$) |
| 3 | Масса содержимого упаковки | ГФ РФ | В соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0007.15 |
| 4 | Водородный показатель (рН) | ГФ РФ | От 5,5 до 7,0 |
| 5 | Размер частиц суспензионной фазы | Метод лазерной дифракции или микроскопически | Не более 100 мкм |
| 6 | Микробиологическая чистота | ГФ РФ | Вторая категория чистоты, соответствующая препаратам местного применения. |
| 7 | Количественное определение | ВЭЖХ | Содержание мелоксикама должно быть от 0,4975 до 0,5025 в 100,0 геля Содержание аденозина должно быть от 2,997 до 3,003 в 100,0 геля Содержание иммуномодулятора М должно быть от 4,995 до 5,005 в 100,0 геля |
| 8 | Упаковка | По 20, 30 и 50 г. геля в тубы алюминиевые. Каждую тубу вместе с инструкцией по применению помещают в пачку из картона. | |
| 9 | Маркировка | В соответствии с НД | |
| 10 | Срок годности | 1 год | |

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4:

Ввиду невозможности совместного определения трёх действующих веществ, было разработано 2 методики ВЭЖХ анализа, одна из которых позволяет осуществлять качественный и количественный анализ мелоксикама, а вторая – одновременно определять аденозин и иммуномодулятор М.

Исследования стабильности в течение 1 года наблюдения свидетельствуют о неизменности свойств и характеристик образцов МЛФ. На основе полученных результатов был предложен проект спецификации качества.

В качестве упаковки для геля рекомендованы тубы алюминиевые, обеспечивающие сохранность геля и препятствующие высыханию основы.

ГЛАВА 5. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ГЕЛЯ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО

Важной составляющей научно-исследовательской работы стало проведение двух блоков ДИ, целью которых стало, во-первых, определение оптимальной дозировки каждого действующего вещества: аденозина, иммуномодулятора М и мелоксикама в составе комбинированного геля, и, во-вторых, изучение эффективности и безопасности комбинированной МЛФ в сравнении с референтным препаратом Амелотекс® гель 1%.

Поэтапная схема проведённых исследований представлена на рисунке 39.

Блок 1: Определение оптимальных дозировок действующих веществ и оценка противовоспалительной активности МЛФ

Ранее не изучалась комбинация выбранных действующих веществ, в связи с чем было необходимо рассмотреть её активность на доклинической модели, а также определить дозировки АФС при условии их совместного включения в состав МЛФ.

В ходе исследований было рассмотрено 8 составов МЛФ, представляющих собой гели на основе альгината натрия, которые отличались между собой концентрацией одного из компонентов. Так для аденозина рассматривалось 3 дозировки (3,0; 5,0 и 7,0 грамм на 100 грамм МЛФ), для иммуномодулятора М – две (5,0 и 7,0 грамм на 100 грамм МЛФ), для мелоксикама – три (0,25; 0,5 и 1,0 грамм на 100 грамм МЛФ).

Компонентные составы гелей представлены в таблице 14. Дополнительно в исследование была включена группа контроля, которой наносили гелевую основу без действующих веществ, а также группа сравнения, получающая терапию референтным препаратом Амелотекс® гель 1%.

Схема проведённых доклинических исследований

БЛОК 1. Определение оптимальных дозировок действующих веществ и оценка противовоспалительной активности мягкой лекарственной формы

Примечание: дозировки указаны в виде количества г АФС на 100 г МЛФ

Этап 1. Выбор дозировки аденозина



Этап 2. Выбор дозировки иммуномодулятора М



Этап 3. Выбор дозировки мелоксикама



+ референтный препарат: Амелотекс® гель 1%

Критерии, эффективности испытуемых составов: размер повреждённого сустава, толерантность к физической нагрузке, гистологическая картина воспаления.

Длительность нанесения составов: 28 дней

Количество животных в группе: 8

БЛОК 2. Сравнительная оценка эффективности и безопасности комбинированной мягкой лекарственной формы

Количество животных в каждой группе: 5



*иммуноферментный анализ крови
enzyme immunoassay*



**ОСТЕОАРТРИТ
OSTEOARTHRITIS**



IL-6 IL-1 α
TNF- α IL-1 β



*Концентрация провоспалительных цитокинов
Concentration of pro-inflammatory cytokines*

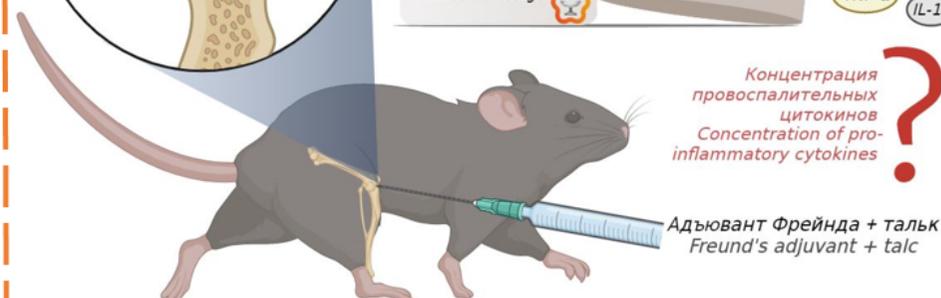


Рисунок 39 – Схема проведённых доклинических исследований

| Доклинические исследования: Блок 1 | Этап 1: выбор концентрации аденозина | | | Этап 2: выбор концентрации иммуномодулятора М | | Этап 3: выбор концентрации мелоксикама | | Основа |
|---------------------------------------|--------------------------------------|------------|------------|---|------------------------|--|--------------------------|----------------|
| | Гель Ia | Гель IIa | Гель IIIa | Гель Iи | Гель IIи (=гель 1%) | Гель Iм (=гель 0,25%) | Гель IIм (=гель 0,5%) | Гелевая основа |
| Аденозин | 3,0 | 5,0 | 7,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | - |
| Иммуномодулятор М | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | - |
| Мелоксикам | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 0,25 | 0,5 | - |
| Натрия альгинат | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Пропиленгликоль | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 |
| Твин 80 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Кремофор RH 40 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 |
| Вода очищенная | до 100,0 | до 100,0 | до 100,0 | до 100,0 | до 100,0 | до 100,0 | до 100,0 | до 100,0 |

Таблица 14. Состав МЛФ, исследуемых в ходе первого блока доклинических исследований

В результате комплексного исследования было определено, что наивысшую активность аденозин демонстрирует при дозировке 3,0 грамма на 100,0 геля, а иммуномодулятор М – при содержании 5,0 грамм на 100,0 геля.

Далее будут представлены результаты сравнительной оценки эффективности применения гелей, отличающихся только содержанием мелоксикама (составы гель Пи – гель 1%, гель Им – гель 0,25%, гель Пм – гель 0,5%).

1. Оценка размеров повреждённого сустава

Для оценки противовоспалительной эффективности гелей были измерены размеры повреждённого скакательного сустава крыс в сравнении с животными контрольной группы и неповреждённым суставом второй задней конечности. Результаты представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Сравнительная эффективность гелей по влиянию на размер скакательных суставов крыс-самцов в зависимости концентрации мелоксикама (M±SD)

| Гель/ показатель | Толщина лапы, мм | | | | | | | |
|--------------------------------|------------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|
| | 1* | 2* | Δ* | ИР*, % | 1** | 2** | Δ** | ИР**, % |
| 0,25 % | 4,54± 0,11 | 5,60± 0,15 | 1,06± 0,22 | 23,33± 5,16 | 4,54± 0,11 | 7,50± 0,23 | 2,95± 0,29 | 65,17± 7,50 |
| 0,5% | 4,55± 0,17 | 5,61± 0,14 | 1,07± 0,20 | 23,64± 4,88 | 4,55± 0,17 | 7,31± 0,39 | 2,76± 0,43 | 59,98± 10,75 |
| 1% | 4,55± 0,14 | 5,59± 0,22 | 1,05± 0,29 | 23,17± 6,86 | 4,55± 0,14 | 7,18± 0,50 | 2,64± 0,50 | 55,84± 12,81 |
| Амелотекс [®] , 1% | 4,59± 0,14 | 5,57± 0,20 | 0,98± 0,27 | 21,43± 6,48 | 4,59± 0,14 | 7,44± 0,36 | 2,84± 0,38 | 62,01± 8,99 |
| Основа | 4,59± 0,12 | 5,57± 0,21 | 0,98± 0,20 | 21,44± 4,52 | 4,59± 0,12 | 7,52± 0,59 | 2,93± 0,64 | 63,93± 14,78 |

Примечания. 1 – правая лапа (контроль); 2 – левая лапа (опыт); * показатели через 1 день; ** показатели через 4 недели.

По влиянию на изменение размера сустава разработанные составы оказались сопоставимыми между собой и референтным препаратом.

2. Толерантность к физической нагрузке

С учётом избегания использования повреждённого сустава одной из опорных конечностей был проведен тест толерантности к физической нагрузке, данные представлены в виде диаграммы (Рисунок 40).

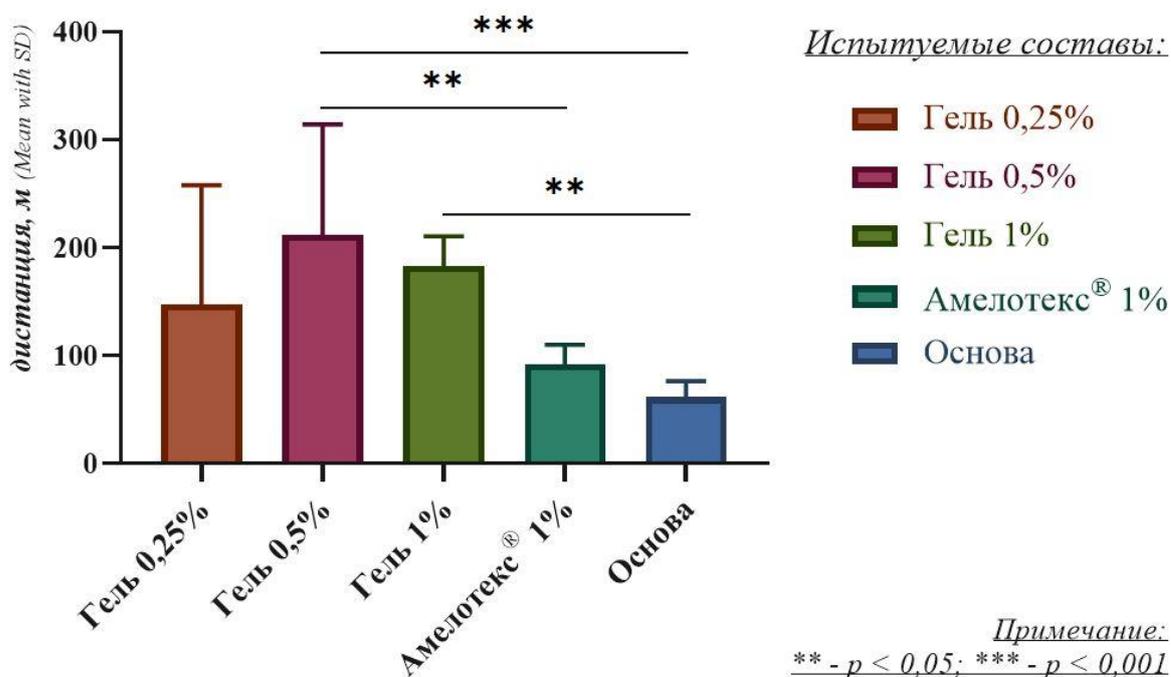


Рисунок 40 – Сравнительная оценка двигательной активности животных, получавших гель с разной концентрацией мелоксикама, референтный препарат Амелотекс® и гелевую основу

По оси ординат показана длина дистанции, которую преодолевало животное. Наибольшую активность по влиянию на двигательную активность продемонстрировали гели, содержавшие мелоксикам в концентрации 0,5 % и 1 %.

3. Гистологическое исследование

Адьювант-индуцированный артрит является одной из старейших экспериментальных моделей, которая используется для тестирования лекарственных препаратов из группы НПВП [15]. Особенности модели заключаются в наличии отека конечностей, дегенерации хрящей, лимфоцитарной инфильтрации воспаленной ткани суставов, утрате их

функции, кроме того, отмечается резорбция кости и надкостницы; однако повреждение хряща происходит в меньшей степени, чем в аналогичной патологии у человека. Введение же талька в сустав способствует истиранию поверхностей.

На рисунке 41 представлены патологические изменения, которые наблюдались при моделировании патологии.

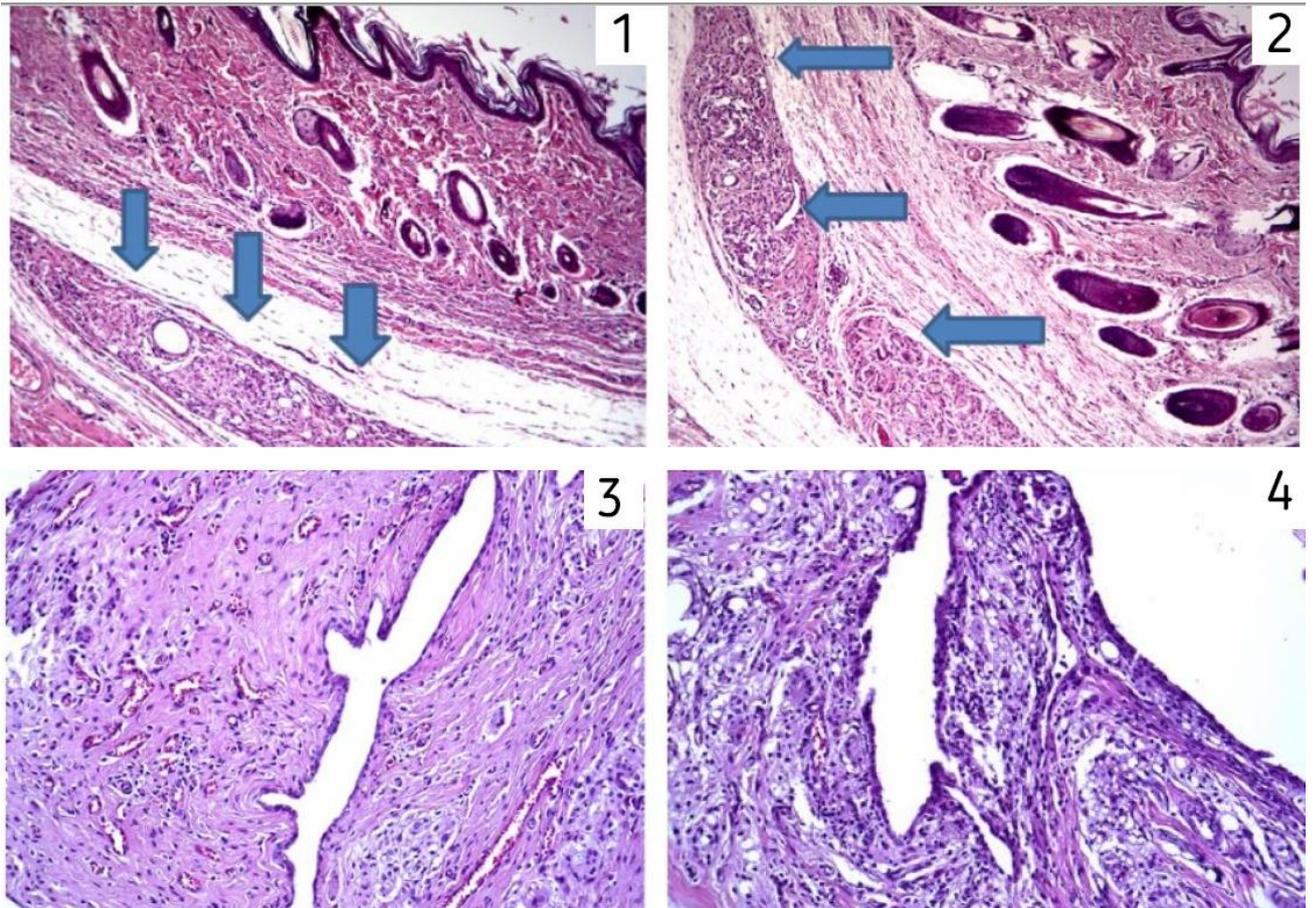


Рисунок 41 – Выявленные патологические изменения гистологической картины: 1. Очаговое распространение воспалительной инфильтрации на окружающие мягкие ткани вплоть до подкожной жировой клетчатки (ув.х100); 2. Очаговое распространение воспалительной инфильтрации на окружающие мягкие ткани вплоть до дермы (ув.х100); 3. Очаговый умеренно выраженный фиброз в стенке суставной сумки (ув.х200); 4. Очаговые разрастания фиброзной и зрелой грануляционной ткани в суставной сумке с умеренно выраженной лимфо-гистиоцитарной инфильтрацией с умеренно выраженной гигантоклеточной реакцией (ув.х200).

В зависимости от наносимого геля патологическая картина воспалительного процесса в группах отличалась.

Бальная оценка патологического процесса представлена в таблице 16. Большую противовоспалительную активность показал гель с 0,5 % содержанием мелоксикама.

Таблица 16 – Балльная гистологическая оценка выраженности патологического процесса в суставе

| Группа | Выраженность альтеративной фазы воспаления (некроза) | Выраженность экссудативной фазы воспаления (воспалительной инфильтрации) | Выраженность гигантоклеточной реакции | Выраженность продуктивной фазы воспаления (организации) | Сумма баллов |
|------------------|--|--|---------------------------------------|---|--------------|
| Гель 0,25% | 0 | 8 | 6 | 5 | 19 |
| Гель 0,5% | 0 | 4 | 3 | 6 | 13 |
| Гель 1% | 0 | 10 | 9 | 11 | 30 |
| Амелотекс®, 1% | 0 | 6 | 4 | 8 | 18 |
| Гелевая основа | 0 | 11 | 17 | 12 | 40 |

По совокупности результатов проведённых исследований для дальнейшей разработки был рекомендован состав, содержащий 3 г аденозина, 5 г иммуномодулятора М и 0,5 г мелоксикама на 100 г геля (гель 0,5 %).

Блок 2: Сравнительная оценка эффективности и безопасности комбинированной мягкой лекарственной формы

С патогенетической точки зрения ОА является многофакторным заболеванием. Исследования последних лет говорят о значимом вкладе в формирование клинической картины ОА как дегенеративных, так и воспалительных изменений [25]. При всей надёжности изучения размера повреждённого сустава, толерантности к физической нагрузке и

гистологической картины воспаления, оценка является весьма грубой, поэтому второй блок доклинических исследований был посвящен анализу влияния комбинированной МЛФ на патогенез воспаления при ОА, а именно – на уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО- α , определённый с помощью ИФА.

В эксперимент было включено 5 групп животных, которым наносили: гель 0,5%, гель 1%, гелевую основу, Амелотекс, а также МЛФ, представляющая собой комбинацию мелоксикама и ДМСО, включённых в ранее разработанную гелевую основу.

Из данных литературы есть сведения о том, что ИЛ-1 α способствуют развитию остеолитического процесса, повышает резорбцию кости и хряща, а также усиливает процесс образования супероксид-радикалов, оксида азота (II), простагландинов E₂ [23]. В связи с чем, уменьшение концентрации ИЛ-1 α имеет значение для замедления патологического процесса на уровне метаболизма хондроцитов и оказания хондропозитивного эффекта. Такую картину мы наблюдаем в случае 28-дневного нанесения геля 0,5%, геля 1%, а также референтного препарата Амелотекс[®] гель 1%. В этих группах уровень ИЛ-1 α находился в диапазоне от $58,09 \pm 18,70$ до $233,5$ пг/мл, в то время как в контрольной группе, получавшей гелевую основу, концентрация ИЛ-1 α составляла около $369,48 \pm 36,52$ пг/мл.

ИЛ-1 β считается одним из ключевых цитокинов, участвующих в патогенезе ОА. Было показано, что ИЛ-1 β ингибирует продукцию компонентов внеклеточного матрикса хряща (коллаген и агрекан), активирует металлопротеиназы, разлагающие матрикс, индуцирует свою собственную экспрессию, а также производство других провоспалительных медиаторов, таких как ИЛ-6, ФНО- α , ИЛ-8 [25,26]. В связи с этим многие исследователи оценивают уровень ИЛ-1 β в качестве маркера выраженности воспаления, а также с точки зрения оценки противовоспалительной активности испытываемых средств. В исследовании, проведённом нами, у животных, которым наносили гелевую основу после моделирования

патологии средний уровень ИЛ-1 β $31,47 \pm 0,66$ пг/мл, в то время, как у интактных он был около $12,69 \pm 0,72$ пг/мл, что свидетельствуют о сохранении воспаления на 28 день эксперимента. Статистически значимых различий между уровнями ИЛ-1 β в группах, получающих терапию разными топическими составами, выявлено не было. Эти данные предположительно можно связать тем, что воспалительный процесс при ОА начинается с его гиперпродукции, после которой запускается синтез других медиаторов воспаления и, в течение времени, концентрация ИЛ-1 β снижается. Однако подтверждения этой гипотезы необходимо провести исследование в динамике, включив несколько временных точек взятия крови и проведения ИФА.

ФНО- α – цитокин, значение которого в патогенезе ОА привлекает многих авторов [27,28]. При патологии повышенные уровни ФНО- α присутствуют в синовиальной ткани и жидкости, а также в хрящах. Механизмы, посредством которых ФНО- α имитирует прогрессирование ОА, и сигнальные пути, на которые он влияет, остаются предметом исследований [28]. Было установлено, что ФНО- α способствует высвобождению матриксных металлопротеиназ из синовиальных фибробластов, что приводит к разрушению хряща, и ингибирует хондрогенез через путь ядерного фактора-kB (NF-kB), подавляя выработку фактора транскрипции (SOX9) [10]. Обзор исследований *in vitro* показывает, что ингибирование ФНО- α в доклинических моделях способствовало восстановлению хряща и, в целом, улучшало жизнеспособность костно-хрящевой ткани, наблюдалась хондропротекция [20].

ИЛ-6 является важным медиатором воспалительной реакции и участвует в различных клеточных процессах, включая пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток. Синтез ИЛ-6 в тканях поражённого сустава обычно происходит в ответ на ИЛ-1 β и ФНО- α и в основном осуществляется хондроцитами, остеобластами, макрофагами и адипоцитами [26]. При ОА уровень ИЛ-6 повышен в синовиальной жидкости и сыворотке больных ОА, что коррелирует с рядом функциональных

показателей тяжести ОА. Подобно ИЛ-1 и ФНО- α , ИЛ-6 снижает выработку компонентов хрящевого матрикса и приводит к увеличению продукции матриксных металлопротеиназ [25].

С использованием ИФА нам удалось измерить концентрации провоспалительных цитокинов и установить, что применение лекарственных препаратов: геля 0,5%, геля 1% и геля Амелотекс® 1% способствовало снижению концентрации ИЛ-1 α , ИЛ-6 и ФНО- α по сравнению с группой контроля, которой после моделирования патологии наносили гелевую основу [91] (Рисунок 42).

Такой эффект может быть связан с наличием в опытных составах нестероидного противовоспалительного средства (НПВС) – мелоксикама, который помимо ингибирования ЦОГ-2, обладая анаболическим действием, активно вмешивается в развитие патологического процесса при остеоартрите [53].

Выявленные отличия между испытуемыми средствами (гелем 0,5%, гелем 1%) и референтным препаратом по влиянию на уровень ИЛ-1 α и ФНО- α свидетельствует о большей эффективности подобранной комбинации действующих веществ, ведь, в отличие от однокомпонентного геля Амелотекс®, разработанные нами составы дополнительно включали производное пурина и иммуномодулятор М. На рисунке 42 отражены результаты иммуноферментного анализа концентрации ИЛ-1 α , ИЛ-6 и ФНО- α в крови крыс на 28 день эксперимента в испытуемых, контрольной и интактной группах.

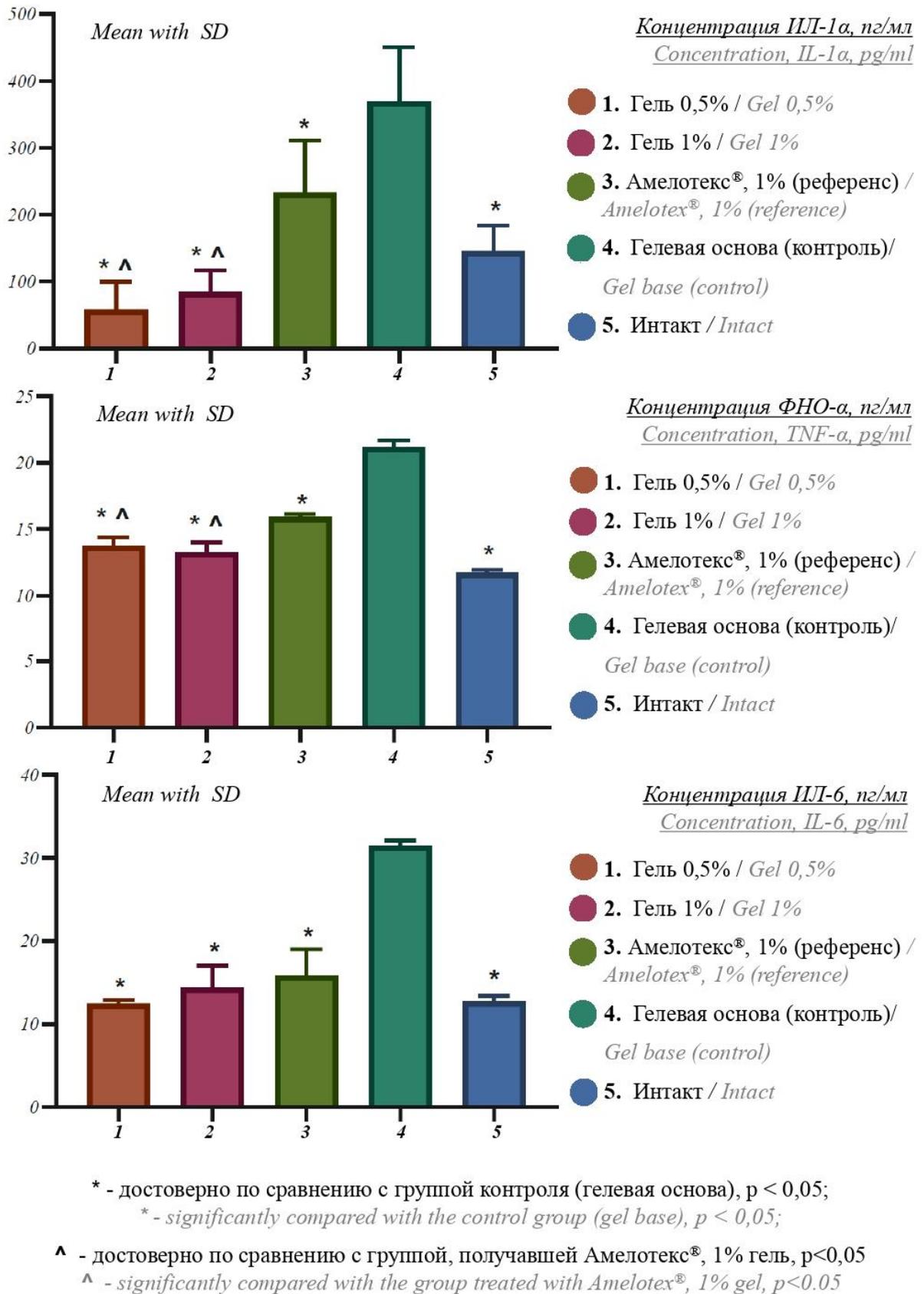


Рисунок 42. Результаты иммуноферментного анализа концентрации ИЛ-1α, ИЛ-6 и ФНО-α в крови крыс на 28 день эксперимента [91]

Оценка профиля безопасности МЛФ

Вывод о безопасности разработанного состава МЛФ был сделан на основе отсутствия местно-раздражающего действия при длительном нанесении.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5:

Проведённые ДИ, основанные на модели адьювант-индуцированного ОА, позволили определить оптимальные дозировки для каждого из компонентов оригинальной комбинированной МЛФ: мелоксикама, аденозина и иммуномодулятора М.

Эффективность противовоспалительного геля по сравнению с референтным препаратом оценивалась по ряду показателей, включающих оценку размера повреждённого сустава, толерантность к физической нагрузке, гистологическую картину воспаления. Особое внимание было уделено оценке уровня провоспалительных цитокинов методом ИФА, поскольку этот показатель напрямую связан с патогенезом заболевания.

В результате было установлено, что разработанный состав, включающий комбинацию АФС и, в частности, 0,5% мелоксикама способствовал снижению уровня провоспалительных цитокинов: ИЛ-1 α , ИЛ-6 и ФНО- α . При этом использование сниженной дозировки мелоксикама: 0,5% в разработанном составе при 1% в геле Амелотекс[®], является важным, с точки зрения, минимизации рисков возникновения побочных эффектов.

В совокупности с положительным влиянием возрастание толерантности к физической нагрузке и уменьшению воспалительной реакции, оцениваемой с помощью гистологического анализа, были сделаны выводы о перспективности применения разработанного состава в клинической практике. Профиль безопасности МЛФ был оценён на основе отсутствия местно-раздражающего действия при длительном применении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В ходе работы проведено комплексное изучение физико-химических свойств АФС: мелоксикама, аденозина и иммуномодулятора М. Установлено, что вещества обладают разной растворимостью, что явилось предпосылкой к разработке комбинированной МЛФ, включающей раствор аденозина и иммуномодулятора М, а также суспензию мелоксикама.

2. Компонентный состав гелевой основы подбирался в два этапа, включающих выбор гелеобразователя, основанный на оценке органолептических свойств, рН, особенностей технологического режима, а также подбора компонентов основы, позволяющих получить структурированную систему с требуемым профилем высвобождения. В результате в качестве гелеобразователя было решено использовать природный полисахарид – альгинат натрия; пропиленгликоль был добавлен в состав в качестве компонента, отвечающего за мелкодисперсное введение мелоксикама, а также удерживания влаги, твин 80 и кремофор RH40 были необходимы для поддержания устойчивости суспензионного состава, обеспечения органолептических, структурно-механических и биофармацевтических свойств.

3. В результате исследования была разработана технология получения комбинированного геля, обеспечивающая введение каждой АФС, в соответствии с её свойствами. Нарботка образцов проводилась на базе GMP тренинг-центра СПХФУ с использованием верхнеприводной мешалки.

4. Разносторонняя сравнительная оценка аппаратного оформления технологии геля показала, что включение стадии виброкавитации позволяет модифицировать распределение размера частиц в суспензионных составах, а также характеризуется тенденцией к повышению микробиологической чистоты. При этом влияние виброкавитации на реологические и биофармацевтические характеристики геля сопоставимы между собой, что позволяет в дальнейшем использовать оба подхода. В качестве оптимального

режима виброкавитации была рекомендована двухминутная обработка составов со скоростью вращения ротора 5000 об/мин.

5. Ввиду невозможности совместного определения трёх действующих веществ, было разработано 2 методики ВЭЖХ анализа, одна из которых позволяет осуществлять качественный и количественный анализ мелоксикама, а вторая – одновременно определять аденозин и иммуномодулятор М. Результаты оценки стабильности показали, что в течении 1 года (время наблюдения) гель соответствовал всем определяемым параметрам. В результате был предложен проект спецификации качества.

6. На экспериментальной модели ОА проведена оценка эффективности разработанной комбинированной МЛФ по сравнению референтным препаратом. В результате было установлено, что по ряду показателей: толерантность к физической нагрузке, гистологическая картина воспаления и влияние на уровень провоспалительных цитокинов, испытуемый гель показал большую эффективность, что подчёркивает его перспективность для дальнейшего исследования и использования в клинической практике. Профиль безопасности геля был оценён на основе отсутствия местно-раздражающего действия при длительном применении (28 дней).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АФС – активная фармацевтическая субстанция
- ВВ – вспомогательные вещества
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГО – гелеобразователь
- ГЭЦ – гидроксипропилцеллюлоза
- ДИ – доклинические исследования
- ИЛ – интерлейкин
- ИФА – иммуноферментный анализ
- ЛП – лекарственный препарат
- ЛФ – лекарственная форма
- МЛФ – мягкая лекарственная форма
- НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты
- ОА – остеоартрит
- ПАВ – поверхностно-активное вещество
- РПА – роторно-пульсационный аппарат
- СО – стандартный образец
- ФНО – фактор некроза опухолей

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Российские клинические рекомендации. Ревматология / Под ред. Е.Л. Насонова. – М.: ГЭОТАРМедиа, 2019. – 464 с.
2. Зборовская, И.А. Остеоартроз – современный взгляд на лечение / И.А. Зборовская, Е.Э. Мозговая, С.А. Бедина, А.С. Трофименко, М.А. Мамус, Е.А. Тихомирова, С.С. Спицина // Лекарственный вестник. – 2019. – Т.13, №4(76). – С. 7-15.
3. Чичасова, Н.В., Современные международные и национальные рекомендации по ведению больных остеоартрозом / Н.В. Чичасова // Медицинский совет. – 2017. – №5. – С. 132-140.
4. Вакуленко, О.Ю. Остеоартроз: современные подходы к лечению / О.Ю. Вакуленко, Е.В. Жилиев // РМЖ. – 2016. – №22. – С. 1494-1498.
5. Наумов, А.В., Алексеева Л.И. Ведение больных с остеоартритом и коморбидностью в общей врачебной практике Клинические рекомендации 2016.
6. Сарвилина, И.В. Современные достижения в фармакотерапии остеоартрита на основе эндо- и фенотипирования / И.В. Сарвилина, О.А. Шавловская, О.А. Громова, А.В. Наумов, М.Н. Шаров, Ю.С. Прокофьева // Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. – 2021. – №3. – С. 379-404.
7. Таскина, Е.А. Место нестероидных противовоспалительных препаратов в современных рекомендациях по остеоартриту / Е.А. Таскина, Л.И. Алексеева, Н.Г. Кашеварова // Современная ревматология. – 2020. – №2. – 14(2):123–130.
8. Официальный сайт компании Statista [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.statista.com/>. (Дата обращения: 05.02.2023)
9. Насонов, Е.Л. Ревматология: национальное руководство / под ред. Е.Л. Насонова, В.А. Насоновой. – М.:ГЭОТАР-Медиа, 2008. С. 573–588.
10. Хитров, Н.А. Остеоартроз. Совокупность клинических форм и сопутствующих заболеваний / Н.А. Хитров // РМЖ. – 2015. – №7. – С. 363.

11. Таскина, Е.А. Место нестероидных противовоспалительных препаратов в современных рекомендациях по остеоартриту / Е.А. Таскина, Н.Г. Кашеварова, Л.И. Алексеева // Современная ревматология. – 2020. – Т. 14, №2. – С. 123-130.
12. Балабанова, Р.М. Динамика распространенности ревматических заболеваний, входящих в XIII класс МКБ-10, в популяции взрослого населения Российской Федерации за 2000-2010 гг. / Р.М. Балабанова, Ш.Ф. Эрдес // Научно-практическая ревматология. – 2012. – Т.50, №3. – С. 10-12.
13. Алексеева, Л.И. Остеоартрит: эпидемиология, классификация, факторы риска и прогрессирования, клиника, диагностика, лечение / Л.И. Алексеева, Е.А. Таскина, Н.Г. Кашеварова // Современная ревматология. – 2019. – Т. 13, №2. – С. 9-21.
14. Heidari, B. Knee osteoarthritis prevalence, risk factors, pathogenesis and features: Part I / B. Heidari // Caspian J Intern Med. – 2011. – V. 2, №2. – С. 205-212.
15. Palazzo, C. Risk factors and burden of osteoarthritis / C. Palazzo, C. Nguyen, M-M. Lefevre-Colau, F. Rannou, S. Poiraudreau // Annals of Physical and Rehabilitation Medicine. – V.59, №3. – 2016. – P. 134-138.
16. Zhang, P. Li K. Small molecules of herbal origin for osteoarthritis treatment: in vitro and in vivo evidence / P. Li K. Zhang, R. Ziadlou, P. Ahmad, X. Wang, R.G. Richards, M. Alini, V. Basoli, Z. Li, S. Grad // Arthritis Res Ther. – 2022. – V.24, №1. – P. 105.
17. Ширинский, В.С. Воспаление и иммунитет: роль в патогенезе остеоартрита / В.С. Ширинский, Е.В. Казыгашева, И.В. Ширинский. Медицинская иммунология. – 2019. Т.21, №1. – С. 39-48.
18. Aspden, R.M. Subchondral bone – a welcome distraction in OA treatment / R.M. Aspden // Osteoarthritis and Cartilage. – 2022. – V.30, №7. – С. 911-912.
19. Krishnan, Y. Cartilage diseases / Y. Krishnan, A.J. Grodzinsky // Matrix Biology. – 2018. – V.71-72: P. 51-69.

20. Chisari, E. The effects of s-alpha inhibition on cartilage: a systematic review of preclinical studies / E. Chisari, K.M. Yaghmour, W.S. Khan // *Osteoarthritis and Cartilage*. – 2020. – V.28, №5. – P. 708-718.
21. Klein, T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases / T. Klein, R. Bischoff // *Amino Acids*. – 2011. – V.41, №2. – P. 271-290.
22. Maldonado, M. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis / M. Maldonado, J. Nam. – *Biomed Res Int*. – 2013. – V.2013. – P. 284873.
23. Khella, C.M. Anti-Inflammatory therapeutic approaches to prevent or delay post-traumatic osteoarthritis (PTOA) of the knee joint with a focus on sustained delivery approaches / C.M. Khella, J.M. Horvath, R. Asgarian, B. Rolauffs, M.L. Hart // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V.22, №15. – P. 8005.
24. Ширинский, В.С. Воспаление и иммунитет: роль в патогенезе остеоартрита / В.С. Ширинский, Е.В. Казыгашева, И.В. Ширинский // *Медицинская иммунология*. – 2019. – №21. – С. 39-48.
25. Bosch, M.H.J. van den. Identifying effector molecules, cells, and cytokines of innate immunity in OA / M.H.J. van den Bosch, P.L.E.M. van Lent, P.M. van der Kraan // *Osteoarthritis and Cartilage*. – 2020. – V.28, №5. – P. 532-543.
26. Раймуев, К.В. Провоспалительные и противовоспалительные цитокины в патогенезе остеоартрита / К.В. Раймуев, А.М. Ищенко, М.Е. Малышев // *Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова*. – 2018. – V.10, №3. – P. 19–27.
27. Li, H. TNF- α increases the expression of inflammatory factors in synovial fibroblasts by inhibiting the PI3K/AKT pathway in a rat model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis / H. Li, S. Xie, Yu. Qi, H. Li, R. Zhang, Y. Lian // *Experimental and therapeutic medicine*. – 2018. – №16. – P. 4737-4744.
28. Yu, F-Y. TNF- α increases inflammatory factor expression in synovial fibroblasts through the toll-like receptor-3-mediated ERK/AKT signaling pathway in a

- mouse model of rheumatoid arthritis / F-Y. Yu, C.-Q. Xie, C.-L. Jiang, J.-T. Sun, X-Wu. Huang // *Molecular medicine reports*. – 2018. – V.17, №6. – C. 8475-8483.
- 29.Zhang H., Cai D., Bai X. Macrophages regulate the progression of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2020;28(5):555-561. DOI: 10.1016/j.joca.2020.01.007
- 30.Abhishek, A. Diagnosis and Clinical Presentation of Osteoarthritis / A. Abhishek, M. Doherty // *Reumatic Disease Clinics*. – V.39, №1. – P. 45-66.
- 31.Yusuf, E. Pharmacologic and Non-Pharmacologic Treatment of Osteoarthritis / E. Yusuf // *Curr Treat Options in Rheum*. – 2016. – №2. – P. 111–125.
- 32.Xiuling, J. Current Strategies for the Treatment of Early Stage Osteoarthritis / J. Xiuling, Z. Hongyu // *Frontiers in Mechanical Engineering*. 2019. – V.5., №57. – P. 1-8.
- 33.Huang, H. Recombinant protein drugs-based intra articular drug delivery systems for osteoarthritis therapy / H. Huang, Y. Lin, Y. Jiang, Q. Yao, R. Chen, Y-Z. Zhao, L. Kou // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – V.183. – P. 33-46.
- 34.Ramirez-Perez, S. Targeting inflammasome-dependent mechanisms as an emerging pharmacological approach for osteoarthritis therapy / S. Ramirez-Perez, I.V. Reyes-Perez, D.E. Martinez-Fernandez, L.A. Hernandez-Palma, P. Bhattaram // *iScience*. – 2022. – V.25, №12. – P.105548.
- 35.Dantas, L.O. Knee osteoarthritis: key treatments and implications for physical therapy / L.O. Dantas, T.d.F. Salvini, T.E. McAlindonb // *Brazilian Jornal of Physical Therapy*. – 2021. – V.25, №2. – P. 135-146.
- 36.D’Arcy, Y. Treating osteoarthritis pain: mechanisms of action of acetaminophen, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, opioids, and nerve Ramirez-Perez, S. Reyes-Perez IV, Martinez-Fernandez DE, Hernandez-Palma LA, Bhattaram P. growth factor antibodies / Y. D’Arcy, P. Mantyh, T. Yaksh, S. Donevan, J. Hall, M. Sadrarhami, L. Viktrup // *Clinical features*. – 2021. – V.133, №8. – P. 879-894.

37. Ли́ла, А.М. Симптоматические препараты замедленного действия (SYSADOA): новые применения / А.М. Ли́ла, Е.А. Таскина, Л.И. Алексе́ева, Н.Г. Каше́варова // Современная ревматология. – 2022. – Т.16, №2. – С. 99-106.
38. Sukhikh, S. Future of Chondroprotectors in the Treatment of Degenerative Processes of Connective Tissue / S. Sukhikh, O. Babich, A. Prosekov, N. Patyukov, S. Ivanova // Pharmaceuticals (Basel). – 2020. – V.13, №9. – P. 220.
39. Ивкин, Д.Ю. Симптоматические препараты замедленного действия в терапии остеоартроза / Д.Ю. Ивкин, А.С. Ивкина // Лечащий врач. – 2012. – №7. – С. 100-104.
40. Reginster, J.Y. Role of glucosamine in the treatment for osteoarthritis / J.Y. Reginster, A. Neuprez, M.P. Lecart, N. Sarlet, O. Bruyere // Rheumatol Int. – 2012. – V.32, №10. – P. 2959-2967.
41. Singh, J.A. Chondroitin for osteoarthritis / J.A. Singh, S. Noorbaloochi, R. MacDonald, L.J. Maxwell // Cochrane Database Syst Rev. – 2015(1):CD005614.
42. Migliore, A. Effectiveness and utility of hyaluronic acid in osteoarthritis / A. Migliore, S. Procopio // Clin Cases Miner Bone Metab. – 2015. – V.12, №1. – P. 31-33.
43. Maheu, E. Efficacy and safety of hyaluronic acid in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys / E. Maheu, F. Rannou, J-Y. Reginster // Seminars in Arthritis and Rheumatism. – 2016. – V.45, №4. – P. 28-33.
44. Christiansen, B.A. Management of Osteoarthritis with Avocado/Soybean Unsaponifiables / B.A. Christiansen, S. Bhatti, R. Goudarzi, S. Emami // Cartilage. – 2015. – V.6, №1. – P. 30-44.
45. Urbi, Z. A Concise Review of Extraction and Characterization of Chondroitin Sulphate from Fish and Fish Wastes for Pharmacological Application / Z. Urbi, N.S. Azmi, L.C. Ming, Md.S. Hossain // Curr. Issues Mol. Biol. – 2022. – №44. – P. 3905-3922.

- 46.Cho, Y. Disease-modifying therapeutic strategies in osteoarthritis: current status and future directions / Y. Cho, S. Jeong, H. Kim, D. Kang, J. Lee, S-B. Kang, J-H. Kim // *Experimental & Molecular Medicine*. – 2021. – V.53. – P. 1689–1696.
- 47.Vane J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for Aspirin-like drugs / J.R. Vane // *Nat New Biol*. – 1971. – 231. – C. 232–35.
- 48.Davies, N.M. Clinical pharmacokinetics of meloxicam A cyclo-oxygenase-2 preferential nonsteroidal anti-inflammatory drug / N.M. Davies, N.M. Skjodt // *Clin Pharmacokinet*. – 1999. – №36. – P.115–126.
- 49.Chen, Y-F. Cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory (etodolac, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib and lumiracoxib) for osteoarthritis or rheumatoid arthritis: a systematic review and economic evaluation // Y-F. Chen, P. Jobanputra, S. Bryan, A. Fry-Smith // *Health Technology Assessment*. –2008. – V.12, №11.
- 50.Wojtulewski, J.A. A six-month double-blind trial to compare the efficacy and safety of meloxicam 7.5 mg daily and naproxen 750 mg daily in patients with rheumatoid arthritis / J.A. Wojtulewski, M. Schattenkirchner, P. Barceló, X.L. Le, P.J. Bevis, E. Bluhmki, M. Distel // *Br J Rheumatol*. –1996. – V.35, №1. – P. 22-28.
- 51.Бадюкин, В.В. Остеоартрит: от патогенеза к рациональной терапии / В.В.Бадюкин. – М., 2020. – 248 с. : ил.
- 52.Плотникова Е.Ю. Мелоксикам – предпочтительный нестероидный противовоспалительный ингибитор циклооксигеназы-2 / М.Н. Синькова, Л.К. Исаков, А.С. Сухих // *Фарматека*. – 2020. – №14. – С:113-121.
- 53.Корсакова, Ю.Л. Мелоксикам (мовалис) в практике врача / Ю.Л. Корсакова, В.В. Бадюкин // *Современная ревматология*. – 2011. – №3. – С. 46-50.
- 54.Бадюкин, В.В. Сложности выбор оптимального нестероидного противовоспалительного препарата: в фокусе мелоксикам / В.В. Бадюкин // *Русский медицинский журнал*. – 2016. – №26. – С. 1772-1776.

55. Cronstein, B.N. Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases / B.N. Cronstein, M. Sitkovsky // *Nat Rev Rheumatol.* – 2017. – V.13, №1. – P. 41-51.
56. Varani, K. A2A and A3 adenosine receptor expression in rheumatoid arthritis: upregulation, inverse correlation with disease activity score and suppression of inflammatory cytokine and metalloproteinase release // K. Varani, M. Padovan, F. Vincenzi, M. Targa, F. Trotta, M. Govoni, P.A. Borea // *Arthritis Res Ther.* – 2011. – V.13, №6. – P. R197.
57. Ногаева, У.В. Разработка состава и технологии комбинированного геля для терапии остеоартроза с фармакологическим обоснованием содержания компонентов / У.В. Ногаева, Ю.М. Коцур, Е.В. Флисюк, Д.Ю. Ивкин, Е.Д. Семивеличенко, И.А. Титович, В.Г. Антонов // *Разработка и регистрация лекарственных средств.* – 2021. – Т. 10, № S4. – С. 69-78.
58. Насонова, В.А. Остеоартроз. Проблема полиморбидности / В.А. Насонова // *Consilium Medicum.* – 2009. – Т. 11, №2. – С. 34-45.
59. Шарапова, Е.П. Локальные нестероидные противовоспалительные препараты в лечении остеоартрита / Е.П. Шарапова, Л.И. Алексеева // *Терапия.* – 2021. – №3. – С. 80-86.
60. Каратеев, А.Е. Локальные формы НПВП: современный взгляд на эффективность и безопасность / А.Е. Каратеев, А.М. Лиля // *РМЖ. Медицинское обозрение.* – 2019. – №3. – С. 75-80.
61. Погожева, Е.Ю. Нестероидные противовоспалительные препараты для локальной терапии болевого синдрома при ревматических заболеваниях / Е.Ю. Погожева, В.Н. Амирджанова // *Ревматология.* – 2013. – №2. – С. 5-9.
62. Аникин, Г.С. Местная терапия при патологии опорно-двигательного аппарата / Г.С. Аникин // *Consilium Medicum.* – 2014. – Т.16, №2. – С. 54-56.
63. Honvo, G. Safety of Topical Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Osteoarthritis: Outcomes of a Systematic Review and Meta-Analysis / G. Honvo, V. Leclercq, A. Geerinck, T. Thomas, N. Veronese, A. Charles, V. Rabenda, C.

- Beaudart, C. Cooper, J-Y. Reginster, O. Bruyere // *Drugs & Aging*. – 2019. – №36. – S. 45–S64.
64. Алексеев, К.В., Блынская Е.В., Кедик С.А., Агапова С.К. Фармацевтическая технология. Мази. Учебное пособие / под ред. профессора С.А. Кедика. – М.; СПб., ЗАО «ИФТ». – 2014. – 584 с.
65. Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс] / МЗ РФ. – М., 2018. – [Электронный ресурс]. – URL: <http://femb.ru>. (дата обращения: 11.05.2022).
66. Сампиев, А.М. Биофармацевтические аспекты исследований в области создания мягких лекарственных форм / А.М. Сампиев, Е.В. Никифорова, Н.А. Давитанян, Д.А. Исмагилова // *Здоровье и образование в XXI веке*. – 2019. – Т. 21, №2. – С. 48-52.
67. Безуглая, Е.П. Разработка состава препарата мелоксикам гель на основании результатов биофармацевтических исследований / Е.П. Безуглая, А.Н. Ляпунов, В.В. Либина, И.Н. Орлова, И.В. Кудрис // *Клінічна фармація*. – 2015. – Т. 19, №3. – С. 48-55.
68. Zwang, L. Rheological and gel properties of hydroxypropyl methylcellulose/hydroxypropyl starch blends / L. Zwang, Y. Wang, L. Yu, H. Liu, G. Simon, N. Zwang, L. Chen, L. Chen // *Colloid and Polymer Science*. – V.293, №1. – P. 229-237
69. Oliveira, R.N. Blended Gels of Sodium Carboxymethyl Cellulose Incorporating Antimicrobials for Absorbance and Wound Healing Applications / R.N. Oliveira, G.B. McGuinness // *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels. Polymers and Polymeric Composites: A Reference Series*. Springer – 2018.
70. Анурова, М.Н. Обзор современных гелеобразователей в технологии лекарственных форм / М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, Н.Б. Демина // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2015. – Т.49, №9. – С. 39-46.
71. Shafiei, M. Chemical and microstructural controls on viscoplasticity in Carbopol hydrogel / M. Shafiei, M. Balhoff, N.W. Hayman // *Polymer*. – 2018. – V.139. – P. 44-51.

72. Proniuk, S. Anhydrous Carbopol polymer gels for the topical delivery of oxygen/water sensitive compounds // S. Proniuk, J. Blanchard // *Pharm Dev Technol.* – 2002. – V.7, №2. – P.249-255.
73. Harish N.M. Formulation and evaluation of in situ gels containing clotrimazole for oral candidiasis / N.M. Harish, P. Prabhu, R.N. Charyulu, M.A. Gulzar, E.V.S. Subrahmanyam // *Indian J Pharm Sci.* – 2009. – V.71, №4. – P. 421-427
74. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx>. (дата обращения 30.09.2022).
75. Ляпунов А.Н. Наружное средство для лечения болезней суставов и мягких тканей / Е.П. Безуглая, Н.А. Прохорков, О.С. Шелудченко // Патент РФ на изобретение №RU 2574008 С2. 24.10.2013. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2574008C2/ru>. Ссылка активна на 09.03.2023.
76. Jadach, B. Sodium Alginate as a Pharmaceutical Excipient: Novel Applications of a Well-known Polymer / B. Jadach, W. Świetlik, A. Froelich // *Journal of Pharmaceutical Sciences.* – 2022. – V.111, №5. – P. 1250-1261.
77. Sachan, N.K. Sodium alginate: The wonder polymer for controlled drug delivery / N.K. Sachan, S. Pushkar, A. Jha, A. Bhattacharya // *Journal of Pharmacy Research.* – 2009. – V.2, №8.
78. Hidalgo, M.E. Effect of Xanthan Gum on the Rheological Behavior and Microstructure of Sodium Caseinate Acid Gels / M.E. Hidalgo, M. Armendariz, J.R. Wagner, P.H. Risso // *Gels.* – 2016. – V.2, №3.
79. Каталог оборудования ООО «Пищевые насосы» [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://foodpumps.ru/rotorno-pulsatsionnye-apparaty-gra/>. (дата обращения: 09.03.2023).
80. Каталог оборудования ООО «КАБЕЛЬФАРМТЕХНИКА» Оборудование для фармацевтической и косметической промышленности [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.kft2.com.ua/reaprom2.html>. (дата обращения: 09.03.2023).

81. Каталог оборудования FIRMA «URLIŃSKI» промышленности [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://ru.urlinski.com.pl/produkt/mieszalniki-homogenizujace-homogenizatory-typ-mzuts/>. (дата обращения: 09.03.2023).
82. Флисюк, Е.В. Кинетика экстрагирования диосцинаиз растительного сырья в виброкавитационном гомогенизаторе / С.С. Белокуров, И.А. Наркевич, А.Н. Шиков, О.М. Флисюк, Д.Ю. Ивкин // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т. 2, №9. – С. 13–17.
83. Mauri, M. Gelling process of sodium alginate with bivalent ions rich microsphere: Nature of bivalent ions / M. Mauri, S. Vicini, M. Castellano // AIP Conference Proceedings. – 2016. – V.1736.
84. Khunawattanakul, W. Sodium Alginate-Quaternary Polymethacrylate Composites: Characterization of Dispersions and Calcium Ion Cross-Linked Gel Beads / W. Khunawattanakul, N. Jaipakdee, T. Rongthong, N. Chansri, P. Srisuk, P. Chitropas, T. Pongjanyakul // Gels. – 2022. – V.8, №11, P.739.
85. Hidalgo M.E. Effect of Xanthan Gum on the Rheological Behavior and Microstructure of Sodium Caseinate Acid Gels / M.E. Hidalgo, M. Armendariz, J.R. Wagner, P.H. Risso // Gels. – 2016. – V.2, №3. – P. 23.
86. Каталог реактивов и оборудования ООО «ПраймКемикалсГрупп» [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://pcgroup.ru/contact/>. (дата обращения: 05.03.23).
87. Ивкин, Д.Ю. Диметилсульфоксид — вещество с плеiotропными эффектами, актуальными при заболеваниях опорно-двигательного аппарата / Д.Ю. Ивкин, С. В. Оковитый, А. С. Ивкина, Н. А. Анисимова // Лечащий врач. – 2019. – №4. – С. 19-23.
88. Вайнштейн, В.А. Исследование структурно-механических свойств мягких лекарственных форм / В.А. Вайнштейн // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – №3. – С. 70-78.
89. Ногаева, У.В. Сравнительное изучение реологических свойств гелей и кремов на различных основах-носителях / У.В. Ногаева, А.А. Наумова, А.Г.

- Новиньков, Е.В. Флисюк, М.А. Буракова, А.Н. Шиков, О.Н. Абросимова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Т. 11, № 3. – С. 121-129.
90. Сушинская, О.А. Методы исследования высвобождения лекарственных веществ из наружных лекарственных форм / О.А. Сушинская, Н.С. Голяк, В.М. Царенков // Вестник фармации. – 2019. – Т. 86, №4. – С. 86-96.
91. Ногаева, У.В. Оценка эффективности мягкой лекарственной формы для терапии остеоартрита: влияние на уровень провоспалительных цитокинов / У.В. Ногаева, В.Е. Ковансков, Д.Ю. Ивкин, Е.В. Флисюк, К.Д. Якимов, Е.И. Елецкая, Е.Д. Семивеличенко, В.Г. Антонов // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12, № 1. – С.195-202.

**АКТЫ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ**



ОКПО 01962942 ИНН/КПП 3444048472/263243001 тел. (8793) 32-44-74, 32-92-66, факс 32-92-67

ПЯТИГОРСКИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
– ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

357532, Россия, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11

«10» февраля 2023 г. № _____
на № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Директор Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России,
доктор психологических наук,
кандидат медицинских наук,
профессор



О.А. Ахвердова

«10» февраля 2023 г.

**АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ**

1. Наименование предложения для внедрения: подходы к разработке состава и технологии мягких лекарственных форм: алгоритмы подбора вспомогательных веществ, основанные на комплексных реологических и фармакокинетических исследованиях методами *in vitro*.

2. Автор разработки: Ногаева У.В., аспирант кафедры технологии лекарственных форм, младший научный сотрудник GMP тренинг-центра федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

3. Куда и где внедрено: использовано в образовательной деятельности кафедры фармацевтической технологии с курсом

медицинской биотехнологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

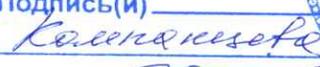
4. Результаты внедрения: предложенные подходы соответствуют современным тенденциям развития фармацевтической технологии, их применение в учебном процессе позволило значительно улучшить качество подготовки специалистов по специальности 33.05.01 «Фармация».

Заведующий кафедрой фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России, доктор фармацевтических, доцент



Д.В. Компанцев



| | |
|--|--|
| Подпись(и) |  |
| Заверяю: |  |
| Начальник отдела кадров Пятигорского медико-фармацевтического института филиала ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России | |

Закрытое акционерное общество
«ФАРМА ВАМ» (ЗАО «ФАРМА ВАМ»)
PHARMA VAM Closed Joint Stock Company
(PHARMA VAM C.J.S.C.)

ул. Псковская, д. 17, Санкт-Петербург, 190121
тел. (812) 714-10-10, факс (812) 495-14-33
<http://pharmavam.ru>
E-mail: info@glutoxim.ru
ОГРН 1027700274876, ОКПО 18778194
ИНН/ КПП 7708111656/783901001

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ЗАО «ФАРМА ВАМ»



М.Б. Балазовский

«30» января 2023 года

АКТ АПРОБАЦИИ

Технология получения комбинированной мягкой лекарственной формы (МЛФ), разработанная аспирантом кафедры технологии лекарственных форм младшим научным сотрудником GMP тренинг-центра ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России Ногаевой У.В., была апробирована в промышленных условиях ЗАО «ФАРМА ВАМ».

Полученные опытно-промышленные партии геля противовоспалительного, содержащего три действующих вещества: мелоксикам, аденозин и иммуномодулятор М, по показателям качества соответствовали требованиям нормативной документации (проекту спецификации качества). Предложенная автором технология получения комбинированной МЛФ была успешно воспроизведена и показала свою применимость и рациональность.

Директор по науке ЗАО «ФАРМА ВАМ»

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "V.G. Antonov".

/ В.Г. Антонов



И.А. Наркевич

2023 г.

**Акт внедрения
результатов научно-практической работы
в учебный процесс**

Комиссия в составе:

| | | |
|-------------------|--|-----------------|
| Председателя | проректора по учебной работе, канд. фармацевт. наук. | Ю.Г. Ильиновой |
| и членов комиссии | начальника учебно-методического отдела | Д.С. Грицаненко |
| | директора департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, канд. биол. наук | И.А. Титович |

назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России от «12» марта 2021 г. № 100, составила акт о нижеследующем.

Результаты диссертационного исследования Ногаевой Ульяны Валерьевны на тему «Разработка состава и технологии комбинированной мягкой лекарственной формы для терапии остеоартрита», представленного на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, а именно: «Подходы к разработке состава и технологии мягких лекарственных форм» внедрены в учебный процесс на фармацевтическом факультете по учебной дисциплине «Технология лекарственных форм аптечного изготовления» в рамках программы высшего образования – программы специалитета по специальности 33.05.01 Фармация очной формы обучения. Также предложенные подходы используются в процессе обучения иностранных студентов (специальность 33.05.01 Фармация) в Институте международных образовательных программ (ИМОП) университета, в том числе на русском, французском и английском языках.

| | | | |
|----------------|---|--|-----------------|
| Председатель | проректор по учебной работе, канд. фармацевт. наук, доцент |  | Ю.Г. Ильинова |
| члены комиссии | начальник учебно-методического отдела |  | Д.С. Грицаненко |
| | директор департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, канд. биол. наук |  | И.А. Титович |

УТВЕРЖДАЮ
Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ
Минздрава России,
д.фарм.н., профессор



И.А. Наркевич

«26» января 2023 г.

**Акт внедрения
результатов научно-практической работы
в научно-исследовательский процесс**

Комиссия в составе:

| | | |
|-------------------|---|-----------------------------------|
| Председателя | проректора по научной работе, д-р. фармацевт. наук. | Е.В. Флисюк |
| и членов комиссии | научного сотрудника департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, директора департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. биол. наук | К.О. Сидорова И.А. Титович |

назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России от «12» марта 2021 г. № 100, составила акт о нижеследующем.

Результаты диссертационного исследования Ногаевой Ульяны Валерьевны на тему «Разработка состава и технологии комбинированной мягкой лекарственной формы для терапии остеоартрита», представленного на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, а именно: «Методология оценки структурно-механических свойств мягких лекарственных форм», использовано в научно-исследовательской деятельности кафедры технологии лекарственных форм и GMP тренинг-центра ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках сравнительной характеристики разрабатываемых составов.

| | | |
|----------------|--|----------------------------------|
| Председатель | проректор по научной работе, д-р. фармацевт. наук. | Е.В. Флисюк |
| члены комиссии | научный сотрудник департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, директор департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. биол. наук | К.О. Сидоров И.А. Титович |

Акционерное общество «ВЕРТЕКС»
АО «ВЕРТЕКС» 197350, г. Санкт-Петербург,
дорога в Каменку, дом 62, литера А
Тел./ф.: +7(812) 329-30-41

vertex.spb.ru

Исх. № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «ВЕРТЕКС»

Г.Э. Побелянский

«03» марта 2023 года

АКТ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

1. Наименование предложения для внедрения: технология получения трёхкомпонентной мягкой лекарственной формы (МЛФ), алгоритм сравнительного изучения свойств МЛФ в зависимости от типа используемого оборудования.

2. Авторы разработки: Флисюк Е.В., профессор, доктор фармацевтических наук, зав. кафедрой технологии лекарственных форм, проректор по научной работе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Ногаева У.В., аспирант кафедры технологии лекарственных форм, младший научный сотрудник GMP тренинг-центра федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

3. Куда и где внедрено: использовано в деятельности службы науки и клинических исследований и в лаборатории мягких лекарственных форм акционерного общества «ВЕРТЕКС».

4. Результаты внедрения: положительные, разработанные авторами подходы и алгоритмы позволили повысить эффективность и ускорить процесс получения как одно-, так и многокомпонентных составов мягких лекарственных форм с использованием разных типов перемешивающих устройств.

Директор по науке
и клиническим исследованиям АО «ВЕРТЕКС»

Н.В. Марченко

