

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ НИЖЕГОРОДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. Н. И. ЛОБАЧЕВСКОГО»
(ННГУ)

на правах рукописи



Шеферов Илья Александрович

**Разработка составов и технологии получения комбинированных
дерматологических мягких лекарственных форм растворимых
оксопиримидинов и наночастиц оксидов церия и цинка с улучшенными
биофармацевтическими показателями**

3.4.1. Промышленная фармация и технология получения лекарств

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор

Мельникова Нина Борисовна

Нижний Новгород – 2025

Оглавление

Список сокращений	6
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	16
1.1. Особенности строения кожи и возможности проникания полярных активных фармацевтических субстанций в системный кровоток	16
1.2. Подходы к увеличению липофильности полярных гидрофильных субстанций при создании лекарственных средств	21
1.2.1. Полимеры и их роль в составе мягкой лекарственной формы	22
1.2.2. Доставка на векторе – наночастицах оксидов металлов (оксидов железа, цинка, церия)	28
1.2.3. Лекарственные формы ксимедона и 5-фторурацила	32
1.3. Показатели качества дерматологических гелей	35
1.3.1. Общие требования к дерматологическим и ранозаживляющим гелям	35
1.3.2. Оценка высвобождения АФС из лекарственных форм	36
1.3.3. Математическое моделирование проницаемости и высвобождения с использованием ячейки Франца	41
Общие выводы по главе 1	48
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	50
2.1. Реактивы	50
2.3. Приготовление гелей	54
2.3.1. Приготовление геля 5-фторурацила с наночастицами оксида церия, синтезируемых в матрице гидроксиэтилцеллюлозы	54
2.3.2. Приготовление геля ксимедона с наночастицами оксида цинка с использованием карбопола	54
2.4. Оценка биологической активности	55
2.4.1. Исследование цитотоксичности. Выживаемость и оценка цитотоксичности на опухолевых клетках	55

2.4.2. Оценка цитотоксичности на клеточных линиях меланомы (B16) и колоректального рака (HCT116 и HT29)	57
2.4.3. Оценка ранозаживляющих свойств и антиоксидантной активности	58
2.4.4. Моделирование термических ожогов у животных.....	59
ГЛАВА 3. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА КОМБИНИРОВАННОЙ МЯГКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ 5-ФТОРУРАЦИЛА С НАНОЧАСТИЦАМИ ОКСИДА ЦЕРИЯ.....	60
3.1. Дизайн и этапы фармацевтической разработки.....	60
3.2. Цитотоксичность наночастиц оксида церия и его комбинации с 5-фторурацилом.....	62
3.2.1. Цитотоксичность (выживаемость) клеток фибробластов под действием наночастиц оксида церия.....	62
3.2.2. Цитотоксичность наночастиц оксида церия и его комбинации с 5-фторурацилом на различных клеточных линиях.....	64
3.3. Выбор состава и метода получения гидрофильных гелей 5-фторурацила с наночастицами оксида церия	66
3.3.1. Выбор гелеобразователя.....	67
3.3.2. Методика формирования CeO_2 нч в матрице ГЭЦ.....	68
3.3.3. Оптимизация состава и свойств комбинированных гелей 5-фторурацила и наночастиц оксида церия	71
3.3.4. Контроль качества наночастиц оксида церия в разрабатываемом геле	75
3.4. Разработка подходов к стандартизации геля 5-фторурацила с наночастицами оксида церия и оценка высвобождения 5-фторурацила	79
3.4.1. Методики установления подлинности и количественного определения 5-фторурацила в гелях.....	79
3.4.2. Оценка высвобождения 5-фторурацила из геля с использованием теста “Растворение”	85
3.5. Технология изготовления комбинированного геля 5-фторурацила с наночастицами оксида церия	90

3.5.1. Изучение стабильности геля, разработка проекта спецификации качества	95
Общие выводы к главе 3	97
ГЛАВА 4. ПОЛУЧЕНИЕ КОМБИНИРОВАННЫХ ГЕЛЕЙ КСИМЕДОНА С НАНОЧАСТИЦАМИ ОКСИДА ЦИНКА И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ.....	98
4.1. Приготовление и модификация наночастиц оксида цинка	100
4.1.1. Выбор гелеобразователя.....	100
4.1.2. Модификация наночастиц оксида цинка ксимедоном.....	101
4.2. Разработка состава гидрофильного геля ксимедона с наночастицами оксида цинка	108
4.3. Оценка высвобождения ксимедона из геля с использованием теста “Растворение”	111
4.3.1. Валидационные характеристики методики количественного определения ксимедона в гелях.....	112
4.3.2. Высвобождение ксимедона из комбинированного геля с наночастицами оксида цинка	114
4.3.3. Технология получения комбинированного геля ксимедона с наночастицами оксида цинка	117
4.3.4. Изучение стабильности геля, разработка проекта спецификации качества	119
4.4. Биологическая активность геля ксимедона с наночастицами оксида цинка	122
Общие выводы к главе 4.....	126
Заключение	127
Выводы	127
Литература	130
Приложение 1	153
Приложение 2	155
Приложение 3	159

Приложение 4	160
Приложение 5	161
Приложение 6	162

Список сокращений

ААС	– атомно-абсорбционная спектрометрия
АФС	- Активная фармацевтическая субстанция
АлДГ	- Альдегиддегидрогеназа
БКС	- Биофармацевтическая классификационная система
ВВ	- Вспомогательное вещество
ВР	- Вспомогательные работы
ВЭЖХ	- Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГФ РФ	- Государственная фармакопея Российской Федерации
ГР	– Глутатионредуктаза
Г-6Ф-ДГ	– Глюкоза-6-фосфат-дегидрогеназа
ИК	- Инфракрасная спектроскопия
Кб	– Биологический контроль
КО	- Количественное определение
КОЕ	- Колониеобразующие единицы
КТ	- Контрольная точка
ЛП	- Лекарственный препарат
ЛФ	- Лекарственная форма
ЛДГ	– Лактатдегидрогеназа
МДА	– Малоновый диальдегид
МЛФ	– Мягкая лекарственная форма
МИК	- Минимальная ингибирующая концентрация
МНН	- Международное непатентованное наименование
НД	- Нормативная документация
ОФС	- Общая фармакопейная статья
ПАВ	- Поверхностно-активное вещество

ПФ - Подвижная фаза

ПРФД – Порошковая рентгенофазовая дифрактометрия

СЭМ – Сканирующая электронная микроскопия

СОД - Супероксиддисмутаза

ТП - Технологический процесс

УЗО – Ультразвуковая обработка

УФ – Ультрафиолетовый

РЭДС – Рентгеновская энергодисперсионная спектроскопия

РФЭС – Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы работы

Водорастворимые оксопиримидины, близкие по химической структуре к негликозидным пиримидиновым основаниям – компонентам нуклеиновых кислот, являются важными активными фармацевтическими субстанциями (АФС) с различным фармакологическим действием. К ним относятся репарат-регенерант 1-(β-оксиэтил)-4,6-диметил-1,2-дигидро-2-оксопиримидин (ксимедон) и цитостатик 5-фторпиримидин-2,4(1H,3H)-дион (5-фторурацил, 5-ФУ). Ксимедон проявляет антиоксидантное, регенерирующее, ранозаживляющее, улучшающее местное кровообращение свойства (Измайлов С. Г. и др., 2001). Однако, ввиду нестабильности ксимедона в мазевых основах, он используется только в твердой лекарственной форме. Цитостатик 5-ФУ, относящийся к антиметаболитам, при системном применении для лечения различных онкологических заболеваний имеет множество нежелательных побочных эффектов – воспалительные, аллергические реакции, стоматит и эзофагофарингит, диарея, анорексия и рвота, и др. (Papanastasopoulos, P., et al, 2014). Местное применение таких цитостатиков зачастую лишено этих недостатков и рекомендовано для лечения актинического кератоза, множественных и поверхностных базальноклеточных карцином, болезни Боуэна, а также бородавок, псориаза, витилиго и меланомы (Papanastasopoulos, P., et al, 2014; Oliveira, B., et al, 2020). Несмотря на востребованность этих АФС, ранозаживляющие и дерматологические мягкие лекарственные формы (МЛФ) как для ксимедона, так и для 5-ФУ практически отсутствуют на фармацевтическом рынке.

Одной из важнейших задач технологии получения МЛФ водорастворимых активных фармацевтических субстанций (АФС) и их дизайна является обеспечение их эффективности и биодоступности. Полярные водорастворимые АФС испытывают сложности при их проникании через

роговой слой кожи, поскольку диффузия и скорость проникания этих веществ, в отличие от гидрофобных, затруднена.

Наночастицы оксидов металлов, проявляющие свое фармакологическое действие в синергизме с водорастворимым пиримидиновым АФС, могут выполнять также и функцию их векторной доставки (Negresku, A., et al, 2022). Наночастицы оксидов церия (CeO_2 нч) и цинка (ZnO нч) за счёт липофильности, малого размера, большой удельной поверхности, антиоксидантных, антибактериальных свойств могут быть использованы как в качестве действующих, так и вспомогательных веществ в комбинированных дерматологических и ранозаживляющих средствах (Hajra, K., et al, 2024).

Учитывая преимущества возможных комбинаций водорастворимых оксопиримидинов и наночастиц оксидов металлов, а также отсутствие на российском фармацевтическом рынке дерматологических и ранозаживляющих МЛФ, разработка технологии комбинированных МЛФ ксимедона и 5-ФУ с наночастицами оксидов металлов является актуальной.

Степень разработанности темы исследования.

Возможность использования наночастиц оксидов металлов как носителей АФС была изучена рядом авторов (Kotrange, H., et al, 2021; Shcherbakov, A. B., et al, 2020; Yusefi, M., et al, 2021). В работах (Yusefi, M., et al, 2021; Мельникова О. А., и др., 2021) показана эффективность наночастиц оксида железа как носителя 5-ФУ. Авторами (Satpathy, S., et al, 2024) предложено использовать наночастицы оксида церия в комбинации с 5-ФУ для местного лечения рака. В этих работах продемонстрирован синергетический эффект и роль наночастиц как вектора доставки. Наночастицы оксида церия хорошо зарекомендовали себя как компоненты раневых покрытий, как миметики ферментов (СОД, каталаза и др.) (Nosrati, H., et al, 2023).

Авторами (Jiang, J., et al, 2018) показана перспективность использования наночастиц оксида цинка не только как вектор доставки, но и как антибактериального агента с антиоксидантными свойствами в наружных МЛФ

(Ahmed, B., et al, 2018). В литературе показаны успешность комбинирования антибактериальных препаратов и наночастиц оксида цинка (Ghasemi, F., et al, 2016), а также их комбинация с природными БАВ (Amiri, E., et al, 2024).

Несмотря на многочисленные литературные данные по созданию комбинированных препаратов АФС с наночастицами оксидов цинка и церия и промышленное производство данных наночастиц в России практически отсутствует. Проблема создания комбинированных МЛФ 5-ФУ и ксимедона осложняется тем, что отсутствуют МЛФ данных субстанций.

Цель исследования

Целью данного исследования является фармацевтическая разработка дерматологической мягкой лекарственной формы растворимых оксопиримидинов – ксимедона и 5-фторурацила, с наночастицами оксидов металлов – цинка и церия.

Задачи исследования:

1. Обосновать варианты комбинаций оксопиримидинов (ксимедона и 5-фторурацила) с наночастицами оксидов металлов (цинка и церия) как элемент повышения биодоступности оксопиримидинов и фармакологического действия.
2. Оценить цитотоксичность комбинации 5-фторурацила с наночастицами оксида церия.
3. Выбор гелеобразователя и методов приготовления комбинированных гелей 5-фторурацила с наночастицами оксида церия и ксимедона с наночастицами оксида цинка.
4. Разработать состав и технологию получения стабильного комбинированного геля 5-фторурацила с наночастицами оксида церия и провести оценку качества лекарственной формы.
5. Разработать состав и технологию получения стабильного геля ксимедона с наночастицами оксида цинка, провести оценку качества лекарственной формы и исследовать ранозаживляющие свойства на модели ожоговой раны.

6. Разработать протокол валидации методики оценки высвобождения ксимедона и 5-фторурацила с использованием ячейки Франца.
7. Оценить кинетику высвобождения ксимедона и 5-фторурацила из комбинированной мягкой лекарственной формы
8. Изучить биологическую активность геля ксимедона с наночастицами оксида цинка на модели ожоговой раны.

Научная новизна

Разработанные мягкие лекарственные формы гидрофильных субстанций имеют оригинальный состав по наночастицам оксидов металлов и вспомогательным веществам, не представлены на фармацевтическом рынке и не описаны в литературе.

При разработке состава мягкой лекарственной формы:

1. Впервые предложена методика получения CeO_2 нч в матрице ГЭЦ, доказан их стехиометрический состав и разработан состав комбинированной МЛФ 5-ФУ с CeO_2 нч;
2. Впервые продемонстрировано синергетическое действие 5-ФУ и CeO_2 нч по исследованию цитотоксичности на клеточных линиях меланомы и колоректального рака.
3. Впервые разработана ранозаживляющая МЛФ ксимедона и ZnO нч, продемонстрировавшая высокую эффективность на модели ожоговой раны на крысах.
4. Разработан валидационный протокол оценки высвобождения оксопиримидинов из МЛФ с использованием вертикальной диффузионной ячейки Франца: ксимедона с ZnO нч и 5-ФУ с CeO_2 нч.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в комплексном обосновании оригинального состава и технологической схемы получения комбинированных дерматологических мягких лекарственных форм.

Включение наночастиц оксидов металлов в состав мягких лекарственных форм 5-фторурацила и ксимедона позволяет выполнять роль векторов доставки, а также обеспечить синергетическое действие с оксопиримидинами. Синтез наночастиц оксида церия в матрице гидроксиэтилцеллюлозы позволяет обеспечить стабильность наночастиц, их устойчивость к агрегации.

Практическая значимость диссертационного исследования состоит в разработке оригинального компонентного состава, а также технологии мягкой лекарственной формы ксимедона с ZnO нч и 5-фторурацила с CeO₂ нч, которые могут быть внедрены в фармацевтическом производстве. Разработанный протокол валидации количественной оценки высвобождения 5-фторурацила и ксимедона из комбинированной мягкой лекарственной формы с использованием вертикальной диффузионной ячейки Франца был использован в научно-исследовательской деятельности государственного автономного учреждения здравоохранения «Нижегородский областной центр по контролю качества и сертификации лекарственных средств» Министерства здравоохранения Нижегородской области (акт апробации от 21.01.2025 г.) и научно-исследовательской и учебной работе фармацевтического отделения государственного бюджетного профессионального образовательного учреждения Нижегородской области «Нижегородский медицинский колледж» (акт внедрения от 20.01.2025 г.).

Методология и методы исследования

В диссертационной работе использованы технологические, биофармацевтические, физико-химические, фармакологические, биологические, статистические методы. Обработку результатов исследования проводили с использованием элементарной статистики. Экспериментальные работы были проведены на современном технологическом и аналитическом оборудовании, прошедшем аттестацию. Средства измерения, примененные в работе, имеют свидетельства о поверке.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования цитотоксичности наночастиц оксида церия и их комбинаций с 5-фторурацилом на клеточных линиях меланомы и колоректального рака
2. Результаты по разработке технологии синтеза наночастиц оксида церия в матрице полисахаридов
3. Результаты по разработке состава и технологии комбинированного геля 5-фторурацила с наночастицами оксида церия и технологическая схема его производства
4. Результаты по разработке спецификации показателей качества комбинированного геля 5-фторурацила с наночастицами оксида церия и по оценке высвобождения 5-фторурацила
5. Результаты по разработке состава и технологии комбинированного геля ксимедона с наночастицами оксида цинка и технологическая схема его производства
6. Результаты по разработке спецификации показателей качества комбинированного геля ксимедона с наночастицами оксида цинка и по оценке высвобождения ксимедона
7. Результаты исследования ранозаживляющего действия на модели ожоговой раны комбинированной мягкой лекарственной формы ксимедона с наночастицами оксида цинка

Апробация результатов

Основные положения работы доложены на: XXV Всероссийской конференции молодых учёных-химиков (Нижний Новгород, 2022); 76-ой Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых “Биосистемы: организация, поведение, управление” (Нижний Новгород, 2023); Всероссийской научно – практической конференции,

посвященной 15-летию создания фармацевтического отделения на факультете фундаментальной медицины МГУ “Образование и наука – стратегическая платформа для будущего фармации” (Москва, 2023); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов – 2024” (Москва, 2024); XXVII Всероссийской конференции молодых ученых-химиков (с международным участием), (Нижний Новгород, 2024); 6-й Российской конференции по медицинской химии, приуроченной к празднованию 300-летия Российской академии наук (Нижний Новгород, 2024).

Соответствие паспорту специальности

Диссертация соответствует паспорту научной 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 биоаналитических методик. Исследование стабильности лекарственных средств.

Публикации

Результаты основных этапов проведенного исследования опубликованы в ведущих научных фармацевтических изданиях, несут в себе теоретическую и практическую ценность для фармацевтической науки и практики.

По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, среди которых 3 статьи в изданиях, включенных в международные базы Scopus и Web of Science.

Личное участие автора

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 кафедры аналитической и медицинской химии, ДПИ НГТУ им. Р.Е. Алексеева,

кафедры химических и пищевых технологий и ГАУЗ НО НОЦККСЛС. Автор проводил разработку состава и технологии новой комбинированной лекарственной формы ксимедона и 5-фторурацила в виде гелей с наночастицами оксидов металлов.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 162 страницах машинописного текста, состоит из введения, литературного обзора (глава 1), экспериментальной части, в которой описаны материалы и методы исследования (глава 2), две главы результатов собственных исследований и их обсуждения по разработке геля 5-ФУ с CeO_2 нч (глава 3) и по разработке геля ксимедона с ZnO нч (глава 4), заключения, списка работ, опубликованных по теме диссертации, списка литературы, включающего 30 отечественных и 120 иностранных источников, 6 приложений. Диссертация содержит 29 таблиц и 41 рисунок.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В литературном обзоре нами рассмотрены основные подходы и препятствия к созданию эффективных МЛФ полярных гидрофильных АФС на примере ксимедона и 5-ФУ, методы оценки высвобождения полярных АФС из МЛФ и составы известных МЛФ ксимедона и 5-ФУ.

Одним из требований ГФ XI и XV, предъявляемых к МЛФ, они должны быть однородными, равномерно распределенными в основе и сохранять стабильность (быть агрегативно и кинетически устойчивыми в течение всего срока годности, предусмотренного НД) [1, 2]. Для полярных водорастворимых АФС - 5-ФУ и ксимедона, этим требованиям удовлетворяют гидрофильные основы или гидрогели. Гидрогели являются перспективными системами доставки лекарств, которые отвечают требованиям точного направления лекарств к целевому месту и управления высвобождением лекарств. Гидрогели обеспечивают ряд преимуществ по параметрам - биосовместимости и контролируемому высвобождению лекарств [1, 3-6]. Недостатками гидрогелей является низкая биодоступность полярных АФС, к которым относятся ксимедон и 5-ФУ, обусловленная сложностью проникания через роговой слой кожи.

1.1. Особенности строения кожи и возможности проникания полярных активных фармацевтических субстанций в системный кровоток

Для разработки мягких лекарственных форм полярных пиримидиновых соединений необходимо учитывать основные требования к составу и технологии, определяющиеся особенностью строения кожи (рисунок 1.1).

Кожа имеет сложное строение, и состоит из двух четко разделённых слоев - эпидермиса и дермы, под которой находится подкожная клетчатка или гиподерма [7]. Эпидермис состоит из нескольких слоев и различных типов клеток, имеющих решающее значение для его функционирования. От самых глубоких до самых поверхностных, эпидермальные слои — это *stratum basale*,

stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum и stratum corneum. stratum basale, также известный как stratum germinativum, отделен от дермы базальной мембраной (базальной пластинкой) и прикреплен к ней полудесмосомами.

Роговой слой имеет от 20 до 30 клеточных слоев и занимает самый верхний эпидермальный слой и состоит из кератина и мертвых кератиноцитов, которые образуют роговые чешуйки. Этот слой имеет самую изменчивую толщину, особенно в огрубевшей коже [8].

Другими важными липидами являются стеролы и жирные кислоты. Вместе с церамидами они составляют практически все липиды кожи. К стеролам относятся холестерол, холестерилсульфат и холестерилгликозид. Холестерол составляет приблизительно 20% от веса липидов, играет важную роль в барьерной функции [9]. Свободные жирные кислоты (пальмитиновая, стеариновая, олеиновая и др. [10]) составляют около 25% всех липидов. К ним относятся кислоты. Кроме того, кожный барьер содержит фосфолипиды, воска, углеводороды и триглицериды. Фосфолипиды составляют около 5% от всех липидов рогового слоя, играя важную роль при создании мембранных бислоев [11].

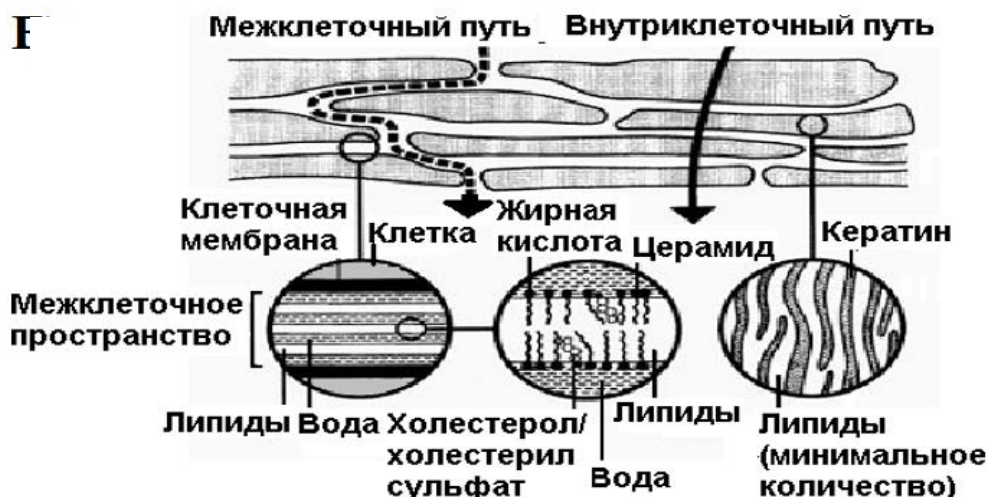


Рисунок 1.1 - Схематическая иллюстрация проникания лекарственных веществ через роговой слой кожи [7].

Кожный барьер состоит из двух уровней липидного барьера. Первый

уровень барьера обусловлен сильно неполярными липидами, такими, как жирные кислоты, триглицериды и т. д. Второй уровень барьера опосредуется полярными сфинголипидами и полярным холестеролом.

Дерма (corium) состоит в основном из неплотно связанной ткани, состоящей из фиброзного белка – коллагена и волокон эластина, внедренных в аморфное основание, состоящее из гликозаминогликанов (мукополисахаридов, главным образом производных гиалуронатов) и белковых комплексов. Дерма составляет большую часть кожи и обладает вязкоэластичными свойствами. Межклеточное вещество содержит кровеносные и лимфатические сосуды, нервы и пронизано эпидермальными придатками – потовыми, апокринными и сальными железами, волосными фолликулами [12].

Ключевой проблемой применения мягких ЛФ является доставка АФС, зависящая от проникания через кожу до кровеносных сосудов. Клетки рогового слоя эпидермиса представляют собой непреодолимый барьер для большинства веществ, за исключением молекул воды. В настоящее время доказано, что основными путями проникновения различных веществ через неповрежденную кожу является 2 пути: трансфолликулярный и трансэпидермальный. В начале проникновения для веществ более доступными являются протоки потовых, сальных желез и волосные фолликулы (трансфолликулярные пути), в силу низкого анатомического препятствия в этих местах. Они обеспечивают достаточно высокую постоянную диффузию экзогенных веществ в зависимости от их липофильности. Для проникновения гидрофильных веществ преимущественным путем проникновения являются протоки потовых желез, а для гидрофобных - протоки сальных желез (рисунок 1.2):

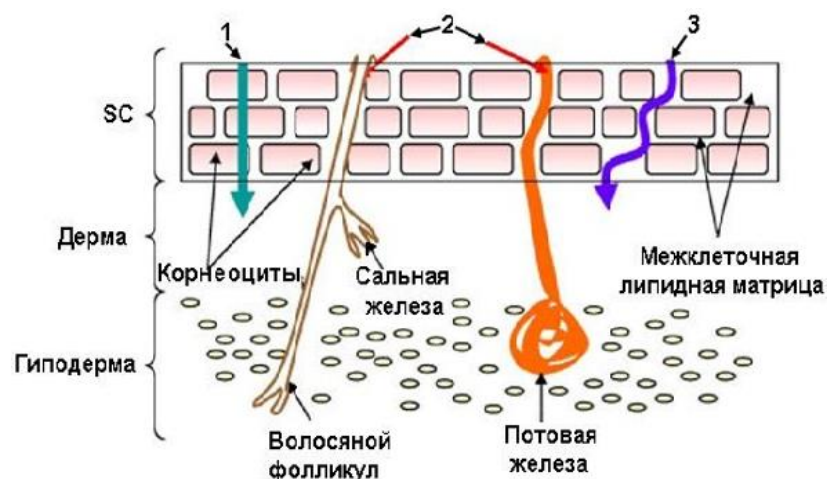


Рисунок 1.2 - Схематическое изображение путей проникновения лекарственных веществ через кожу до системного кровотока [7].

Для медленно проникающих веществ эти пути могут обеспечивать достаточно высокую степень проникновения. Однако, в связи с тем, что площадь дополнительных (фолликулярных) каналов очень мала, основную роль в проникновении экзогенных веществ играет трансэпидермальный путь, в результате чего устанавливается равномерная диффузия, скорость которой пропорциональна концентрации активного вещества. При трансэпидермальном проникновении вещество может проходить через клеточные слои, клеточные мембраны (трансцеллюлярно) и по межклеточным щелям (интрацеллюлярно). Если вещество проникает через волосяные фолликулы или потовые протоки, то в сосудистую систему кожи оно проникает трансцеллюлярно.

Биодоступность АФС, предназначенных для местного применения, зависит от двух основных факторов – растворения в водных растворах и сродства к биологическим мембранам кожи (липофильности). Молекулы 5-ФУ и ксимедона имеют малый коэффициент распределения октанол/вода: - 0,89 и -0,65, соответственно, достаточно высокие константы ионизации: 8,02 [13] (5ФУ - слабая кислота) и 3,45 [14] (ксимедон – слабое основание) соответственно. Теоретически рассчитанные значения pK_a для основного атома азота ксимедона соответствовало более сильной основности и равно

2,01.

Перечисленные физико-химические характеристики этих оксопиримидинов обуславливают низкую абсорбцию и чрескожное проникание, будучи классифицированные как препараты класса III по биофармацевтической системе классификации FDA. Эта классификация предполагает препараты с высоким сродством к физиологическим мембранам и низкой проницаемостью через биологические мембраны кожи. Следовательно, при местном применении этих препаратов, они плохо абсорбируются здоровыми тканями кожи. В связи с этим, для достижения фармакологических эффектов, составы МЛФ содержат высокие дозы АФС. Так, например, в ряде патентов описываются составы кремов и гелей ксимедона, в которых концентрация действующего вещества достигает 10% [15-20]. Существуют лосьоны 5-ФУ в концентрации 1 и 2% и крем в концентрации 5% [21-22]. При этих высоких концентрациях возможно проявление множество побочных эффектов, таких как эритема, сухость, эрозия, жжение, боль и отек, в связи с чем пациенты отказываются от местной терапии [23].

Принято считать, что, препараты с доминирующим гидрофильным характером также могут проникать через межклеточный путь вдоль гидратированных гидрофильных групп липидов (жирных кислот, фосфолипидов, холестерина, холестерилсульфата и др.) [24]. Корнеодесмосомальный путь проникания также возможен для гидрофильных препаратов. В этом случае гидрофильные АФС проникают в роговой слой по гидрофильной белковой оболочке корнеоцитов и богатых белком корнеодесмосом.

Улучшение проникания гидрофильных АФС обычно осуществляют с использованием системы доставки лекарственных веществ, таких как эмульсии, наночастицы - твёрдые липидные, наночастицы оксидов металлов, липосомы, трансферсомы, ниосомы, полимеросомы и др., конъюгаты с

белками, наногели, дендримеры, углеродные нанотрубки и др.

Таким образом, учитывая сложную структуру кожи и пути проникания гидрофильных и полярных АФС, при разработке МЛФ для наружного применения с минимальными побочными эффектами необходимо разрабатывать их составы, включающие компоненты, улучшающие доставку ЛВ.

1.2. Подходы к увеличению липофильности полярных гидрофильных субстанций при создании лекарственных средств

Одним из приемов, улучшающих проникание малых полярных молекул через кожу, является заключение этих веществ либо липофильную оболочку различных наноконтейнеров, либо в их гидрофильную полость. Наиболее изученными наноконтейнерами являются липосомы, ниосомы, трансферсомы, полимеросомы и др., размер которых не превышает 100-200 нм. В настоящее время разработаны технологии получения таких наноразмерных частиц и существуют много промышленных ЛС [1]. В частности, липосомальные ЛФ известны и для 5-фторурацила. С использованием липосомальной технологии можно получать как наружные ЛС в виде мазей, гелей, эмульсий, кремов, так и инъекционные ЛС. Однако, несмотря на интенсивные разработки в этой области, остается много нерешенных проблем в технологии их изготовления (сложность производства, стерилизации, стабильности и др.).

Альтернативным приемом, более экономичным и технологически более простым, является улучшение проникания АФС через кожный барьер за счет твердых наночастиц с высокой удельной поверхностью, которые способны сорбировать или иммобилизовать полярные АФС [25]. К таким наночастицам относятся наночастицы оксидов металлов, таких как оксиды титана, железа, цинка, меди, церия и др. В результате модификации наночастиц оксидов металлов лекарственными веществами, их поверхность становится более липофильной, что облегчает проникание через роговой слой кожи.

Модифицированные АФС наночастицы оксидов металлов могут быть введены как в гидрофильную, так и в липофильную основы для получения различных МЛФ (гели, мази, кремы, лосьоны). При оптимизации состава МЛФ с наночастицами оксидов металлов и АФС, необходимо учитывать свойства основы МЛФ, компоненты основы, природу носителя и наночастиц оксидов металлов. В литературном обзоре мы подробно остановимся на свойствах полимеров, входящих в состав гидрофильной основы МЛФ.

1.2.1. Полимеры и их роль в составе мягкой лекарственной формы

Гидрогели являются удобным вариантом МЛФ для полярных субстанций и представляют собой материал, состоящего из трехмерных полимерных сетей, которые обладают способностью поглощать и удерживать воду или биологические жидкости, сохраняя при этом свою структурную целостность [26–28]. Межмолекулярные взаимодействия полиионов и неионизированных фрагментов полимера как с лекарственными веществами, так и с наночастицами оксидов металлов, а также ЛВ с наночастицами оксидов металлов способны стабилизировать гелевую систему, придавая ей агрегативную и кинетическую устойчивость, стабильность фармацевтической композиции при хранении. Кроме того, гелевая сетка полимеров способна восстанавливаться после напряжения (тиксотропность), что дополнительно обеспечивает стабильность фармацевтической композиции. В настоящем обзоре мы рассматриваем наиболее часто используемые группы синтетических гелеобразующих полимеров, за исключением кремнийорганических, и природных полимеров.

Гелеобразователи из природных полимеров - целлюлозы, коллагена, альгинатов, хитозана, гиалуроновой кислоты и др. представлены в таблице 1.1. Такие гидрогели обладают такими преимуществами, как их сходство с естественным внеклеточным матриксом, который поддерживает рост клеток и регенерацию тканей.

Синтетические полимерные гидрогели обладают несколькими преимуществами, включая регулируемые свойства, воспроизводимость и возможность включения различных функций для конкретных применений [29, 30] и находят применение в различных областях, включая системы доставки лекарств, тканевую инженерию, биосенсоры и заживление ран [31]. В таблице 1.2 представлены некоторые примеры синтетических полимеров, используемые для приготовления МЛФ.

Водные растворы полимеров представляют собой эффективную гидрофильную основу. Условно, гидрофильные основы можно подразделить на растворы модифицированных природных полимеров и растворы синтетических полимеров. В таблице 1.1 систематизированы примеры гидрофильных МЛФ с различными АФС.

Таблица 1.1 - Некоторые примеры модифицированных природных полимеров, используемых для приготовления гидрофильных МЛФ

Полимер	ЛФ	АФС	Примечание	Ссылка
Метилцеллюлоза	пленки, гели	Прокаина г/х, эфедрина г/х Траниласт	Контролируемое высвобождение ЛВ	[32]
Гидроксипропил метилцеллюлоза (ГПМЦ)	пленки, линименты	Никорандил	Растворитель спирт-вода (70:30), использование транскутантов - лимонен	[33]
Гидроксиэтил Целлюлоза (ГЭЦ)	пленки, гели, ТТС	Келлин	Невысокая антимикробная активность, хорошо растворима в воде	[34]
Na-КМЦ	гели, пленки	Лидокаина г/х	Использование в комбинации с желатином	[35]
Альгинаты (К, Na, Са)	гели	Селегилин	Дополнительное добавление плуроников	[36]
Гиалуроновая кислота и её соли	гели	Бычий сывороточный альбумин	Усилитель проникновения для биомакромолекул	[37]

Продолжение таблицы 1.1

Пектин	ТТС	Азиатиковая кислота	Биоразлагаемый полимер, нетоксичен	[38]
Хитозан	Гели, пленки	Теofilлин	Дополнительное использование нанокристаллической целлюлозы	[39]
Желатин	Гели	Доксорубин	Модифицирование желатина метакриловым ангидридом для усиления проникновения	[40]
Декстран	ТТС	5-фторурацил	Использованием наночастиц ацетатфталата целлюлозы, покрытых декстраном	[41]
Геллан	Гели	Небиволол	Биосовместимость	[42]

Природные полимеры типа альгинатов, геллана и гиалуронатов в виде солей К, Na, Ca, пектин, хитозан, декстран, желатин в большей степени подвергаются микробной контаминации и требуют дополнительного введения различных консервантов и стабилизаторов. Кроме того, перечисленные полимеры более дорогостоящие, что затрудняет их внедрение в широкую фармацевтическую практику, несмотря на их высокую эффективность. В фармацевтической технологии находят применение более дешевые синтетические водорастворимые эфиры целлюлозы, например, ГЭЦ, Na-КМЦ.

Эфиры целлюлозы имеют различные показатели вязкости в больших пределах, сохраняя высокую вязкость в широком интервале pH (4,0 – 9,0), устойчивы при нагревании, выдерживают автоклавирование и стерилизацию при высоких температурах, индифферентны, устойчивы в растворах электролитов и могут использоваться для изготовления дерматологических и ранозаживляющих гелей. Поскольку целевой установкой фармацевтической

разработки являлось создание комбинированной МЛФ с наночастицами оксидов металлов, поверхность которых содержит ионы этих металлов, то в качестве гелеобразователя удобнее использовать ГЭЦ, МЦ, ГПМЦ или ГПЦ, не содержащие ионов натрия. С другой стороны, при гелеобразовании в присутствии ионов переходных металлов, таких как цинк, церий, железо и др. желательно наличие у полимеров достаточного количества гидроксильных групп, способных участвовать в комплексообразовании с ионами металлов, но не несущих чётко выраженный заряд. В особенности это свойство полисахаридов важно при введении в систему наночастиц оксидов металлов. Так, в ряде работ [43, 44] доказано образование комплексов ионов на поверхности наночастиц оксидов металлов с гидроксильными группами полисахаридов (рисунок 1.3).

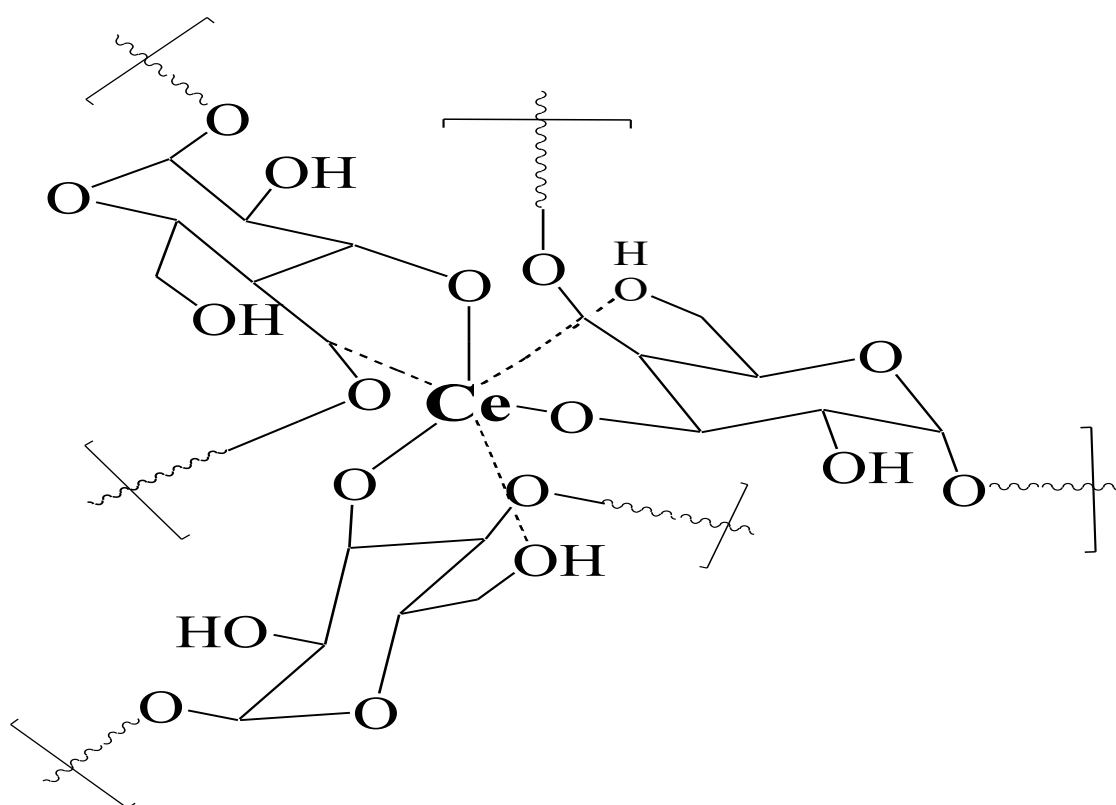


Рисунок 1.3 - Схематическая иллюстрация взаимодействия ионов церия с полисахаридами [44].

Полисахариды, в этом случае, могут выступать не только в качестве гелевой основы, но и стабилизировать наночастицы оксидов металлов. Гидроксильные группы неионизованных полисахаридов, таких как ГЭЦ, ГПМЦ, МЦ в геле позволяют вводить как АФС, являющиеся как слабыми кислотами, так и слабыми основаниями.

Из синтетических полимеров для приготовления гидрофильной гелевой основы наибольшее применения нашли редкосшитые полимеры полиакриловой кислоты, полуксамеры, полилактиды и др. (таблица 1.2)

Таблица 1.2 - Некоторые примеры синтетических полимеров, используемые для приготовления гидрофильных МЛФ

Полимер	ЛФ	АФС	Примечание	Ссылка
Полиакриловая кислота, акрилаты	ТТС	Леводопа, Карбидопа	Использование в комбинации поливинилового спирта	[45]
	ТТС	Капсаицин	Использование липидных наночастиц для усиления проникания	[46]
	Гели, ТТС	Атенолол	Комбинация с наночастицами MoS ₂ для усиления проникания	[47]
Полуксамеры	Гели	Паэнол	Улучшение физических свойств гидрогеля при добавлении Na-КМЦ	[48]
Поливиниловый спирт	Микроиглы	Доксорубицин	Прививка фосфорилхолиновых производных для усиления проникания	[49]

В ряду полиакриловых кислот наибольшее распространение нашли карбополы (карбомеры). Эти полимеры хорошо диспергируются в воде с образованием вязких коллоидных растворов, нейтрализованных растворами щелочей, триэтиламина и др. основаниями до нужного pH. Карбополы образуют прозрачные гели, структурную сетку которых образуют как кислотные группы, так и карбоксилатные. После нейтрализации основаниями в полимерной сетке присутствуют как отрицательно заряженные карбоксилатные группы, так и неионизованные карбоксильные группы, отдельные фрагменты (рисунок 1.4). В случае АФС слабого основания, например, ксимедона, он может выступать в качестве основания, образуя полимер-коллоидные комплексы.

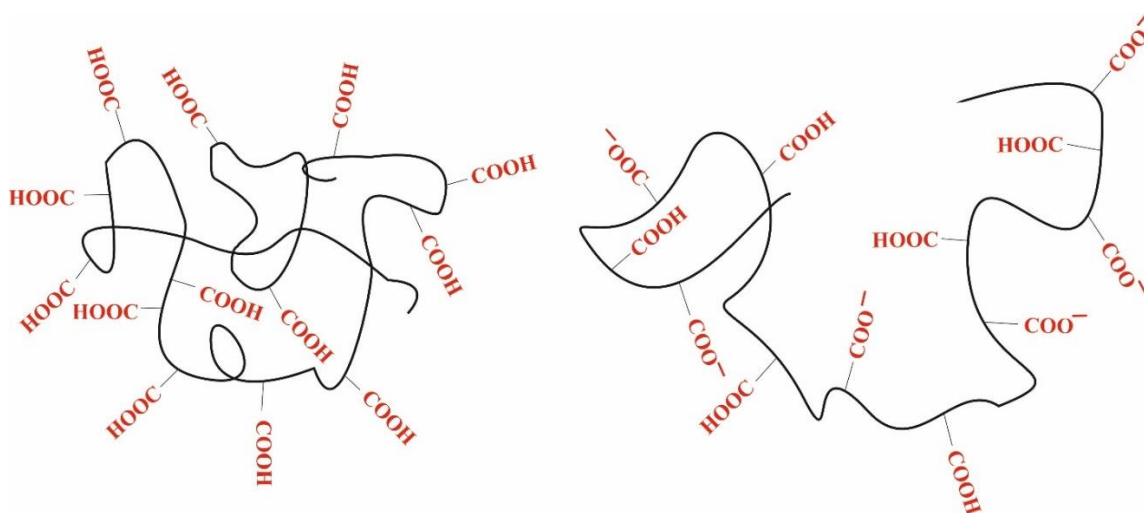


Рисунок 1.4 - Схематическая иллюстрация гелевой сетки акрилатов типа карбопола до и после нейтрализации [1]

Карбополы, в отличие от многих гелеобразующих полимеров, способны обеспечить готовым МЛФ пролонгированное высвобождение. Скорость высвобождения АФС будет зависеть от плотности перекрестных сшивок и позволяет контролировать высвобождение увеличением концентрации полимера или АФС. Другим достоинством использования карбополов является тот факт, что их гели способны образовывать устойчивые

наносуспензии без дополнительного введения эмульгаторов и стабилизаторов. Гели карбополов, также как и модифицированные производные целлюлозы могут подвергаться стерилизации автоклавированием, гамма-излучением, а также индивидуальной стерилизации компонентов и изготовлением в асептических условиях. Введение в эти гели бактерицидных наночастиц оксида цинка позволяет обеспечить стабильность по отношению к микробиологической чистоте.

Таким образом, выбор полимера для гидрофильной основы зависит от природы и физико-химических свойств лекарственного вещества, выбранного полимера, стабильности, его функционального значения и стоимости. Учитывая стоимость и стабильность водорастворимых производных целлюлозы, таких как ГЭЦ и полиакрилатов, они могут быть использованы для приготовления гидрофильных основ для МЛФ водорастворимых оксопиримидинов.

1.2.2. Доставка на векторе – наночастицах оксидов металлов (оксидов железа, цинка, церия)

Наночастицы оксидов металлов – TiO_2 , ZnO , CeO_2 , Fe_3O_4 , CuO и др. рассматриваются как перспективная платформа для создания систем доставки лекарственных средств. Они легко синтезируются, биосовместимы, их поверхность может быть функционализирована [50-53]. TiO_2 нч наиболее часто используются как компоненты солнцезащитных средств [54], а магнитные оксиды железа (II, III) позволяют дополнительно осуществлять одновременно контроль распределения препарата [55]. В настоящем обзоре основное внимание уделено бактерицидным наночастицам оксидов цинка и церия, проявляющие комплекс дополнительных фармакологических эффектов, необходимых для создания дерматологических МЛФ.

Ионы цинка и ZnO нч выполняют роль векторов доставки [56] положительно влияют на синтез коллагена [57, 58], препятствуют

антибиотикорезистентности [59], активируют иммунную систему [60], проявляют антиоксидантные свойства [61, 62], и также являются специфическим светофильтром, защищая кожу от ожогов [63]. ZnO нч являются АФС, которая часто используется для местного применения (мази), о чем свидетельствует разнообразие компаний, выпускающих ZnO нч (таблица 1.3)

Таблица 1.3 - Производители наночастиц оксида цинка в РФ (20-100 нм)

№	Производитель	Адрес
1*	Общество с ограниченной ответственностью "Тульская фармацевтическая фабрика" (ООО "Тульская фармацевтическая фабрика")	300004, г. Тула, Торховский проезд, д. 10
2	ОАО "Ивановская фармацевтическая фабрика"	153007, Иваново, ул. Генерала Горбатова, д. 19а
3	Закрытое акционерное общество "Ярославская фармацевтическая фабрика" (ЗАО "ЯФФ")	150030, г. Ярославль, ул. 1-я Путевая, д. 5
4*	Открытое акционерное общество "Самарамедпром" (ОАО "Самарамедпром")	Самарская обл., Волжский район, пгт. Петра Дубрава, на территории завода "Коммунар", здание №2 Самарская обл., г. Чапаевск, ул. Ленина, д.99Б
5	Закрытое акционерное общество "Московская фармацевтическая фабрика" (ЗАО "Московская фармацевтическая фабрика")	125239, г. Москва, Фармацевтический проезд, д. 1
6*	Акционерное общество "Усолье-Сибирский химико-фармацевтический завод" (АО "Усолье-Сибирский химфармзавод")	665462, Иркутская обл., г. Усолье-Сибирское, северо-западная часть города, с северо-восточной стороны, в 115 метрах от Прибайкальской автодороги
7*	ЗАО "Ласкрафт"	420095, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Восстания, д. 100, зд. 248
8	ОАО "Тверская фармацевтическая фабрика"	170024, г. Тверь, Старицкое шоссе, д. 2
9*	Общество с ограниченной ответственностью "ЮжФарм" (ООО "ЮжФарм")	Краснодарский край, Крымский муниципальный район, с.п.Троицкое, ст-ца Троицкая, тер. Нефтепромплощадка

*действующее производство

В последние 10-20 лет появилось много публикаций по потенциальному

использованию как солей церия [64-67], так и наночастиц оксида церия [68-72]. Известным препаратом нитрата церия (III) являются раствор и противоожоговая ранозаживляющая мазь, широко используемая в различных клиниках мира и известная под торговым названием “Flammacerium” [73, 74]. Нитрат церия (III) проявляет антиоксидантные, антибактериальные свойства и способствует заживлению ран с минимальным рубцеванием. Известны противоопухолевые свойства солей Ce^{4+} [75-77]. В многочисленных публикациях доказано цитотоксическое действие наночастиц оксида церия (IV), а также свойства, присущие ферментам антиоксидантной защиты [78-81].

Наночастицы оксида церия как вспомогательное вещество для фармацевтических требований производят ряд следующих компаний: Advanced Abrasives Corporation, USA (PremaLox C[®]); Edgetech Industries LLC, USA (Cerium oxide[®]); Lorad Chemical Corporation, USA (Cerium oxide[®]); American Elements, USA (Cerium oxide[®]); Chengdu beyond chemical Co., Ltd., China (Cerium oxide[®]) ООО “Лантан”, Россия (Оксид церия[®]).

Наиболее известная продукция с наночастицами оксидов цинка и церия – это раневые покрытия или полимерные пленки, трансдермальные системы доставки, некоторые примеры которых приведены в таблице 1.4.

Таблица 1.4 - Примеры продукции медицинского назначения с наночастицами оксидов металлов

Наночастицы	ЛФ	Состав	Фармакологический эффект	Ссылка
ZnO	Полимерные пленки	БЦ	Ранозаживляющий	[82]
ZnO	Полимерные пленки	БЦ	Ранозаживляющий	[83]

ZnO	Пленки	БЦ	Ранозаживляющий	[84]
ZnO	Гель	ГЭЦ	Ранозаживляющий, противоожоговый	[85]
CeO ₂	Нановолокна	Поликапролактон Желатин	Ранозаживляющий	[86]
CeO ₂	Пленки	Хитозан	Ранозаживляющий	[87]
CeO ₂	Наногель	ПВС	Ранозаживляющий	[88]

Как правило, при создании препаратов CeO₂ нч вводят в виде тонкой дисперсии в органическом растворителе или в виде стабилизированного порошка, например, стабилизация полисахаридами – декстраном, мальтодекстрином [44] и акрилатами. Во всех случаях введение наночастиц такими методами приводит к агрегации наночастиц и потере стабильности системы. В связи с этим предлагаются различные методы включения CeO₂ нч в наноконтейнеры, такие как циклодекстрины, ферроцены, силиконовые микросферы и др. [89]. Эти методы включения CeO₂ нч позволяют одновременно загружать и лекарственные вещества, в том числе 5-ФУ. Альтернативным методом повышения стабильности CeO₂ нч является методика якорной прививки молекулы с химически активной группой, способной хемосорбироваться на поверхности CeO₂ нч. Примером молекулы с якорной группой являются бисфосфонаты, например, алендроновая кислота. Этот приём позволяет в дальнейшем конъюгировать активную функциональную группу бисфосфоната с полиэтиленгликолями или другими полимерами, способствующие стабильности и безопасности биосистемы [90].

Перспективным является технологическая разработка комбинированных токсичных сильнодействующих препаратов, в которых наночастицы оксидов металлов выступают элементом системы доставки. Большинство работ по токсичным пиримидиновым соединениям посвящено созданию лекарственных форм 5-ФУ в комбинации с наночастицами оксида церия или железа [91-95].

Оригинальным приемом явился синтез наночастиц оксида железа (II, III) в матрице целлюлозы, полученной из рисовой соломы, позволяющим получить материал с однородным распределением частиц как по размеру, так и по положению. Способ получения Fe_3O_4 нч заключался в обработке целлюлозы последовательно хлоридами железа (II, III), водными растворами щелочей с последующей лиофильной сушкой. Загрузку 5-ФУ в Fe_3O_4 нч - целлюлоза производят на следующем этапе и при таком методе, как загрузка, так и высвобождение 5-ФУ является эффективной [91].

Следовательно, получение наночастиц оксидов металлов в матрице полимеров является удобным методом синтеза стабильных частиц и позволяет осуществить удобную загрузку нужными АФС.

1.2.3. Лекарственные формы ксимедона и 5-фторурацила

Оксопиримидиновый спирт – ксимедон, является антиоксидантом с функциями репаранта-регенеранта и его фармакологическая активность широко исследовалась при различных заболеваниях печени и др. [96]. Доказана способность ксимедона воздействовать на коллагеногенез, препятствуя образованию рубцов [97]. Способность ксимедона активизировать процессы регенерации при линейных ранах кожных покровов определена в эксперименте [98, 99]. Антиоксидантный эффект ксимедона выражается в мембраностабилизирующем действии, в большей степени на лейкоциты [96, 100, 101]. Несмотря на многочисленные экспериментальные и клинические исследования, в РЛС имеются упоминания только об одной ЛФ –

таблетки. Анализ патентной литературы продемонстрировал составы различных гелей ксимедона (таблица 1.5). Комбинированные ЛФ ксимедона с наночастицами оксидов металлов отсутствуют.

Возможность получения лучшего терапевтического эффекта при более низких дозах АФС позволяет одновременно уменьшить побочные эффекты, что достигается, как правило, доставкой субстанции с помощью наночастиц через кожу. В настоящее время в качестве носителей для 5-ФУ предложены липосомы, ниосомы и трансферсомы, загруженные 5-ФУ [102-107]. Эти наночастицы входят в состав кремов, гелей, мазей, трансдермальных пластырей и раневых повязок, в которых в доставке большое влияние определяет полимер [108, 109]. В таблице 1.5 приведены примеры ЛФ препаратов 5-ФУ.

Таблица 1.5 - Примеры лекарственных форм ксимедона и 5-фторурацила

ЛП	АФС	ЛФ	Производитель	Ссылка
Ксимедон®	Ксимедон	Табл.	ОАО “Татхимфарм препараты” (Россия)	[110]
Ксимедон (патент)	Ксимедон	МЛФ (гель)	-	[17]
Ксимедон (патент)	Ксимедон	МЛФ (гель)	-	[20]
Колегель®	5-ФУ	МЛФ (гель, наносимы на тканый материал) (Мед. изделие)	ООО “Колетекс” (Россия)	[111]
Колегель®	5-ФУ	Повязка (Мед. Изделие)	ООО “Колетекс” (Россия)	[112]

Efudex®	5-ФУ	МЛФ (крем)	Viatis Inc. (США)	[113]
Carac®	5-ФУ	МЛФ (крем)	Bausch Health US, LLC (Канада)	[114]
Flonida®	5-ФУ	МЛФ (мазь)	Shalak Pharmaceuticals Ltd. (Индия)	[115]

Использование передовых или новых технологий и комбинированная терапия позволяют увеличить эффективность лечения и снизить системную токсичность. Комбинированная терапия может включать в себя окклюзионную повязку, химиотерапию, трансдермальные системы с 5-ФУ и их комбинации [13].

Представляется важной и перспективной комбинированная химиотерапия с наночастицами оксида церия, проявляющим противоопухолевые эффекты. В работах [116] было продемонстрировано, что наночастицы оксида церия усиливают противоопухолевую активность доксорубина, действуя с цитостатиком в синергизме. В отличие от доксорубина наночастицы оксида церия не вызывают повреждения ДНК и даже защищают фибробласты кожи человека от цитотоксичности, вызванного доксорубином. Комбинирование классических цитостатиков с негенотоксичными, но противоопухолевыми наночастицами оксида церия является новой стратегией борьбы с онкологическими заболеваниями. Такой подход комбинирования цитостатика – фторофура, пролекарства 5-ФУ с наночастицами оксида церия [89]. Авторы рассматривают многократную защиту как CeO_2 нч, так и 5-ФУ в мезопористую сферу SiO_2 , β -циклодекстринов или ферроценов [89].

Таким образом, наночастицы оксидов цинка и церия являются потенциальными компонентами для комбинированных МЛФ полярных пиримидиновых соединений – ксимедона и 5-ФУ. Следует ожидать

синергизма действия и расширение фармакологического спектра при совместном введении наночастиц оксидов металлов и полярных оксопиримидинов.

1.3. Показатели качества дерматологических гелей

Показатели качества дерматологических гелей должны соответствовать общим требованиям к показателю качества МЛФ.

1.3.1. Общие требования к дерматологическим и ранозаживляющим гелям

Дерматологические и ранозаживляющие МЛФ должны соответствовать следующим фармакопейным показателям (ГФ XI-XV и зарубежные фармакопеи) [1]:

1. Однородность МЛФ по внешнему виду;
2. Соответствие массы и объёма содержимого контейнера;
3. Размер частиц
4. pH водного извлечения
5. Реологические и структурно-механические показатели (вязкость, тиксотропность, пластичность, эластичность)
6. Микробиологическая чистота (не ниже категории 3)

Изучение структурно-механических свойств МЛФ является важным этапом разработки состава и технологии ЛФ и методом контроля качества препаратов.

Важным также является оценка осмотической и адсорбционной активности, в особенности для препарата с ранозаживляющим действием. Умеренная осмотическая активность способствует удалению гноя из раны, её очищению и ускорению регенерации. Высокая осмотическая активность обуславливает неприятные ощущения на коже и слизистых и ощущение стянутости. Осмотическая активность может регулироваться природой материала. Так, осмотическая активность гидроксиэтилцеллюлозы (ГЭЦ) (Natrosol) близка к $99,21 \pm 3\%$, а осмотическая активность карбопола $96,39 \pm 3\%$,

что полностью удовлетворяет требованиям к этому показателя для гелей на основе этих полимеров.

Адсорбционную активность оценивают по сорбции метиленового синего, и эта величина должна быть не менее 0,03 г на 1 г препарата. Адсорбционная активность для ГЭЦ (Natrosol) близка к $0,031 \pm 0,004$, а адсорбционная активность карбопола – $0,620 \pm 0,031$, что полностью удовлетворяет требованиям к этому показателя для гелей на основе этих полимеров.

Особенностью дерматологических гелей являются хорошие окклюзионные свойства, намазываемость и распределяемость при высокой тиксотропности с pH 5,5-6,0. Требования для ранозаживляющих МЛФ более строгие. Для этих МЛФ, кроме высокой тиксотропности, важна значимая осмотическая и адсорбционная активность, подразумевающая высокую способность адсорбировать экссудат. Кроме того, требования к ранозаживляющим МЛФ является образование защитной пленки на ране, желательно с охлаждающим эффектом, а pH около 5,5-7,0.

1.3.2. Оценка высвобождения АФС из лекарственных форм

Высвобождение ЛВ является важным биофармацевтическим показателем и этапом для разработки наружных МЛФ. Однако, в настоящее время не существует единого подхода для оценки высвобождения ЛВ из ЛФ.

Для оценки высвобождения АФС из твердых дозированных лекарственных форм традиционно используется испытание (тест) “Растворение” (ОФС.1.4.2.0014.15). В этом случае *in vitro* изучаются сравнительное высвобождение АФС из различных ЛФ с разным составом, что позволяет контролировать качество препарата. Испытание “Растворение” осуществляют в два этапа: подготовка пробы (собственно растворение) и количественное определение, при этом протокол валидации включает оба этапа.

В связи с отсутствием унифицированных методик оценки высвобождения из МЛФ, этот процесс изучают по профилю высвобождения АФС с использованием полупроницаемых мембран и закономерностей диализа. Ввиду простоты эксперимента, наиболее частым приемом является метод равновесного диализа через полупроницаемую мембрану с использованием диализных мешков. Реже используют изучение диффузии в агар, поскольку в этом случае не достигается нужная достоверность результатов.

Диффузионные методы изучения профиля высвобождения АФС [117-125] через полупроницаемую мембрану позволяют интерпретировать результаты по высвобождению АФС, близкие к оценке высвобождения АФС из твёрдых ЛФ за счёт диффузии в соответствии с испытанием “Растворение”. В этих испытаниях в качестве полупроницаемых мембран используют:

1. Человеческую здоровую кожу или кожу с трупов;
2. Кожу животных (обезьяны, собаки, свиньи и другие крупные)
3. Полимерные мембраны (полисульфоны, смешанные эфиры ацетата/нитрата целлюлозы подходящего размера)
4. Эквиваленты кожи человека (HSE) – это ткань-инженерные трехмерные конструкции кожи (такие как продукты MatTek)

Математическое обоснование диффузионного процесса высвобождения АФС из МЛФ основывается на тех же общих закономерностях диффузии. Диффузия АФС как процесс её проникания описывается первым законом Фика [126], в котором диффузионный поток (J) характеризуется постоянным градиентом концентраций (dc/dx), который поддерживается вводом частиц ЛВ в одну область и выводом их из другой.

$$J = -D_f \cdot dc / dx,$$

где x – толщина слоя, см; D_f – коэффициент диффузии, который отражает свойство АФС проникать через мембрану за единицу времени через единицу площади, см²/с.

При интерпретации результатов высвобождения АФС привлекают кинетические данные по прониканию и используют определение потока (J) как количество проникающей АФС (Q), пересекающего мембрану, прошедшее через мембрану за время τ .

$$J = (\partial Q / \partial \tau)_{P,T} = (\partial m / \partial \tau)_{P,T} / A_s,$$

где $Q = m/A_s$, m – количество вещества, A_s – площадь, через которую идет массоперенос, τ – время.

На практике учитывают первоначальный период набухания и индукционный период, используя понятия стационарного потока. Стационарный поток (J_{ss}) представляет собой количество проникающего вещества, пересекающего мембрану с постоянной скоростью. Определяют участок кривой после индукционного периода (лаг-фазы), при этом суммарное количество высвободившегося вещества продолжает увеличиваться (рисунок 1.5). Поток (J) рассчитывается как тангенс угла наклона на участке прямой после индукционного периода (t^*).

Количество вещества, измеренное через последовательные интервалы отбора проб, существенно не отличается, это считается установившимся состоянием.

$$J_{ss} = Q / (A \cdot \tau),$$

где Q – количество вещества, транспортируемого через мембрану за время τ , а A – площадь открытой мембраны в см². Единицей стационарного потока является количество вещества/(см²·час) или количество вещества/(см²·мин).

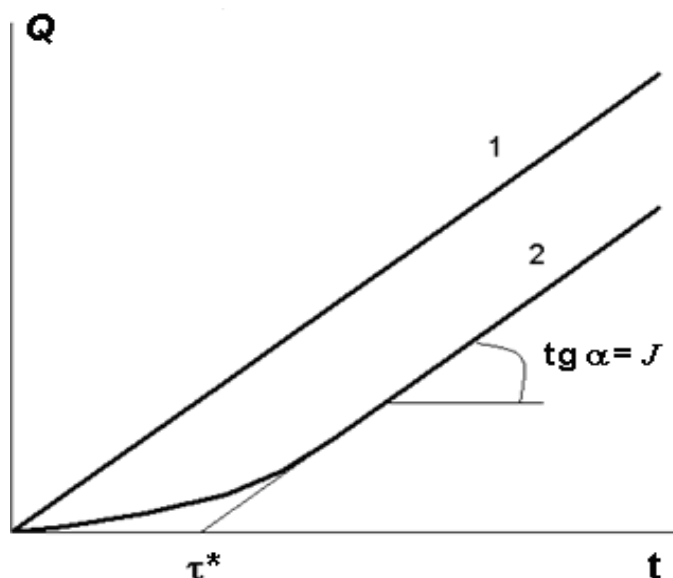


Рисунок 1.5 - Зависимость количества высвободившегося вещества при диффузионном массопереносе: 1 – стационарный поток; 2 - квазистационарный поток; τ^* – индукционный период [127]

Во всех случаях необходимо учитывать время набухания мембраны и количества вещества, впитываемого порами мембраны. Устойчивое состояние достигается, когда происходит последовательное, неизменное движение проникающего АФС через мембрану. Время, необходимое для достижения устойчивого состояния, будет зависеть от: проницаемости мембраны, имитирующую кожу и физико-химических свойств самого вещества, в том числе его липофильности.

Одним из методов оценки высвобождения АФС *in vitro* являются эксперименты с использованием вертикальной диффузионной ячейки Франца [121, 127], благодаря которой можно прогнозировать проницаемость ЛВ в системный кровоток. Используют различные виды оборудования, наиболее распространенными являются статическая ячейку Франца и ячейка непрерывного потока.

Ячейка Side-Bi-Side, представляет собой рецепторную камеру фиксированного объема, контролируемый температурой, порт для отбора проб рецепторной жидкости с перемешиваемой рецепторной жидкостью (ячейки

Side-Bi-Side позволяют перемешивать как донорскую, так и рецепторную камеру.) (рисунок 1.6)



Рисунок 1.6 - Схематическое представление ячеек Франца [128]

Областью применения таких ячеек является оценка проникновения соединений в мембрану, проникновения конечных доз, стационарного потока соединений (как по отдельности, так и в составе).

Проточная ячейка содержит приемную камеру фиксированного объема с контролируемой температурой (водяная баня или водяная рубашка). В ячейках Франца происходит перемешивание для создания непрерывного потока, что вызывает турбулентность в приемной камере. Скорость потока регулируется, что позволяет автоматизировать выборку. (Рисунок 1.7)

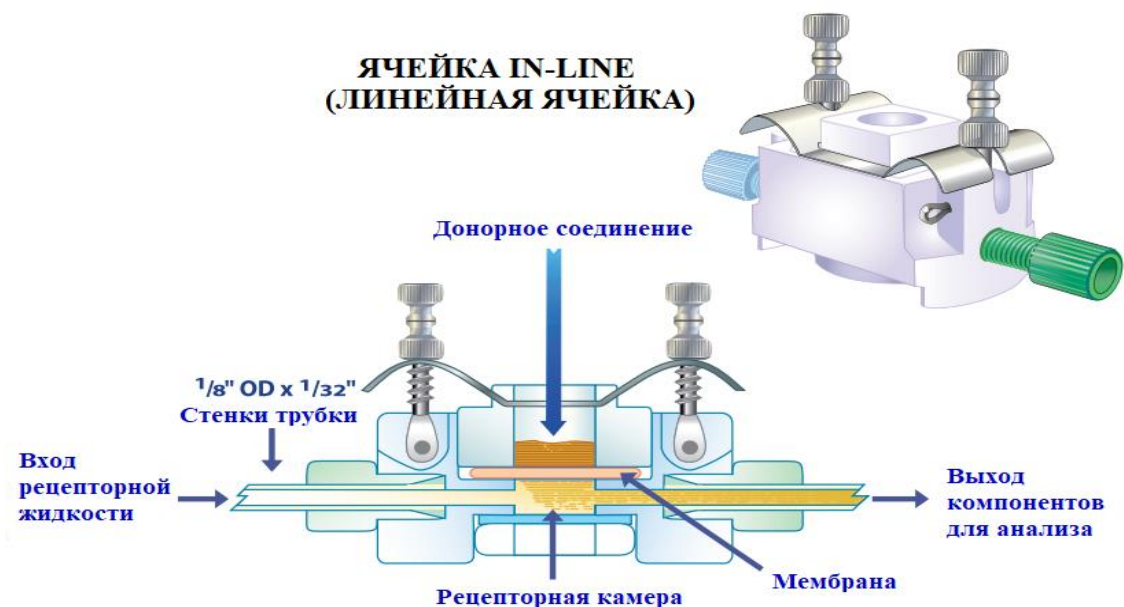


Рисунок 1.7 – Схематическое представление проточной ячейки Франца [128]

Использование ячеек Франца имитирует *in vivo* (поток соответствует кровотоку), позволяя оценивать поглощение АФС мембраной, и позволяя прогнозировать проникновение конечной или бесконечной дозы, поток в установившемся состоянии.

1.3.3. Математическое моделирование проницаемости и высвобождения с использованием ячейки Франца

При оценке высвобождения АФС через полимерную мембрану на первом этапе исследований оценивают количество (Q) АФС, высвободившегося через полимерную мембрану к определенному моменту времени (t) по зависимости Q – t, с учётом установления равновесия и набухания мембраны.

При диффузионном контроле высвобождения скорость изменения концентраций пропорциональна кривизне (второй производной) зависимости концентрации от расстояния и описывается вторым законом Фика [126]:

$$\partial C / \partial \tau = D \cdot (\partial^2 C / \partial^2 x)$$

В случае линейной зависимости $Q-t$, значение количества АФС в каждой точке (мкг/см^2) сохраняется неизменным, так как приток концентрации полностью компенсируется её оттоком (реакция нулевого порядка).

Чтобы решить уравнение диффузии, нужно четко определить краевые условия. Например, в начале процесса граничные параметры предполагают, что все частицы высвобождающегося вещества (Q) сосредоточены в одной плоскости при условии толщины мембраны, близкой к нулю.

Смысл диффузионного уравнения заключается в возможности прогнозирования концентрации вещества в любой точке системы в любой момент времени.

Оптимизация процесса производства МЛФ требует особого внимания к математическому моделированию высвобождения АФС. Моделирование кинетики высвобождения АФС из МЛФ опирается на базовые законы высвобождения АФС из твердофазных ЛФ, аналогично процессу растворения твердых материалов. Считается, что процесс растворения твердых веществ протекает в условиях "потока", где площадь поверхности при растворении меняется, кроме тех случаев, когда концентрация ЛВ превышает максимальную растворимость при достижении насыщения.

Разделение методов изучения скорости высвобождения лекарственных веществ из препаратов с регулируемым высвобождением предполагает три основных группы:

- Исследование данных включает в себя использование статистических методов, таких как многомерный анализ (MANOVA), планирование повторных измерений и подходы анализа данных [129].
- Модельные методы (реакции нулевого порядка, первого порядка, полиноминые модели Хигучи, Корсмейера-Пеппаса, Хиксона Кроуэлла, Бейкера-Лонсдейла, Вейбулла и т. д.)

- Методы, не зависящие от модели, включают коэффициенты различия (f_1) и схожести (f_2)

Определение скорости высвобождения АФС из МЛФ является обязательным и требует привлечения методов кинетического моделирования.

В основе этих методов лежат различные математические функции, моделирующие профиль растворения АФС. При определении оптимальной функции происходит оценка профиля растворения, основываясь на характеристиках производной модели, включая в себя реакции нулевого порядка, первого порядка, второго и псевдо-второго порядка, Хигучи, Хиксона-Кроуэлла, Корсмейера-Пеппаса, Бейкера-Лонсдейла, Вейбулла, Хопфенберга, Гомпертца и регрессионные модели [130-136].

Модель нулевого порядка

Лекарственное вещество, находящееся в определенной ЛФ, не способное к разрушению и постепенно высвобождающееся из матрицы полимера, может быть описано через математическое выражение следующего вида:

$$Q_{\tau} = Q_0 + k_0 \tau$$

где Q_{τ} — количество ЛВ, растворенного за время τ , Q_0 — начальное количество ЛВ в растворе (в большинстве случаев $Q_0 = 0$), а k_0 — константа высвобождения нулевого порядка, выраженная в единицах концентрация/время.

В результате проведенных исследований высвобождения ЛВ *in vitro*, продемонстрирована зависимость между временем и суммарным количеством освобожденного ЛВ. Для характеристики процесса растворения ЛВ в различных типах фармацевтических препаратов с контролируемым высвобождением, включая ТТС, матричные таблетки с малорастворимым ЛВ в оболочке, осмотические системы и прочие, можно применить эту зависимость [130-136].

Модель первого порядка

Некоторые ЛВ исследовались по модели, которая охватывает процессы их поглощения и удаления, однако теоретическое обоснование данной системы представляет собой сложную задачу. Уравнение описывает высвобождение ЛВ, которое происходит согласно кинетике первого порядка:

$$Q_{\tau} = Q_0 \exp(-k_1 \tau),$$

где k — константа скорости первого порядка, выраженная в единицах времени⁻¹.

Данное уравнение можно выразить следующим образом:

$$\log \frac{Q_0}{Q_{\tau}} = k_1 \tau / 2,303,$$

где C_0 — начальная концентрация ЛВ, k_1 — константа скорости первого порядка, а τ — время.

Данная модель применима для характеристики процесса растворения лекарственных веществ в определенной ЛФ, таких как формы с водорастворимыми АФС в пористых носителях [130-136].

Модель Хигучи

В 1961 году Т. Хигучи представил первую модель, объясняющую процесс высвобождения ЛВ из матрицы. Изначально, данная модель разрабатывалась для использования в плоских конструкциях, однако, она нашла применение во множестве геометрически разнообразных и пористых системах. Основывается данная модель на предположении о том, что:

- Растворимость вещества в матрице значительно уступает его первоначальной концентрации.
- ЛВ может высвобождаться исключительно в одном направлении, предполагая минимальность граничного влияния.
- Размер частиц ЛВ существенно уступает толщине данной системы.
- Матрица характеризуется минимальным набуханием и растворением.

- Происходит постоянная диффузия ЛВ
- В процессе высвобождения создаются оптимальные параметры для погружения.

Уравнение данной модели имеет следующий вид:

$$Q_{\tau} = k_H \tau^{1/2} = [D\varepsilon/t(2A - \varepsilon C_s)C_s \tau]^{1/2}$$

где Q_{τ} — количество ЛВ, выделившееся за время τ на единицу площади A , C — начальная концентрация ЛВ, C_s — растворимость ЛВ в матричной среде, D — коэффициент диффузии молекул ЛВ в матрице.

Это правило действует всегда, кроме тех моментов, когда ЛВ полностью истощается в системе.

Применяется данная модель для оценки характеристики процесса растворения лекарственных веществ из различных видов ЛФ с контролируемым высвобождением, например, в трансдермальных системах и таблетках с матрицей, содержащих водорастворимые АФС [129, 132].

Модель Хиксона-Кроуэлла

К. Хиксон и Д. Кроуэлл установили, что объем частицы находится в прямой зависимости от кубического корня ее площади. Уравнение было выведено следующим образом:

$$Q_0^{1/3} - Q_{\tau}^{1/3} = k_{HC} \tau,$$

где Q_0 — исходное количество ЛВ в ЛФ, Q_{τ} — оставшееся количество ЛВ в ЛФ в момент времени τ , а k_{HC} — константа, учитывающая соотношение поверхность-объем.

Уравнение представляет собой описание процесса высвобождения веществ из систем, где происходят изменения размеров частиц или таблеток, включая площадь их поверхностей и диаметры. В результате проведенных

экспериментов по изучению высвобождения ЛВ in vitro, данные о динамике процесса представлены через зависимость между временем и кубическим корнем концентрации ЛВ, остающегося в матрице. При использовании данного подхода в отношении ЛФ, например, таблеток, важно учитывать, что процесс растворения протекает вдоль плоских поверхностей, параллельных поверхностям ЛВ при условии, что размеры таблетки сокращаются пропорционально, сохраняя первоначальную геометрическую форму на протяжении всего процесса [130-136].

Модель Корсмейера-Пеппаса

Результатом совместной работы Р. Корсмейера и Н. Пеппаса стала формулировка зависимости, которая описывает процесс высвобождения ЛВ из полимерной системы:

$$\frac{Q_{\tau}}{Q_e} = k_{KP} \tau^n$$

где Q_{τ}/Q_e — доля ЛВ, высвободившаяся в момент времени τ , k_{KP} — константа скорости высвобождения, а n — показатель степени высвобождения.

Цилиндрические матрицы характеризуются разными степенями высвобождения, где значение n играет ключевую роль. В таблице 1.6 представлено описание механизма высвобождения АФС, который определяется параметром n в данной модели.

Таблица 1.6 - Интерпретация механизмов диффузии ЛВ из полимерных плёнок

<i>Показатель высвобождения (n)</i>	<i>Механизм транспорта ЛВ</i>	<i>Скорость высвобождения как функция времени</i>
0.5	Фиковская диффузия	$t^{-0,5}$
$0,45 < n < 0,89$	Нефиковский тип переноса	t^{n-1}
0.89	Случай II транспорта	Высвобождение нулевого порядка
Выше, чем 0.89	Суперслучай II транспорта	t^{n-1}

Цилиндрические таблетки имеют разные механизмы транспортировки: если $n \leq 0,45$, то это диффузия по Фику; когда $0,45 < n < 0,89$ - транспорт, который не описывается уравнением Фика; при $n = 0,89$ действует релаксационный транспорт с высвобождением вещества со скоростью нулевого порядка; и если $n > 0,89$, то это суперслучай II транспорта. Для определения степени n необходимо обращаться исключительно к участку кривой высвобождения, характеризующемуся соотношением $Q_t/Q_e \leq 0,6$. Обычно, решение уравнений процесса высвобождения решается графическим методом, выбирая координаты линейной зависимости. Например, уравнение Корсмейера-Пеппаса:

$$\frac{Q_t}{Q_e} = k_{KP} t^n$$

где, Q_t/Q_e — доля ЛВ, высвободившаяся в момент времени t , k_{KP} — константа скорости высвобождения, а n — показатель степени высвобождения; решают, строя график зависимости $y = \ln(Q_t/Q_e)$ от $x = \ln(t)$. Величина константы Корсмейера-Пеппаса K_{kp} представляет собой безразмерную величину, отражающую скорость высвобождения:

$$k_{KP} = e^n,$$

где n — экспонента высвобождения — отражает механизм транспорта ЛВ ($0,2 < n < 0,5$ — по Фику или $n > 0,5$ — не по Фику) и показывает скорость процесса как функцию времени [130-135]

Модели кинетики высвобождения ЛВ разрабатывались для того, чтобы математически описать связь между процессом растворения ЛВ и формами моделей высвобождения ЛВ. Использование модельно-зависимых методов обеспечивают адекватное выявление реальных связей между зависимыми и независимыми параметрами данных, касающихся растворения.

Таким образом, по разделу 1.3 можно сделать следующие выводы:

1. Для мягких лекарственных форм, кроме общих требований к показателям качества – однородность, соответствие массы и объёма содержимого контейнера, размера частиц, рН водного извлечения, реологические и структурно-механические показатели, микробиологическая чистота, остаётся проблемой оценка высвобождения АФС, для которой отсутствуют унифицированные методики.
2. Для интерпретации механизмов высвобождения АФС из МЛФ наиболее часто привлекаются диффузионные подходы, близкие к описанию процессов растворения и высвобождения из твёрдых ЛФ. Математическое моделирование кинетики процесса высвобождения АФС через полупроницаемую мембрану является наиболее информативным для контролируемого прогнозирования высвобождения АФС.

Общие выводы по главе 1:

1. Наночастицы оксидов цинка и церия с антибактериальными и антиоксидантными свойствами могут быть перспективными компонентами комбинированных препаратов полярных пиримидинов, таких как регенерант-репарат ксимедон и цитостатик 5-фторурацил, усиливая их фармакологические эффекты при чрескожном введении. Состав и технология получения комбинированных МЛФ для таких АФС практически отсутствуют на фармацевтическом рынке РФ.
2. Фармацевтическая разработка дерматологических мягких лекарственных форм полярных водорастворимых оксопиримидинов – ксимедона и 5-

фторурацила осложняется низкой агрегативной устойчивостью наночастиц оксидов металлов, отсутствием надёжных методов контроля качества и унифицированных методик оценки высвобождения оксопиримидинов из мягкой лекарственной формы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Реактивы

Ксимедон (1-(β -гидроксиэтил)-4,6-диметил-1,2-дигидропиримидин-2-он) (Хум) был приобретен в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова (Казань, Россия), карбопол 974Р NF (Lubrizol, Wycliff, Ohio, USA), этанол (чистота 95,0%, Vekos, Нижний Новгород, Россия), мембрана из ацетата целлюлозы ($d = 0,45$ мкм, ЛенРеактив, Санкт-Петербург, Россия), натрия хлорид (чистота 99,9%, ЛенРеактив, Санкт-Петербург, Россия), фосфат калия тригидрат (чистота 99,0%, ЛенРеактив, Санкт-Петербург, Россия), дикалий фосфат тригидрат (чистота 99,0%, ЛенРеактив, Санкт-Петербург, Россия), октанол (чистота 99,0%, ЛенРеактив, Санкт-Петербург, Россия), липоид С-80 (Shanghai Immense Chemical Co, Ltd, China), холестерин (чистота 99,0%, ЛенРеактив, Санкт-Петербург, Россия), Метилурацил® в виде мази (АО Нижфарм, Нижний Новгород, Россия), 5-Фторурацил (Xi'an Disheng Health Biotechnology Co., Ltd., Китай), гидроксиэтилцеллюлоза (Natrosol® 250 ННR, Ashland Industries, Роттердам, Нидерланды), церия нитрат гексагидрат (ООО «Химкрафт», Калининград, Россия), меглюмин (чистота 99,9%, ЛенРеактив, Санкт-Петербург, Россия), в работе также использовались образцы наночастиц оксида цинка, полученные от АО "Усолье-Сибирский химфармзавод" размером 20-100 нм. Вода деионизованная (ФС 42-0324-09), полученная на установке системы очистки воды «Elix 3» с картриджем Progard («Millipore», France), удельное сопротивление менее 0,2 мкСм с рН 5,5 при температуре $20 \pm 10^\circ\text{C}$ использовались без предварительной очистки и какой-либо обработки.

2.2. Методы исследования и приборы

Порошковая рентгенофазовая дифрактометрия. Дифрактограммы были получены с помощью рентгеновского дифрактометра Shimadzu XRD-

6000. На дифрактограммах аморфных образцов имеются дифракционные пики при $37,5^\circ$ и $44,0^\circ$, относящиеся к материалу кюветы.

ИК-спектрофотометрия. ИК-Фурье спектры получены на инфракрасном спектрофотометре с преобразователем Фурье «IR Prestige-21» (Shimadzu, Japan) в области $4000-400\text{ см}^{-1}$ в виде смесей с KBr. Гранулу из хорошо высушенного KBr готовили по стандартной технологии холодного прессования.

УФ-спектры регистрировались аппаратом в кварцевых кюветах толщиной 10 мм на UV-Vis спектрофотометре «UV-1800» (Shimadzu, Japan).

Хроматограммы получены на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Хромос» (Хромос, Россия) в обращено-фазовом режиме с УФ-детектированием, колонка “Luna” C18 ($25\text{ см} \times 4,6\text{ мм}$, 5 мкм).

Дзета-потенциал анализировали методом электрофоретического светорассеяния с анализом фаз на приборе NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments, USA). Перед измерением кювету обеспыливали 3-х кратным ополаскиванием деионизованной водой. Для анализа 10 мг НЧ диспергировали в 50 мл деионизованной воды, проводили УЗО в течение 5 мин и фильтровали через полиэфирсульфоновый фильтр с размером пор $0,22\text{ м}$. Для каждого образца было выполнено пять измерений при угле рассеяния 90° при 25°C .

Усредненный *гидродинамический весовой диаметр* определяли методом динамического рассеяния света (ДРС) в режиме полимодального анализа корреляционной функции ($25 \pm 0.1^\circ\text{C}$, угол 90° в диапазоне от 0.1 до 5000 нм в 1 см полистирольных кюветах), спектрометр NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments, USA).

Элементный анализ (ИСП). Элементный анализ был выполнен методами ИСП-АЭС, ААС и комплексонометрического титрования. Анализ ИСП-АЭС был выполнен с помощью Prodigy High Dispersion ICP (Teledyne Leeman Labs., Hudson, NH, USA). Элементный анализ был выполнен с использованием атомно-абсорбционного спектрометра AA-7000 (Shimadzu,

Kyoto, Japan) при 213,9 нм. Образцы были предварительно обработаны $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (6:1) для выщелачивания металлического цинка.

Вязкость мягких лекарственных форм анализировали на вискозиметре Brookfield DV2T со шпинделем 64 (AMETEK Brookfield, USA), оборудованном термостатом (Жидкостный низкотемпературный термостат КРИО-ВТ-01; ООО «Термекс», Россия, Томск) для поддержания температуры 25 °С.

Количественное определение 5-ФУ проводили с помощью УФ- и ВЭЖХ-методов:

УФ-спектрофотометрия. Количественное определение проводилось при снятии спектров при максимальном поглощении 266 нм.

ВЭЖХ-анализ 5-ФУ проводился при следующих условиях:

Колонка Luna 5 мкм C18(2) 250×4,6 мм, 100 А

Подвижная фаза: KH_2PO_4 pH 5,7±0,1

Скорость потока - 1,0 мл/мин

Температура - 20 °С

Объём пробы - 20 мкл

Режим – изократический

Детектор: УФ (266 нм)

Высвобождение оценивалось с помощью вертикальной диффузионной ячейки Франца 4,35 мл и 12,71 мл с использованием ацетилцеллюлозной и липидной мембран при $t = 37^\circ\text{C}$. В качестве акцепторной жидкости использовался фосфатный буферный раствор с pH 7,4.

Приготовление фосфатного буферного раствора с pH 7,4. В мерную колбу на 1 л последовательно помещали и растворяли навески KH_2PO_4 (1,1 г), K_2HPO_4 (0,32 г), NaCl (8,5 г) и доводили водой очищенной до метки. Полученный раствор доводили до pH 7,4±0,1.

За 24 часа до эксперимента мембрану выдерживали в растворе акцепторной жидкости, т. е. в буфере для предварительного набухания.

К внешней водяной рубашке ячейки подсоединялись полимерные трубки для подачи воды из термостата, чтобы обеспечить постоянную температуру во время эксперимента. Внутренний стакан – рецепторная камера, промытая заданным буферным раствором 3 раза, затем полностью заполняется им с помещением якоря для магнитной мешалки. Ячейку фиксировали на магнитной мешалке с помощью штатива и держателей. Аккуратно наносили мембрану на внешнюю поверхность ячейки Франца, избегая попадания пузырей в рецепторную камеру (зажимы). Площадь соприкосновения донорной и рецепторной зоны ограничивается силиконовым кольцом, которое необходимо поместить поверх мембраны. Затем, в ограниченную площадь определённой области наносили исследуемое вещество (гель), избегая попадания пузырей между исследуемым составом и мембраной. Плотное фиксировали камеру стеклянной крышкой и металлическим держателем для большего соприкосновения исследуемого вещества с мембраной.

Пробоотбор осуществлялся хроматографическим шприцем из специального отведения из акцепторной зоны. Отобранная проба помещалась в пикнометр указанного объёма и доводится до метки буфером. Разбавленная проба может быть исследована УФ-спектрофотометрически или хроматографически.

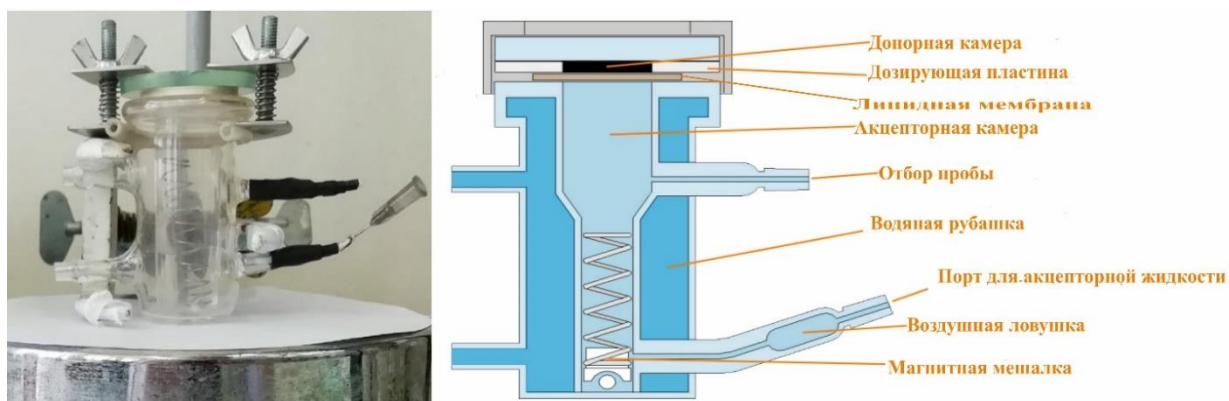


Рисунок 2.1 - Фото и схема ячейки Франца

2.3. Приготовление гелей

2.3.1. Приготовление геля 5-фторурацила с наночастицами оксида церия, синтезируемых в матрице гидроксиэтилцеллюлозы

а) Получение золя и геля наночастиц оксида церия. В химический стакан (100 мл) отмеряли 70 мл воды очищенной. Вносили при постоянном перемешивании 1,6 г ГЭЦ (Natrosol® 250 NHR) и оставляли до полного набухания полимера (40 минут). В химический стакан (25 мл) отмеряли 5 мл воды очищенной и растворяли в ней 0,2 г церия (III) нитрата гексагидрата. В химический стакан (25 мл) отмеряли 10 мл воды дистиллированной и последовательно растворяли в ней 0,87 г меглумина и обрабатывали ультразвуком в течение 2-х минут. Растворённый церия (III) нитрат гексагидрат (5 мл) переносили к раствору полимера при постоянном перемешивании в течение 120 минут при 60 °С. Полученный гель анализировали по следующим показателям: структурная вязкость при разбавлении в 2 раза должна быть 3000 – 6000 мПа × с; рН водного извлечения должен быть в интервале 7,0±7,4; электронный спектр CeO_2 нч должен иметь полосу поглощения экситона при $\lambda_{\text{max}} = 270\text{-}300$ нм при концентрации 20 мг/мл. Остаточное количество церия (III) нитрата должно быть не более 0,002%.

б) Получение комбинированного геля. На заключительном этапе добавляли раствор 5-фторурацила (1,0) и оставшуюся воду (10 мл) к раствору полимера при постоянном перемешивании. Наблюдали появление ярко-золотистого окрашивания. Гель однородный, густой. Гель корректировали по величине рН 0,1М раствором лимонной кислоты. Концентрацию 5-ФУ контролировали методом ВЭЖХ.

2.3.2. Приготовление геля ксимедона с наночастицами оксида цинка с использованием карбопола

В химический стакан (100 мл) отмеряли 60 мл воды очищенной и вносили при постоянном перемешивании 1,0 г карбопола 974Р NF. Оставляли

для набухания в течение 60 минут. Наночастицы оксида цинка (0,1 г) тщательно перетирали в агатовой ступке с определенным количеством ксимедона (1,0 г) и этанола (5 мл). После удаления растворителя, порошок обрабатывали ультразвуком в 20 мл воды очищенной до образования полупрозрачной дисперсии. Полученную дисперсию добавляли к набухшему карбополу 974P NF при постоянном перемешивании. 4,0 г ксимедона растворяли в оставшемся объеме воды очищенной (14 мл) и помещали к набухшему карбополу с ксимедоном и наночастицам оксида цинка при постоянном перемешивании. Гель имел оранжево-золотистую окраску, прозрачный, однородный.

2.4. Оценка биологической активности

2.4.1. Исследование цитотоксичности. Выживаемость и оценка цитотоксичности на опухолевых клетках

Материалом для исследования цитотоксичности наночастиц на основе церия использовались клетки постоянной клеточной линии NCTC клон 929 (мышь С3Н/An, подкожная соединительная ткань, клон линии L.). Клетки культивировали согласно паспорту культуры в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция) и 1% пенициллин/стрептомицина (ПанЭко, Россия). По завершении периода экспоненциального роста, клетки снимали раствором версен-трипсина (3:1) и пересевали. Кратность посева составляла 1:3 - 1:6, плотность посева – $1.0 - 3.0 \times 10^4$ клеток/см². Экспериментальные работы с клеточными культурами проводили после третьего пассажа. Культивирование клеточных культур проводили в условиях CO₂-инкубатора Binder C150 (BINDER GmbH, Германия) при температуре 37°C и газовой смеси, содержащей 5% CO₂.

Для проведения исследований по цитотоксичности клетки NCTC клон 929 высевали на 96-луночные культуральные планшеты в количестве 7×10^3 на лунку. Через 24 часа после контроля прикрепления клеток и достижения

уровня субконфлюентности, культурам проводилась полная замена среды на полную ростовую среду, содержащую исследуемые образцы согласно нижеприведенным группам и концентрациям:

1. CeO_2 нч (10 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 400 мкг/мл, 600 мкг/мл)
2. CeO_2 нч+ГЭЦ (10 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 400 мкг/мл, 600 мкг/мл)

Выбор концентраций для оценки цитотоксичности осуществлялся, опираясь на результаты оценки цитотоксичности производных целлюлозы и предварительных данных цитотоксичности наночастиц с использованием клеточных линий иного происхождения.

Растворы подготавливали в стерильных условиях культурального бокса в 100% диметилсульфоксиде (ДМСО). С целью дополнительного снижения риска контаминации стоковые растворы пропускались через фильтрующую насадку на шприц с диаметром пор 0,2 мкм (TPP, Швейцария).

Группу «Положительный контроль» составляли культуры клеток NCTC клон 929 с заменой культуральной среды с добавлением ДМСО в соотношении 1:1.

Группу «Отрицательный контроль» составляли культуры клеток NCTC клон 929 с заменой кондиционированной культуральной среды на полную ростовую в соотношении 1:1.

Качественная и количественная оценка цитотоксичности исследуемых образцов проводилась через 24 часа после замены среды.

Качественная оценка цитотоксичности испытуемых образцов проводилась с использованием инвертированного микроскопа Axio Observer.A1 (Carl Zeiss, Германия) и шкалы цитотоксичности согласно ISO 10993-5:2009 с модификациями. Для каждой культуры анализировалось не менее 10 полей зрения.

2.4.2. Оценка цитотоксичности на клеточных линиях меланомы (B16) и колоректального рака (HCT116 и HT29)

Линии клеток HCT116, HT29 и B16 были получены из коллекции клеточных культур отделения вирусологии им. Д.И. Ивановского Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (Москва, Россия). Клетки HuFB были выделены из здоровой донорской кожи в Приволжском исследовательском медицинском университете. Установленная клеточная линия NCTC clone 929 (мышь C3H/An, подкожная соединительная ткань, клон линии L.) была любезно предоставлена проф. Д.В. Крысько, Лаборатория исследования и терапии клеточной смерти, кафедра структуры и репарации человека, Гентский университет (Гент, Бельгия). Эксперименты *in vitro* проводились с использованием следующих установленных клеточных линий: две клеточные линии колоректального рака человека (HT29 и HCT116), клетки мышинной меланомы B16

Количественная оценка цитотоксичности соединений осуществлялась методом анализа метаболической активности клеток с использованием МТТ. Для этого проводилась замены среды на бессывороточную среду с добавлением тетразолиевого красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромида в концентрации 0,5 мг/мл. Инкубация проводилась в течение 4 часов в условиях CO₂-инкубатора. При участии НАДН-зависимых дегидрогеназ жизнеспособных и метаболически активных клеток происходит восстановление красителя до окрашенного водонерастворимого формазана. Через 4 часа культуральную среду сливали и кристаллы формазана растворяли в 100% ДМСО. Оптическую плотность раствора измеряли с использованием комбинированного планшетного спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy Mx (BioTek Instruments Inc., США) на длине волны 570 нм. Количество живых клеток было рассчитано относительно отрицательного контроля по формуле $ЖК = E_{опыта} / E_{контроля}$

*100%, где ЖК – жизнеспособность клеток, %; E – оптическая плотность.

Статистический анализ данных выполнялся в программе GraphPad Prism (V.9.2) с применением непараметрического критерия Крускала-Уоллиса. Проверка гипотезы нормальности распределения осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

2.4.3. Оценка ранозаживляющих свойств и антиоксидантной активности

Самцы крыс Wistar (250–300 г) были приобретены в питомнике животных «Андреевка» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства (Андреевка, Московская область, Россия). Все процедуры по содержанию и умерщвлению (уходу и использованию) животных проводились в соответствии с критериями, изложенными в Европейской конвенции ET/S 129, 1986 и директивах 86/609 ESC. С животными обращались гуманно, содержали в пластиковых подвесных клетках и помещали в хорошо проветриваемый и гигиеничный домик для крыс в подходящих условиях комнатной температуры ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) и влажности. Им давали пищу и воду ad libitum и подвергали естественному фотопериоду с 12-часовым световым и 12-часовым темным циклом. Животным давали две недели на акклиматизацию перед экспериментами на животных-моделях в исследовании. Все заборы и изъятия крови у подопытных животных проводились под наркозом (Золетил 100 (60 мг/кг) и Ксил 6 мг/кг), и были приложены все усилия, чтобы свести страдания животных к минимуму. Представленное исследование было одобрено местным комитетом по этике Приволжского Научно-исследовательского медицинского университета, Российская Федерация.

2.4.4. Моделирование термических ожогов у животных

Поверхность спин животных обжигали электромагнитным излучением инфракрасной паяльной станции YaXunXY865D согласно требованиям надлежащей лабораторной практики экспериментального моделирования термических ожогов у лабораторных животных. Использовался режим, вызывающий термические ожоги второй степени глубины. Расстояние инфракрасного нагревателя от кожи животного составляло 14,5 мм, температура кожи в зоне нагрева - 60 °C, продолжительность нагрева - 23 с, мощность - 100 Вт. При этих условиях инфракрасное излучение проникает на глубину 3-5 мм. Площадь стандартного термического ожога составила $24,0 \pm 0,5 \text{ см}^2$, что составило 20% от общей площади крысы.

ГЛАВА 3. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ РАЗРАБОТКА КОМБИНИРОВАННОЙ МЯГКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ 5- ФТОРУРАЦИЛА С НАНОЧАСТИЦАМИ ОКСИДА ЦЕРИЯ

3.1. Дизайн и этапы фармацевтической разработки

Фармацевтическая разработка комбинированной мягкой лекарственной формы (МЛФ) 5-фторурацила (5-ФУ) с наночастицами оксида церия (CeO_2 нч) включала в себя исследования биологической активности комбинации 5-ФУ с CeO_2 нч, разработку метода синтеза стабильных CeO_2 нч в матрице полимера, обоснование состава и технологии приготовления геля, выбор показателей качества, по которым препарат проходит испытание на стабильность на протяжении всего срока годности, оценку биофармацевтического показателя – высвобождение 5-ФУ. Подготовительный этап, включающий анализ научной литературы, анализ мирового рынка, анализ нормативно-правовой документации, определяющий стратегию разработки комбинированного геля, был представлен в литературном обзоре.

Основной проблемой фармацевтической разработки гидрофильных гелей с наночастицами оксидов металлов является их агрегация в водных растворах и отсутствие на фармацевтическом рынке стабилизированных наночастиц оксидов металлов. В связи с этим, в работе были использованы приемы получения стабилизированных CeO_2 нч в матрице нужного полимера. Дизайн и этапы эксперимента представлены на рисунке 3.1:

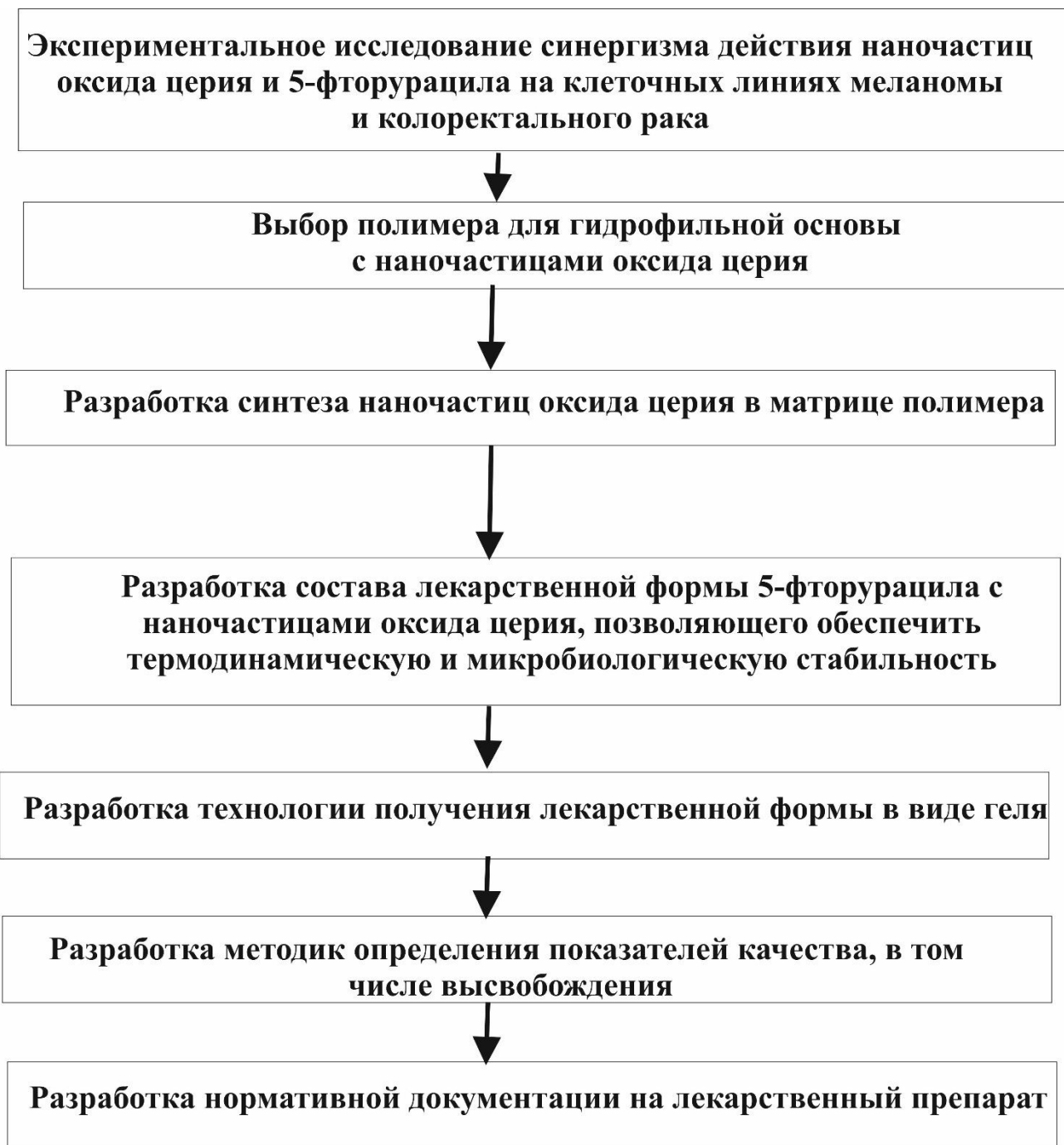


Рисунок 3.1 - Основные этапы фармацевтической разработки состава и технологии геля 5-ФУ с CeO_2 нч

3.2. Цитотоксичность наночастиц оксида церия и его комбинации с 5-фторурацилом

В работе оценивали цитотоксичность по отношению к здоровым клеткам (фибробласты человека) и по отношению к опухолевым клеткам, исследуя выживаемость.

3.2.1. Цитотоксичность (выживаемость) клеток фибробластов под действием наночастиц оксида церия

Качественный анализ цитотоксичности показал, что через 24 часа после начала эксперимента в культурах группы «Отрицательный контроль» жизнеспособность клеток по шкале цитотоксичности составляет 0 (таблица П.1, приложение 1). Морфология клеток характерна для данной клеточной линии (NCTC клон 929), в поле зрения хорошо прослеживаются активно делящиеся клетки. Количество отдельных клеточных элементов, открепившихся от подложки и свободно плавающих в культуральной среде (один из этапов развития монослоя) составляет менее 10%.

В группе «Положительный контроль» во всех полях зрения визуализируются клетки округлой формы и клетки с ярко выраженным повреждением цитоплазматической мембраны. Цитотоксичность – 4 балла (острая) (таблица П.1, Приложение 1).

В образцах ГЭЦ концентрациях 0,1 и 1 мкМ морфология клеточных культур не отличалась от группы «Положительный контроль». Цитотоксичность составляет 0. Повышение концентрации полимеров от 10 мкМ и выше приводит к ярко выраженному цитотоксическому эффекту. Во всех полях зрения визуализируются клетки округлой формы, клетки с выраженным повреждением цитоплазматической мембраны и элементы клеточного дебриса. Цитотоксичность – 4 балла (острая) (таблица П.2, Приложение 2).

Количественная оценка жизнеспособности (таблица 3.1) методом МТТ-теста показала, что инкубация культур клеток NCTC клон 929 с полимером

ГЭЦ в концентрациях 0,1 мкМ, 1 мкМ, 10 мкМ не оказывает цитотоксического эффекта на метаболическую активность клеток. В данных группах количество жизнеспособных клеток не отличалось от значений группы «Отрицательный контроль».

Таблица 3.1 - Анализ жизнеспособности культур клеток NCTC клон 929 через 24 часа после инкубации с ГЭЦ

Наименование группы/	Количество жизнеспособных клеток относительно группы «Отрицательный контроль», %			
Положительный контроль	8,9±1,3*			
	Концентрация, мкМ			
	0.1	1	10	25
ГЭЦ	99,2±16,2	98,0±22,9	92,4±2,1*	91,8±1,8*

* - статистически значимые различия относительно группы «Отрицательный контроль», $p < 0.05$, критерий Крускала-Уоллиса ($n=6$)

На следующем этапе исследование цитотоксичности проведена качественная оценка образцов наночастиц оксида церия и наночастиц, покрытых полимером ГЭЦ В исследуемых группах CeO_2 нч, CeO_2 нч+ГЭЦ в концентрации 10 мг/мл в полях зрения визуализируются клетки, имеющие на поверхности цитоплазматической мембраны и цитоплазме гранулы темного цвета, что указывает на поглощение частиц клетками. Наблюдается появление клеток веретенообразной и звездчатой форм с нечеткими границами цитоплазматической мембраны. Цитотоксичность – 1 (легкая).

Подобные гранулы визуализируются и на культуральном пластике, количество которых возрастает с повышением концентрации исследуемых соединений.

Применение CeO_2 нч+ГЭЦ в концентрациях 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл визуализируются клетки с активно поглощенными наночастицами, располагающимися внутри цитоплазмы или на внешних границах цитоплазматической мембраны. Более 30% клеток в поле зрения округлой формы, а также клеток с увеличенным объемом ядра. Цитотоксичность – 3 (значительная). В образцах CeO_2 нч+ГЭЦ в концентрациях 400 мкг/мл и 600

мкг/мл превалирующее большинство клеток округлой формы; исследуемые соединения располагаются в цитоплазме и на внешних границах цитоплазматической мембраны клеток, «облепляя» их. В полях зрения визуализируются элементы клеточного дебриса. Цитотоксичность – 4 (острая).

Морфологические изменения клеток в группах культур с применением наночастиц CeO_2 нч без покрытия, характерные для острого цитотоксического эффекта (4 балла) установлены для концентраций от 50 мкг/мл и выше. Наночастицы активно прокали к клетки, о чем свидетельствует их активное накопление преимущественно в цитоплазме, а не на границе цитоплазматической мембраны.

Исходя из полученных результатов следует, что действие CeO_2 нч на нормальные фибробласты на здоровые клетки незначительное (лёгкая цитотоксичность) при концентрации от 10 до 100 мкг/мл. Отмечается дозозависимый эффект и при высоких концентрациях CeO_2 нч может развиваться острая цитотоксичность (от 100 до 600 мкг/мл). При защитном действии ГЭЦ цитотоксическое действие CeO_2 нч резко ослабляется.

3.2.2. Цитотоксичность наночастиц оксида церия и его комбинации с 5-фторурацилом на различных клеточных линиях

На рисунке 3.2(а) показано изменение выживаемости клеток колоректального рака (HCT116) и меланомы (B16) в эксперименте под действием наночастиц оксида церия, получаемых методом окислительного осаждения в присутствии гидроксиэтилцеллюлозы (ГЭЦ). Показано, что выживаемость опухолевых клеток уменьшается в обоих случаях более сильно (острая токсичность при 50 мкг/мл) по сравнению с выживаемостью клеток нормальных фибробластов человека (легкая цитотоксичность при 10 мкг/мл).

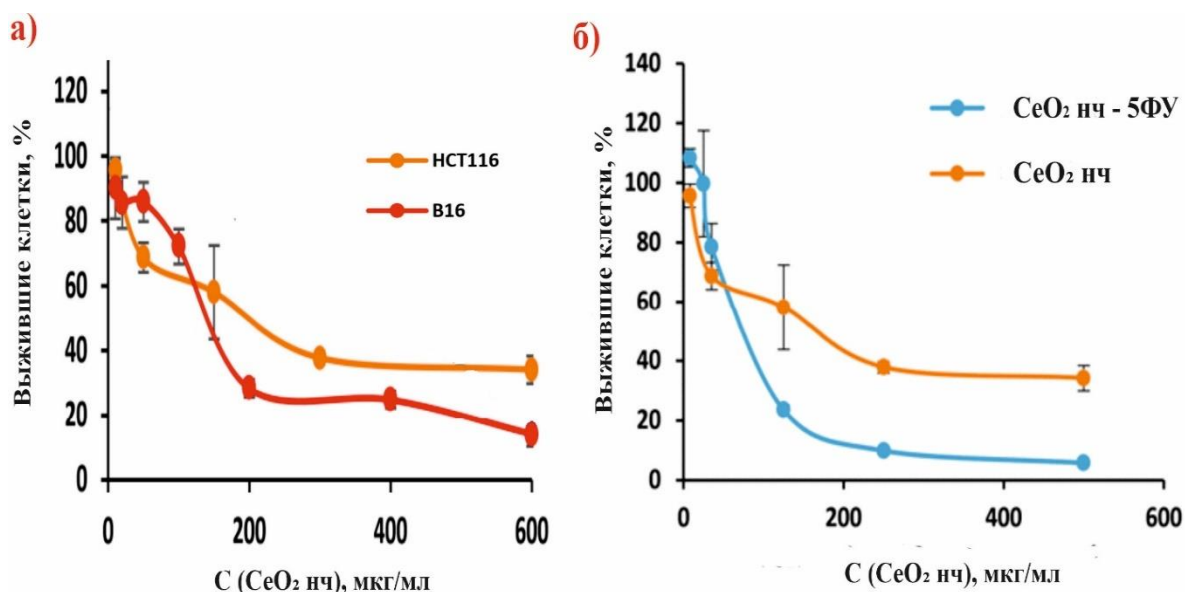


Рисунок 3.2 - Зависимость выживаемости (%) от концентрации наночастиц оксида церия: а – клеточные линии – В16 (меланома, красная линия); НСТ116 – (колоректальный рак, жёлтая линия); б – клеточная линия НСТ116 (синяя линия – комбинация с 5-ФУ)

Цитотоксические эффекты наночастиц оксида церия усиливались на клетках колоректального рака человека линии НСТ116 и клеток мышинной меланомы В16: значения ингибирующей концентрации (IC_{50}) равны $219,0 \pm 45,6$ мкг/мл (для линии НСТ116) и $189,5 \pm 25,7$ мкг/мл (для линии В16), соответственно. Эффект наночастиц оксида церия в комбинации с 5-фторурацилом на линии НСТ116 усиливался по сравнению с действием только наночастиц оксида церия: значения IC_{50} наночастиц оксида церия в комбинации с 5-ФУ составило $89,2 \pm 14,0$ мкг/мл. В этом эксперименте концентрация 5-ФУ в комбинации с наночастицами оксида церия составила 6,0 мкмоль/л, в то время как в отсутствии наночастиц оксида церия эта величина соответствовала 10,1 мкмоль/л и 219 мкг/мл до 89 мкг/мл по отношению к наночастицам оксида церия.

Таким образом, из экспериментов на клеточных линиях следует, что комбинация 5-ФУ с CeO₂ нч, защищенными полимерным материалом (ГЭЦ), будет проявлять синергетический эффект по отношению к опухолевым клеткам. Учитывая многочисленные литературные данные по использованию МЛФ 5-ФУ для профилактики и лечения актинического кератоза, болезни

Боумена и др., можно предположить, что, комбинация 5-ФУ с CeO_2 нч будет усиливать вышеупомянутый терапевтический эффект. Поскольку комбинированные ЛС 5-ФУ с CeO_2 нч практически отсутствуют, то важной задачей является разработка МЛФ, их состава и технологии, для наружного применения при лечении различных заболеваний кожи.

3.3. Выбор состава и метода получения гидрофильных гелей 5-фторурацила с наночастицами оксида церия

На первом этапе фармацевтической разработки гелей нами были проведены исследования по выбору гелеобразователя МЛФ с 5-ФУ и CeO_2 нч, выбор и основание других компонентов геля, была изучена возможность введения CeO_2 нч или их формирования в водной гелевой основе, включающего выбор окислительного осадителя CeO_2 нч, идентификацию и исследование физико-химических свойств CeO_2 нч, а также коллоидно-химических свойств полученного геля с 5-ФУ.

Требования к фармацевтической разработке дерматологического комбинированного геля 5-ФУ с CeO_2 нч заключаются в том, что компоненты должны обладать необходимыми органолептическими свойствами (внешний вид, цвет, запах), оптимальными структурно-механическими характеристиками (впитываемость, тиксотропность), не оказывать раздражающего действия, быть нетоксичными, а также быть стабильными и микробиологически устойчивыми при хранении.

При выборе компонентов геля также учитывали следующие факторы:

- 1) Подбор технологического режима получения гелевой основы был проведен с учетом рекомендованного значения pH (5,0-9,0) и коагуляции.
- 2) Выбор окислительного осадителя - нитрата церия (III), до CeO_2 нч в матрице полимера проведен с контролем температуры, pH и времени окисления.
- 3) Контроль полноты формирования CeO_2 нч в матрице полимерного гелеобразователя по физико-химическим свойствам CeO_2 нч в гелях.

4) Подбор вспомогательных веществ (оценка органолептических, структурно-механических свойств и стабильности, изучение совместимости компонентов с АФС)

3.3.1. Выбор гелеобразователя

Нами исследованы 1,0 – 2,0% гидрофильные гели на основе карбомера (PNF 974), гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ 60HD50), карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ), метилцеллюлозы (МЦ), этилцеллюлозы (ЭЦ), ГЭЦ, геллановая камедь, цитрусовый пектин. Эксперименты проводили, используя магнитную мешалку и 100 мл холодной воды очищенной и навеску полимеров (1,5 г) после предварительного набухания. 5ФУ хорошо диспергировался во всех гелевых основах. Введение CeO_2 нч в гелевые основы, содержащие полярные ионизирующиеся группы (карбомер, Na-КМЦ), приводило к коагуляции, а в гелеобразующих основах ГПМЦ, МЦ, ЭЦ, геллановой камеди, цитрусовом пектине и др. наблюдалась агрегация CeO_2 нч, нарушая однородность МЛФ.

В отсутствие CeO_2 нч использование гелеобразователя – ГЭЦ в концентрации выше 1,5% обуславливало образование вязких гелей. Структурная вязкость изменялась от 6000 до 3000 мПа×с при изменении скорости шпинделя от 1 до 20 об./мин. Требованием к качеству гелевой основы является небольшое время и условия (перемешивание в течение 30 минут при 30-40 °С) набухания, проявляющееся в однородности геля. Нами показано, что в интервале концентраций ГЭЦ от 0,5 до 2,0% гель оставался прозрачным и однородным, хорошо гомогенизировался, и не вызывал частичную агрегацию CeO_2 нч.

В связи с этим, нами предложена методика формирования CeO_2 нч в матрице ГЭЦ, способствующая образованию наночастиц меньших размеров – от 1 до 10 нм.

3.3.2. Методика формирования CeO_2 нч в матрице ГЭЦ

Ранее, рядом авторов [43, 44] была показана возможность формирования CeO_2 нч под действием нитрата церия (III) в растворах сахаров или полисахаридов, содержащих декстрановое звено (мальтодекстрин, декстран, глюкоза и др.) под действием гидроксида аммония или уротропина. (Рисунок 3.3). Такой синтез обычно называют полиольным, поскольку нитрат церия (III) взаимодействует с несколькими гидроксильными группами (координационное число $\text{Ce}^{3+}=6$) либо полимера, либо растворителя.

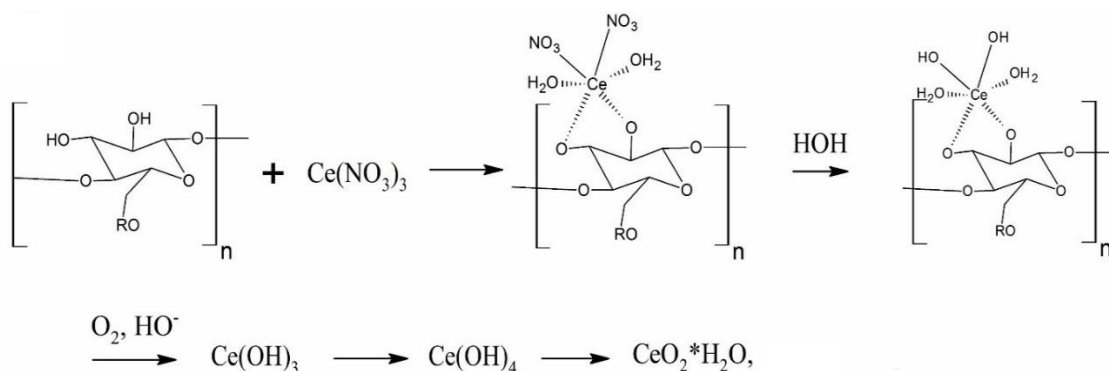


Рисунок 3.3 - Схема формирования наночастиц оксида церия полиольным синтезом в присутствии сахаров и полисахаридов из нитрата церия (III) с использованием прекурсора 27% гидроксида аммония [43]

Следует отметить, что, нитрат церия (III) обладает противоожоговым и ранозаживляющим свойством (препарат “Flammacerium”), а также антибактериальным и противоопухолевым действием. В результате неполного включения нитрата церия (III), в процессе окислительного осаждения, он может присутствовать в составе МЛФ, выступая в качестве антибактериального и консервирующего агента.

Нами предложено в качестве окислителя, вместо гидроксида аммония, использовать водорастворимые аминспирты – меглюмин и трисамин, создающие щелочную среду и способные в определенных условиях окислять нитрат церия (III) до CeO_2 нч. В отличие от 27% раствора гидроксида аммония эти соединения не разрушают структурную сетку ГЭЦ. В результате

проведенных исследований, предпочтение было отдано меглюмину, поскольку он склонен легко образовывать соли (например, нитраты) и является веществом, используемый в фармации как вспомогательное вещество, в том числе для контроля и регулирования pH среды за счёт нейтрализации азотной кислоты, выделяющейся при гидролизе нитрата церия (III) (ГФ РФ XV, ФС.2.1.0454. Можно предположить, что взаимодействие нитрата церия (III) с меглюмином будет близким к таковому взаимодействию с полиэтиленгликолем в мальтодекстрине в полиольном синтезе [44]. Методом ИК-спектроскопии нами было показано, что, как нитрат церия (III), так и меглюмин изменяют свою структуру в процессе их взаимодействия в растворе. Изменились формы и положения полос поглощения NO_3^- в нитрате церия (III) с 1300 и 1490 см^{-1} до 1380 и 1501 см^{-1} , практически исчезла третья полоса NO_3^- (Приложение 3, рисунок П.3). Существенные изменения наблюдались в спектрах ГЭЦ (Приложение 4, рисунок П.4) при добавлении нитрата церия (III): изменились формы и положения полос валентных колебаний связей С-О с 1062 до 1097 см^{-1} , и 1100 до 1200 см^{-1} . Эти спектральные изменения подтверждают комплексообразование нитрата церия (III) с гидроксильными группами меглюмина и ГЭЦ (Рисунок 3.3).

Алгоритм приготовления гидрофильных гелей с CeO_2 нч и 5-ФУ

1) В соответствии с рассчитанным составом отвешивали необходимое количество ГЭЦ (1,0 - 1,6 г), отмеривали 50 мл воды очищенной при 25 °С. стакан устанавливали на магнитную мешалку и добавляли навеску ГЭЦ через воронку.

2) В соответствии с рассчитанным составом отвешивали необходимое количество нитрата церия (III) (0,1-0,4 г) в 5-20 мл воды очищенной.

3) При снижении скорости приливали при перемешивании 5-20 мл 2,0% водного раствора нитрата церия (III) в течение 5 минут при 25°С с использованием капельной воронки.

4) В соответствии с рассчитанным составом отмеривали необходимое количество меглюмина (0,5-1,0 г) отмеривали 5-20 мл воды.

5) При перемешивании, в соответствии с рассчитанными составами, вносили 10-20 мл 8,0% водного раствора меглюмина в гель при помощи капельной воронки и увеличивали температуру до 60 °С, а затем выдерживали гель при этой температуре в течение 30-40 минут. Поскольку водородный показатель дермальных гелей должен быть в диапазоне от 5,0-9,0 (ГФ XV), “ГОСТ 31695-2012”, то составы с высокими содержаниями меглюмина создающие рН более 10,0 не могут являться оптимальными.

Цвет геля изменялся от бесцветного до жёлто-золотистого оттенка без вкраплений, оставаясь прозрачным при всех рассчитанных составах. В соответствии с литературными данными [44], реакцию контролировали по полосе поглощения экситона УФ-спектра раствора гелей в области 270-300 нм (Рисунок 3.4). Гель, разбавленный в 5 раз водой очищенной, должен иметь полосу поглощения экситона в области 270 ± 5 нм при интенсивности поглощения не менее $0,44 \pm 0,1$.

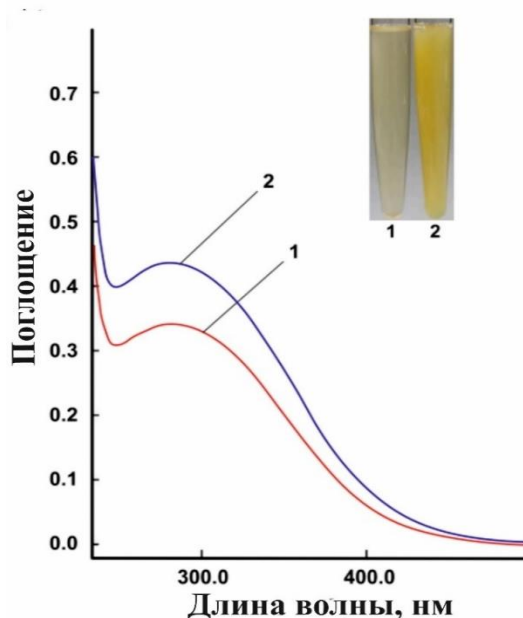


Рисунок 3.4 - УФ-спектры растворов гелей с CeO_2 нч гелей состава №2 и №3, при их разбавлении в 5 раз. Кривая 1 – состав №2, кривая 2 – состав №3 при 60 °С

б) После охлаждения геля отвешивали рассчитанные навески 5-ФУ (0,2-1,6 г) и растворяем в 10 мл воды очищенной, затем растворы 5-ФУ прикапывали через капельную воронку к гелю, содержащего CeO_2 нч.

Принципиальная схема последовательного получения геля оксида церия в гидратной форме с использованием прекурсора меглюмина представлена на рисунке 3.5.

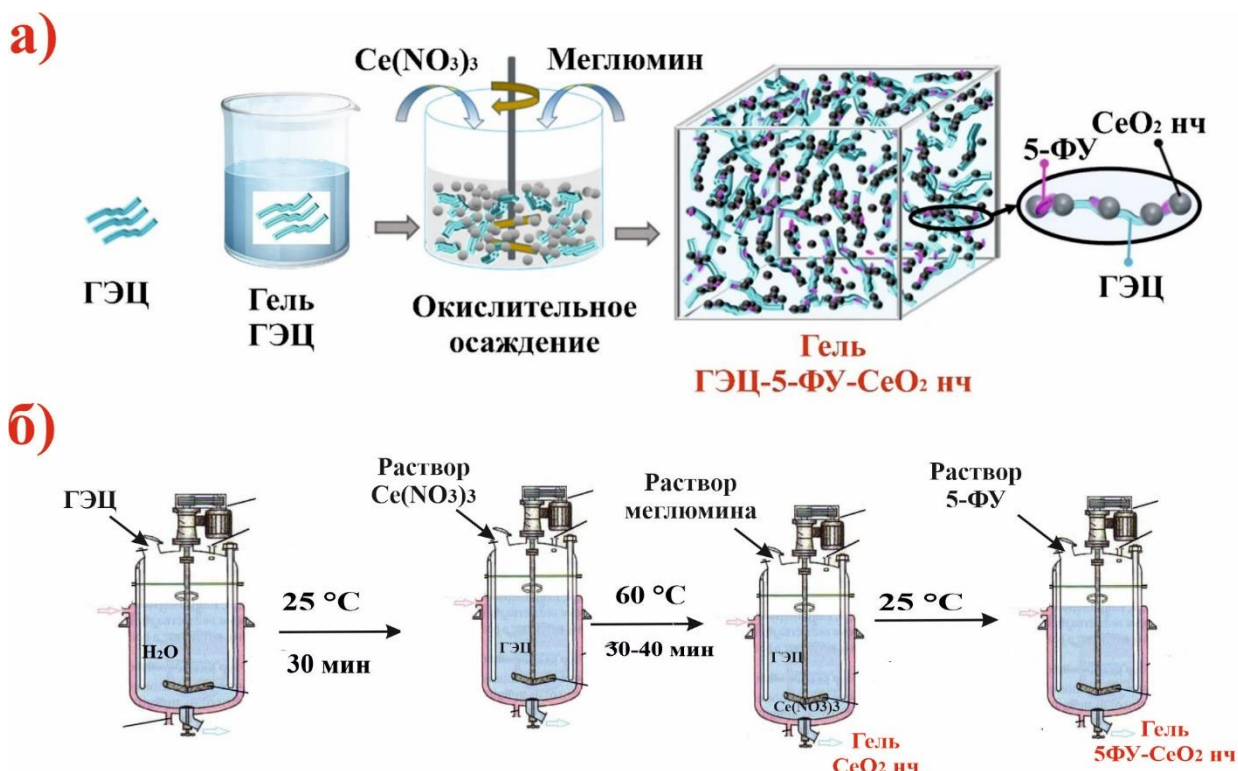


Рисунок 3.5 - Схематическая иллюстрация получения комбинированного геля 5ФУ с CeO_2 нч: а) – принципиальная схема, б) последовательность операций

3.3.3. Оптимизация состава и свойств комбинированных гелей 5-фторурацила и наночастиц оксида церия

Основными компонентами комбинированного геля 5-ФУ с CeO_2 нч на гидрофильной 1,6% ГЭЦ являются 5-ФУ, нитрат церия (III) и меглюмин. Нами выявлено, что, введение нитрата церия (III) больше 0,3% вызывало незначительное подкисление, способствующее коагуляции геля, а использование в концентрациях менее 0,1% не позволяло получить концентрацию CeO_2 нч, необходимую для проявления цитотоксичности.

Использование концентрации меглюмина более 1,0% приводило к излишнему подщелачиванию раствора и повышению pH геля, а применение менее 0,5% не обеспечивает полную конверсию нитрата церия (III).

Гомогенность и стабильность гелей, вероятно, обусловлена незначительным размером CeO_2 нч с гидратной шубой. На рисунке 3.6 и в таблице 3.2 представлены данные по оценке измерения размеров частиц методом ДРС. Измерение распределения гидродинамического радиуса или диаметра (вторичного размера наночастиц оксида церия) проводили в среде воды очищенной при pH 6,4. В мультимодальном режиме были зарегистрированы несколько мод с максимумами от 1,5 до 700 нм (рисунок 3.6 а). Распределение веса (объема) содержало одну моду с максимумами от 59 до 62 нм (рисунок 3.6. (б)). В логнормальной модели диаметр, усредненный по интенсивности (для всех частиц) = 31,2 нм, усредненный по объему, = 61,7 нм.

Таблица 3.2 Данные ДРС исследований гелей с наночастицами оксида церия

Измерение , №	Логнормальный средний диаметр по числу	Логнормальный медианный диаметр по объему	Диаметр, нм	Полидисперсность	Логнормальное распределение	Медианный диаметр по объему
1	31	62	126	0,347	1,73	1,3
2	29	60	125	0,359	1,74	1,3
3	39	69	124	0,282	1,65	1,2
4	28	58	120	0,356	1,74	1,2
5	30	60	118	0,335	1,71	1,2
Среднее значение	31	62	122	0,336	1,71	1,2
Стандартная ошибка	2	2	1	0,014	0,02	0,1
Стандартное отклонение	4	4	3	0,031	0,04	0,1

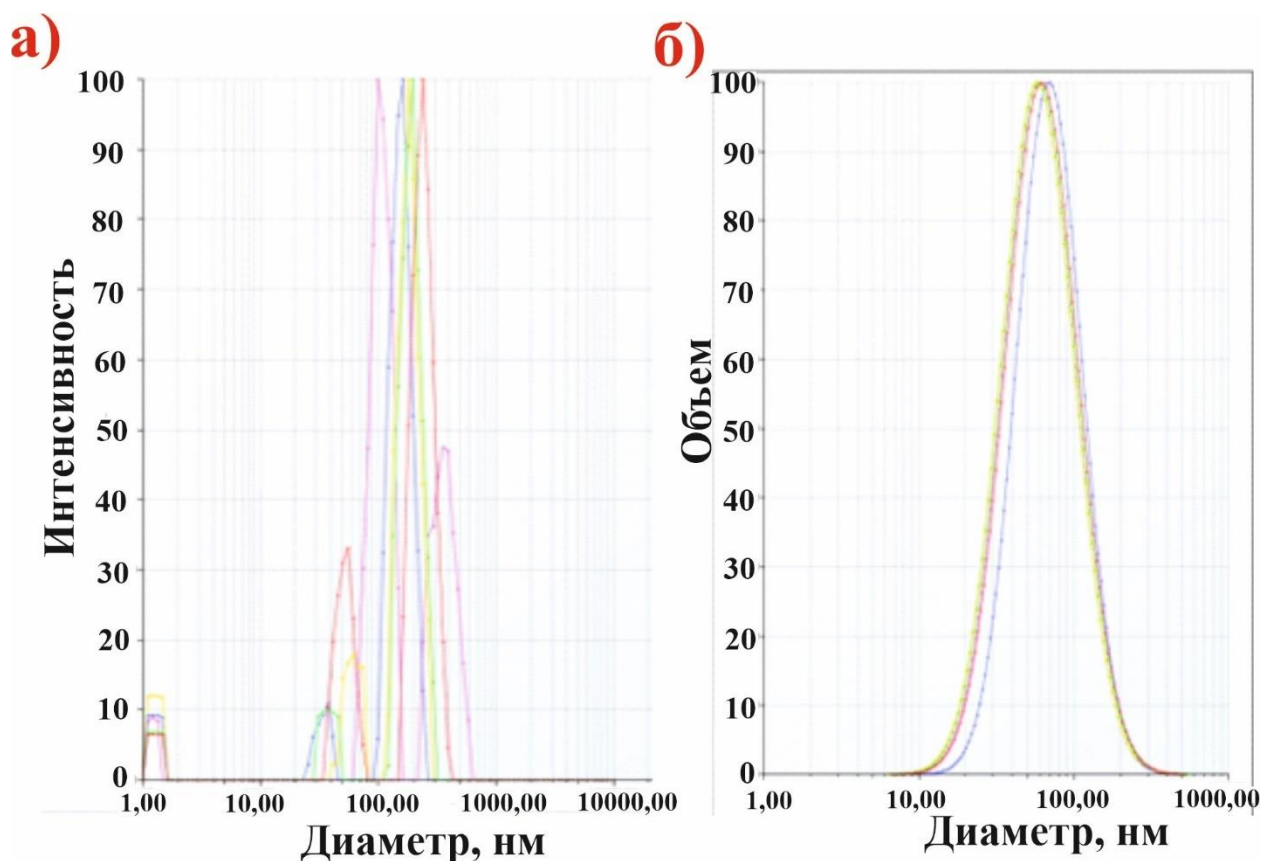


Рисунок 3.6 - Мультимодальное распределение наночастиц оксида церия в воде методом ДРС

Из данных, представленных в таблице и рисунке следует, что гели содержат CeO_2 нч с диаметром в интервале 118 – 126 нм. По своему составу анализ распределения наночастиц оксида церия продемонстрировал мультимодальный режим (рисунок 3.6 (а)).

Для перевода значений электрофоретической подвижности в значения дзета-потенциала программным обеспечением прибора использовалась модель Смолуховского. Для анализа 10 мг НЧ диспергировали в 50 мл деионизованной воды, проводили УЗО в течение 5 мин и фильтровали через полиэфирсульфоновый фильтр с размером пор 0,22 μ . Для каждого образца было выполнено пять измерений при 25°C. Дзета-потенциал образцов разбавленных гелей с наночастицами оксида церия представлял собой величину в интервале от 7 до 12 мВ.

Состав гелей (соотношение между компонентами) был оптимизирован с помощью пакета программ “Minitab”, используя в качестве основного параметра вязкость геля (рисунок 3.7)

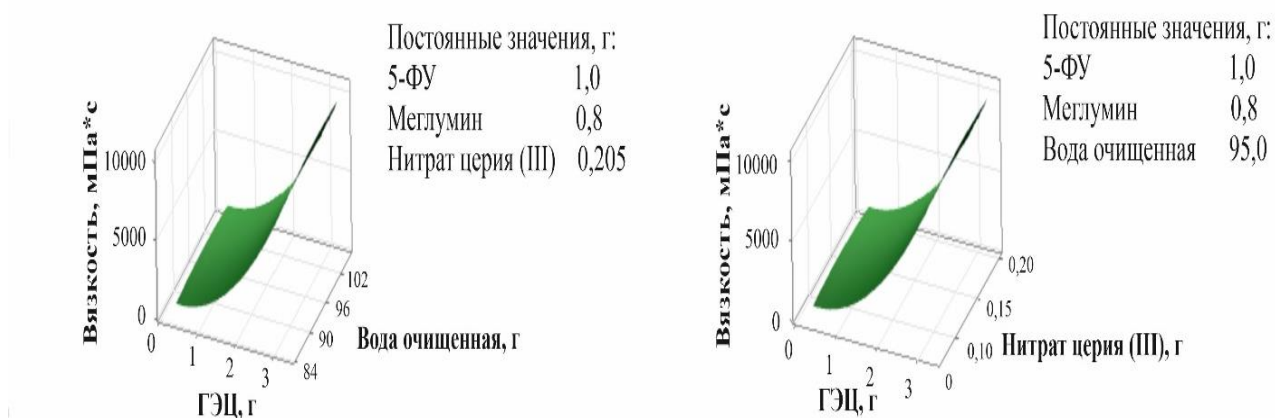


Рисунок 3.7 - Оптимизация составов гелей, содержащих 5-ФУ и наночастицы оксида церия

В таблице 3.3 приведены изучаемые составы гелей. Показано, что оптимальным составом, сохраняющий нужную структурную вязкость, является состав №3, содержащий 1,0 % 5ФУ и 0,08% CeO_2 нч.

Таблица 3.3 - Содержание компонентов в 100,0 г геля

№ Компонент,	Содержание, г						
	1	2	3	4	5	6	7
5-Фторурацил	0,2	0,4	1,0	1,2	1,4	1,6	-
CeO_2 нч ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	-	0,04 (0,1)	0,08 (0,2)	0,10 (0,25)	0,12 (0,30)	0,14 (0,35)	0,16 (0,40)
Меглумин	0,8	1,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6
Гидроксиэтилцеллюлоза	0,8	1,2	1,6	1,8	2,0	2,4	3,0

Воды очищенной до 100,0 г

Структурная вязкость геля (рисунок 3.9), оцененная по изменению вязкости от концентрации и скорости вращения (с учётом разбавления исходного геля в 2 раза) имела значение от 6000 до 3000 мПа*с. Практическое отсутствие петли гистерезиса на зависимость “вязкость – скорость вращения шпинделя” характеризует предлагаемый гель как тиксотропный: площадь под кривой при сжатии и растяжении были равны 9254 и 9311, соответственно.

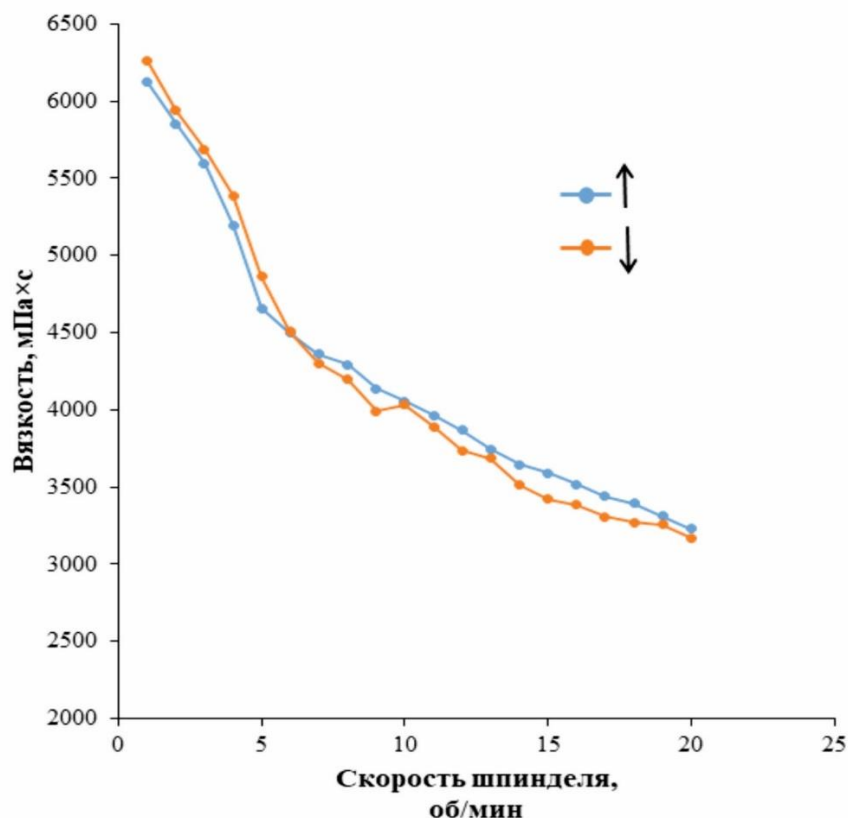


Рисунок 3.8 - Структурная вязкость как функция скорости шпинделя геля “CeO₂ нч-5ФУ”

После завершения реакции, качество геля контролировали с помощью измерения рН, величину которого корректировали органическими кислотами.

3.3.4. Контроль качества наночастиц оксида церия в разрабатываемом геле

CeO₂ нч в гелях анализировали после удаления растворителей лиофильной сушкой геля. В результате сушки образовывался мелкодисперсный порошок. Элементный анализ методом индукционно-связанной плазмы (ИСП), показал, что содержание церия (масс. %) колебалось от 73 до 78, а содержание кислорода от 27 до 22, кроме этого, в составе обнаружен углерод около 1,0%. Эти данные соответствовали элементному составу CeO₂ нч (теор.) – 81,4% (Ce) и 18,6%. Присутствие оксида церия подтверждалось энергодисперсионным рентгеновским спектром (ЭДС)

(Рисунок 3.9). Присутствие углерода в образце также отмечалось в спектре, а поскольку, анализ проводился на углеродной подложке, то интенсивность сигнала углерода – высокая.

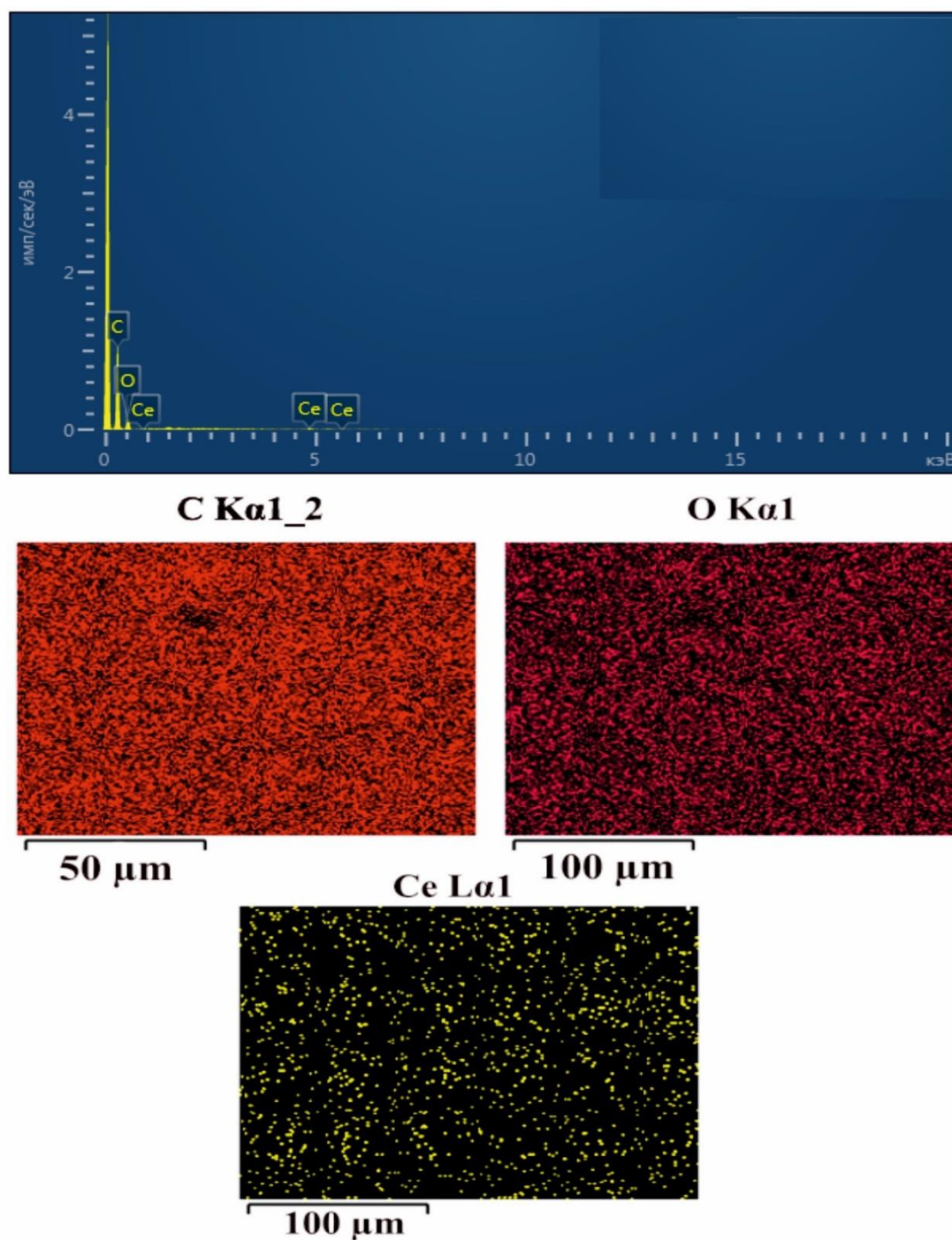


Рисунок 3.9 - ЭДС-спектр образца геля после лиофильной сушки

Несоответствие стехиометрии CeO_2 нч свидетельствовало о нестехиометричности CeO_2 нч на поверхности, то есть присутствием Ce_2O_3 .

Метод рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) по анализу Ce 3d-спектров образцов CeO_2 нч показал наличие нескольких степеней окисления для церия в областях спин-орбитальных дублетов Ce $3d_{5/2}$ (878-893 эВ) и Ce $3d_{3/2}$ (896-912 эВ), что характерно для нестехиометричных наночастиц оксида церия. Процентное содержание оксидного состояния Ce^{3+} для образцов, рассчитанное по суммарным интенсивностям (математическая обработка в программах SDP v.4.3 и CasaXPS), составило 33-40% (Рисунок 3.10).

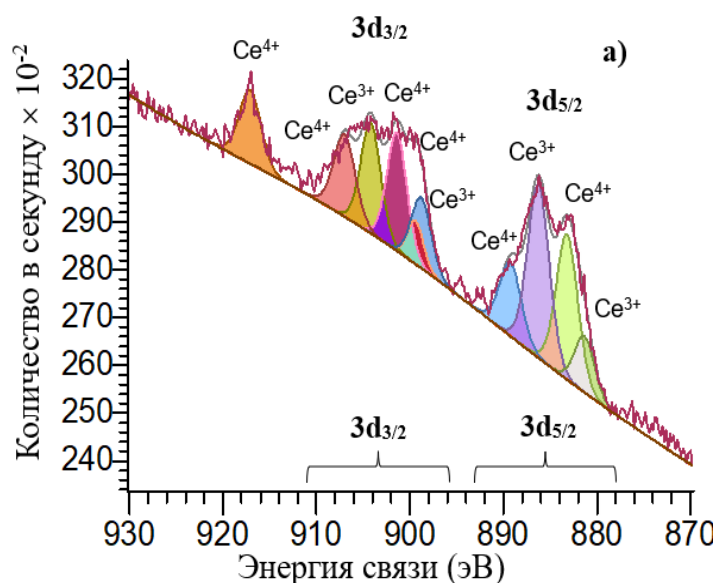


Рисунок 3.10 - Разложение мультиплетного 3d-пика церия полученного образца, выделенного из геля

На рисунке 3.11 представлены рентгенограммы образцов CeO_2 нч, полученных из анализируемых гелей, и CeO_2 нч, полученных полиольным методом с использованием в качестве осадителя 27% р-ра гидроксида аммония. Для сравнения приведены также рентгенограммы полисахаридов. Рефлексы, характерные для CeO_2 нч из разработанных гелей на рентгенограммах имеют вид широких размытых полос, что, вероятно, обусловлено экранированием полимеров и характерны для очень малых размеров наночастиц.

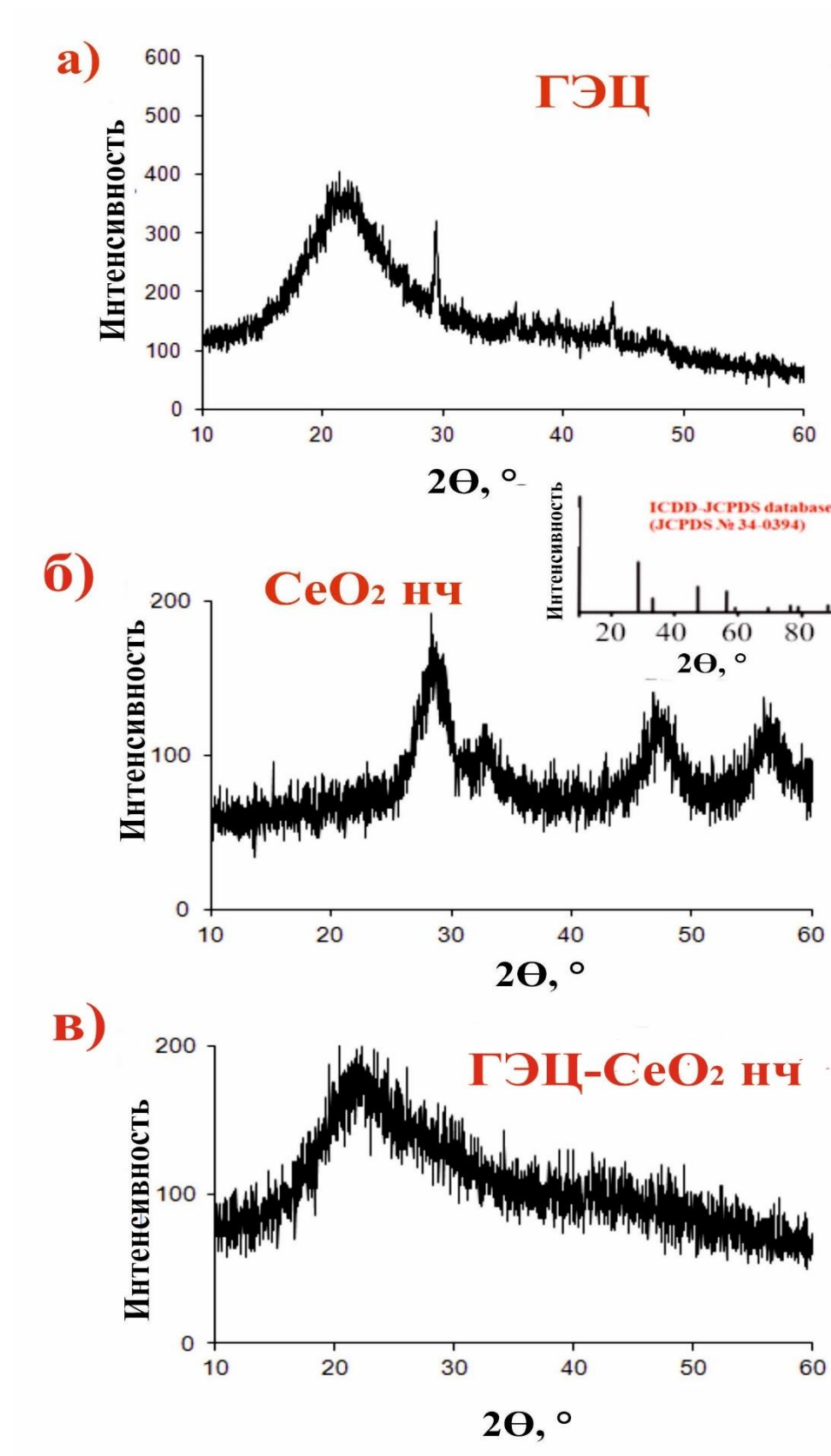


Рисунок 3.11 - Рентгенограммы CeO₂ нч, полученных в матрице ГЭЦ и методом окислительного осаждения меглuminioм

Таким образом, предлагаемая нами методика получения CeO_2 нч в матрице полисахарида - ГЭЦ, заключающаяся в обработке водных гелей ГЭЦ последовательно нитратом церия (III) и меглюмином позволяет получить наноразмерные частицы оксида церия. Введение 5-ФУ в концентрации 1,0% не изменяет показатели геля (рН, прозрачность, гомогенность, стабильность в течение 1 года).

3.4. Разработка подходов к стандартизации геля 5-фторурацила с наночастицами оксида церия и оценка высвобождения 5-фторурацила

Идентификацию церия в МЛФ проводили по методикам, описанных в разделе 3.3.4.

3.4.1. Методики установления подлинности и количественного определения 5-фторурацила в гелях

Идентификацию 5-фторурацила в ЛФ проводили, сравнивая ИК-спектры стандартного и анализируемого образцов после лиофильной сушки гелей (рисунок 3.12)

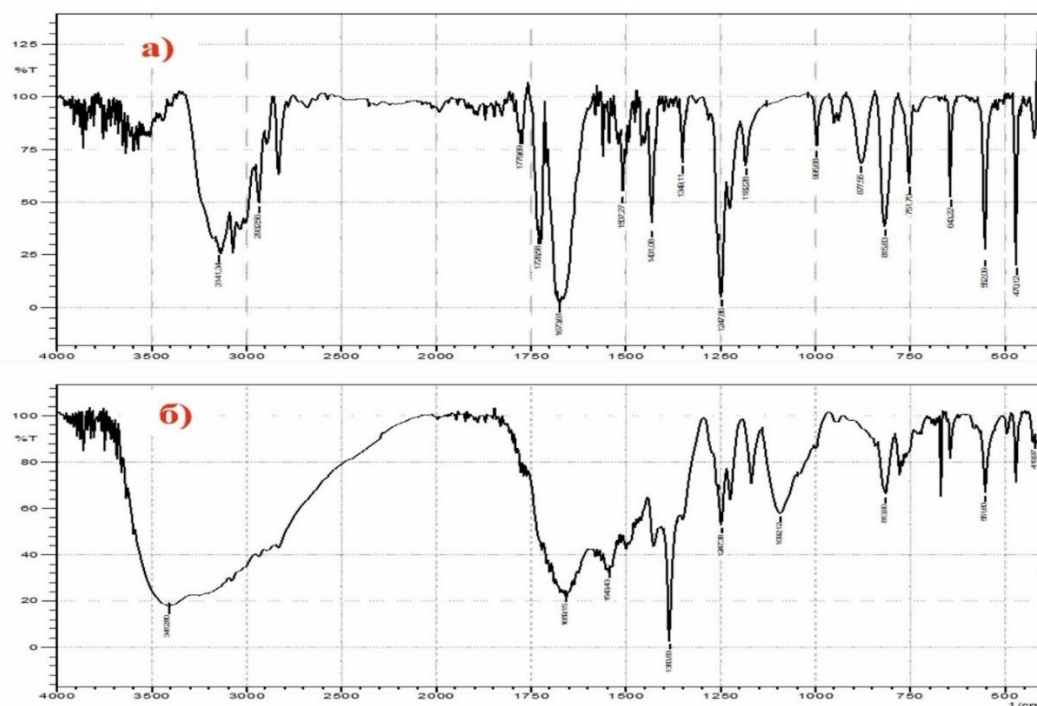


Рисунок 3.12 - ИК-спектры 5-фторурацила: а) стандартный образец; б) образец геля после лиофильной сушки

Для анализа ИК-спектров навеску геля сушили методом лиофильной сушки, и образец анализировали в таблетках с калием бромидом. Анализ ИК-спектров показал, что во всех образцах присутствовали полосы поглощения валентных колебаний карбонильной группы и C-F в лактамном цикле 5-фторурацила (таблица 3.4)

Таблица 3.4 - Данные ИК-спектров анализируемых образцов, ν , см^{-1} (функциональные группы)

Образец	3600-3200 (-OH, -NH)	3100-2700 (-CH, -CH ₂ , -CH ₃)	1753-1650 (C=O) и 1248-1249 (C-F) в 5ФУ	1600-1300 (C-O, NO ₃ ⁻)	570-425 (Ce-O)
CeO ₂ нч	-	3161	-	1535, 1071, 1020	435
ГЭЦ	3526	2906	-	1062	-
ГЭЦ- CeO ₂ нч (порошок из геля)	3462	2882	-	1060	410
5ФУ	3141	2932	1729, 1638, 1248	-	-
ГЭЦ- CeO ₂ нч- 5ФУ (порошок из геля)	3413	-	1659, 1543, 1247	1093	419

Для идентификации 5-фторурацила в ЛФ методом ВЭЖХ использовали стандартный образец, хроматограммы которого были сняты в условиях рекомендованных ФС.2.1.0348 и в условиях, рН которого равна водному извлечению разрабатываемого геля 5-фторурацила с CeO₂ нч геля (рН 7,4±0,1). При изменении рН время выхода пика 5-фторурацила незначительно изменилось с 8.2 минут до 7.8 минут (рисунок 3.13).

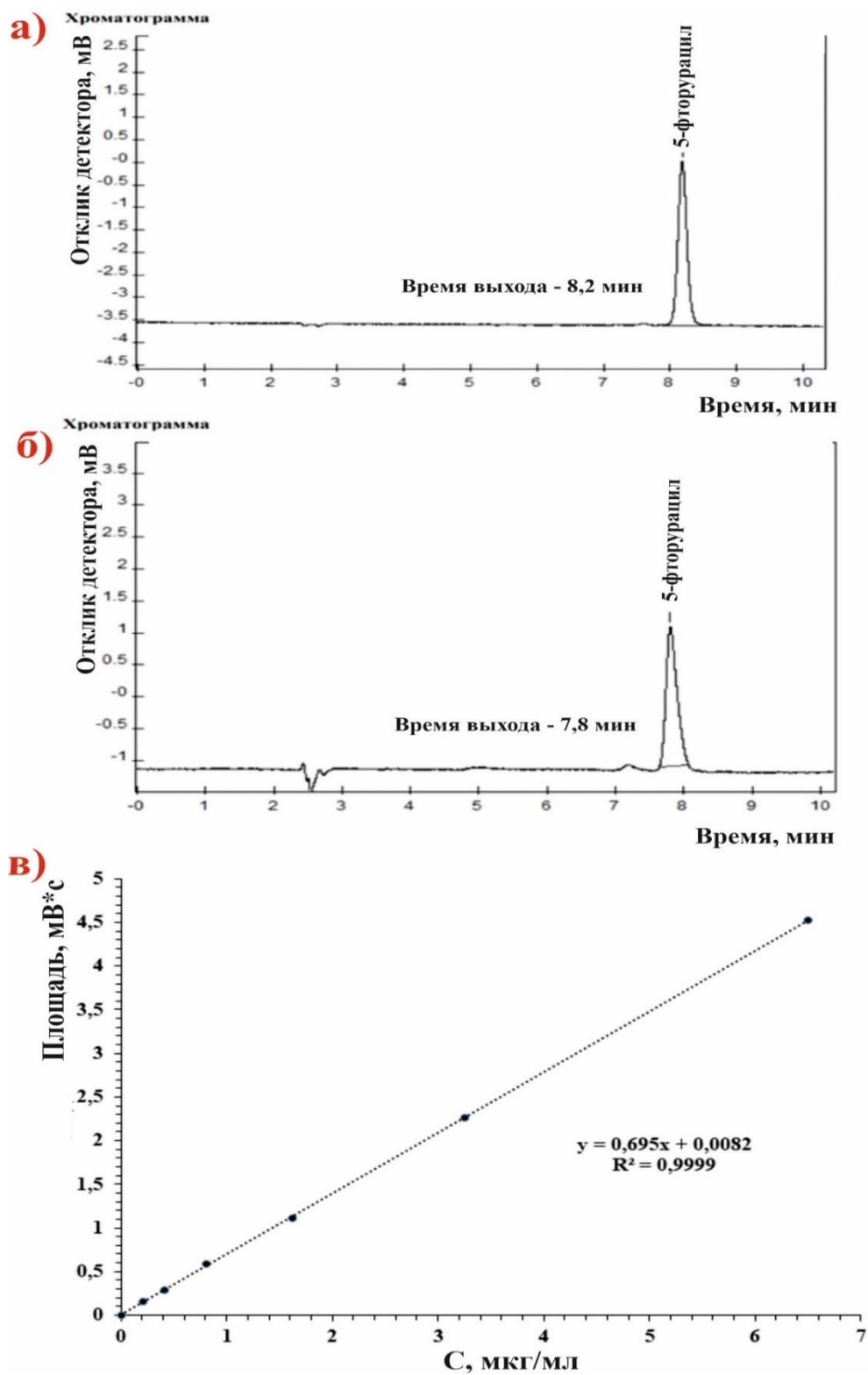


Рисунок 3.13 - ВЭЖ-хроматограммы растворов стандартного образца 5-фторурацила в буферном растворе (а) и в геле (б), градуировочный график (в)

Вид хроматограммы не изменялся в присутствии плацебо, что характеризует ВЭЖХ-методику установление подлинности, удовлетворяющей критерию **специфичности**. Асимметричность пиков оставалась постоянной и не превышала 1,5. **Пригодность** хроматографической системы оценивалась в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0001.15 и удовлетворяла условиям анализов в данной ОФС. Следовательно, учитывая специфичность методики, и её пригодность, можно предложить методику ВЭЖХ для метода количественного определения 5-ФУ.

Градуировочная зависимость интенсивности сигнала (площади) от концентрации 5-фторурацила при pH 7,4±0,1 представлена на рисунке 3.13 (в). ВЭЖХ-методика количественного определения 5-фторурацила в гелях удовлетворяет критерию **линейности**. Уравнение линейной регрессии имело вид $Y = aX + b$, где $a = 0,695$, $b = 0,0082$ и коэффициент корреляции равен 0,999. Область линейности 0,1-6,5 мкг/мл, предел обнаружения (ПО) – 0,101 мкг/мл; предел количественного определения (ПКО) – 0,303 мкг/мл.

Правильность оценивали по относительному отклонению RSD, % на основании сравнения фактического и заданного количества стандарта. Метод удовлетворяет критериям правильности, если относительное отклонение измеренного фактического значения 5-фторурацила от истинного значения стандарта 5-фторурацила не превышает ±2,0%. Метрологические характеристики по показателю правильность проводили с помощью введения добавок в плацебо (таблица 3.5)

Таблица 3.5 - Найденные значения масс и степень обнаружения 5-фторурацила в пробах плацебо при увеличении содержания компонента

Номер пробы	Введенное кол-во 5-фторурацила, мг	Найденное кол-во 5-фторурацила,			Среднее значение, мг	Степень обнаружения, %
1	8,0	8,1	8,3	8,4	8,2	102,5
2	10,0	10,1	10,1	9,9	10,06	100,6

3	12,0	12,3	12,2	12,1	12,2	101,6
---	------	------	------	------	------	-------

Для определения **прецизионности** (таблица 3.6) (повторяемости и воспроизводимости) проводились многократно испытания при соблюдении следующих условий. **При определении повторяемости** проводили измерения количества 5-фторурацила в пределах короткого промежутка времени в одной и той же лаборатории с использованием одного и того же прибора (Хромос 308) в лаборатории ГАУЗ НО НОЦККСЛС. Прецизионность методики подтверждалась, поскольку коэффициент вариации составлял не более 2,0%.

Таблица 3.6 - Экспериментальные данные, полученные при оценке прецизионности методики

Концентрация раствора 5-фторурацила		День эксперимента	Значения площадей трёх измерений, мВ×с	SD	RSD, %
С, %	С, мг/мл				
1,0	1,0	1	0,304 0,306 0,301	$2,55 \times 10^{-3}$	0,8
1,0	1,0	2	0,311 0,312 0,308	$2,12 \times 10^{-3}$	0,7
1,0	1,0	3	0,309 0,305 0,307	$2,08 \times 10^{-3}$	0,9

Робастность методики количественного определения оценивалась по чувствительности времени выхода от состояния аналитических растворов и растворов образцов, рН подвижной фазы (5,7 и 7,4). Отмечено влияние рН буферного раствора на время выхода 5-ФУ. В таблице 3.7 приведены метрологические характеристики количественного определения 5-фторурацила из гелей методом ВЭЖХ.

Таблица 3.7 - Результаты валидационных испытаний методики количественного определения 5-фторурацила из гелей

Параметр	Результат
Линейность	$R^2 = 0,9999$ Уравнение линейной зависимости $y = 0,695x + 0,008$
Воспроизводимость	RSD = 0,8%
Правильность	RSD = 1,9% Открываемость 98,5-102,5% (99,5%) Доверительный интервал включает значение 99,5% ($99,5 \pm 0,5$)
Специфичность	На хроматограмме раствора “плацебо” отсутствует пик со временем удерживания 5-фторурацила (8,21 мин) в конкретных условиях проведения анализа
Аналитическая область	80-120%
Предел обнаружения	0,101 мкг/мл
Предел количественного определения	0,303 мкг/мл

Таким образом, используемая нами ВЭЖХ-методика количественного определения 5-ФУ из гелей удовлетворяет следующим показателям валидации: специфичность, линейность, прецизионность, правильность, воспроизводимость. Количественное определение 5-фторурацила по рассматриваемой методике ВЭЖХ может быть использовано и для оценки высвобождения 5-фторурацила из гелей, поскольку методика является избирательной и селективной.

Альтернативной методикой количественного определения 5-ФУ является УФ-спектрофотометрический анализ. Анализ 5-ФУ проводили УФ-спектральным с использованием длины волны $\lambda_{\max} = 266$ нм, спектр которого представлен на рисунке 3.14 (а, б). Уравнение градуировочной зависимости

$A=f(c)$ соответствовала линейному уравнению $Y = aX + b$, где $a = 0,5621$, $b = 0,0011$, $R^2 = 0,9999$. Область линейности $0,01 - 0,7$ мг/мл.

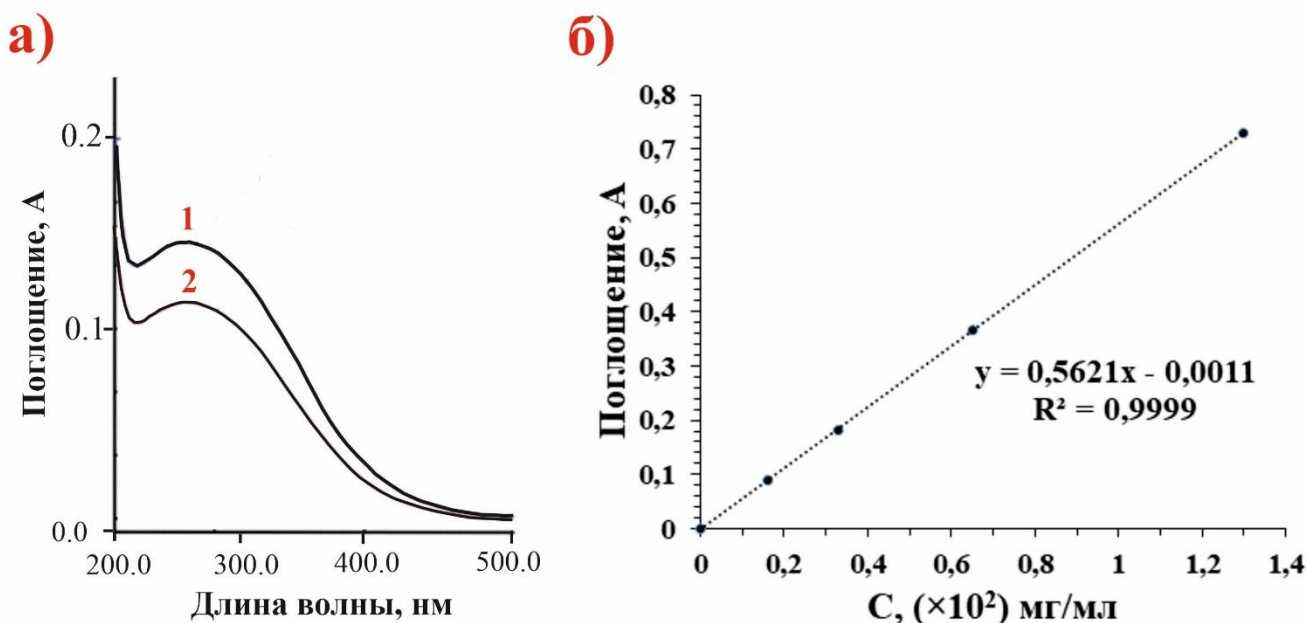


Рисунок 3.14 - (а) УФ-спектры $1,5 \times 10^{-5}$ М стандартного р-ра (кривая 1) и р-ра 5-ФУ из геля разбавление в 500 раз (кривая 2); (б) градуировочная зависимость $A=f(C)$ 5-фторурацила.

3.4.2. Оценка высвобождения 5-фторурацила из геля с использованием теста “Растворение”

Валидация методики испытания “Растворение” для оценки высвобождения 5-ФУ из МЛФ с использованием ячейки Франца является неотъемлемой частью для подтверждения пригодности разрабатываемой методики. Валидацию методики теста “Растворение” проводят также, как и для аналитических методик количественного определения 5-ФУ в геле, в данном случае – ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрии [137]. В разделе 3.4.1. нами было показано, что обе методики удовлетворяют валидационным показателям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность и область линейности. Для характеристики устойчивости или робастности методики испытания “Растворения” с использованием ячейки Франца нами разработан

протокол валидации, в котором, кроме методики валидации количественного определения 5-ФУ, дополнительно протокол включал оценку влияния природы мембраны и объема ячейки.

Была использована ячейка Франца, внешний вид которой и схема представлены на рисунке 2.1. Были исследованы два типа мембран – ацетилцеллюлозная и липидная. Для сохранения одной и той же морфологии, липидная мембрана была приготовлена модификацией ацетилцеллюлозной мембраны обработкой раствором смеси холестерина и лецитина в н-октаноле в соответствии с методикой [138].

На рисунке 3.15 и таблицах 3.8-3.9 представлены результаты оценки высвобождения (проницаемости через мембрану) через ацетилцеллюлозную и липидную мембраны 5-ФУ из геля (состав №3, таблица 3.2) от времени, полученные УФ-спектральным и ВЭЖХ-методами.

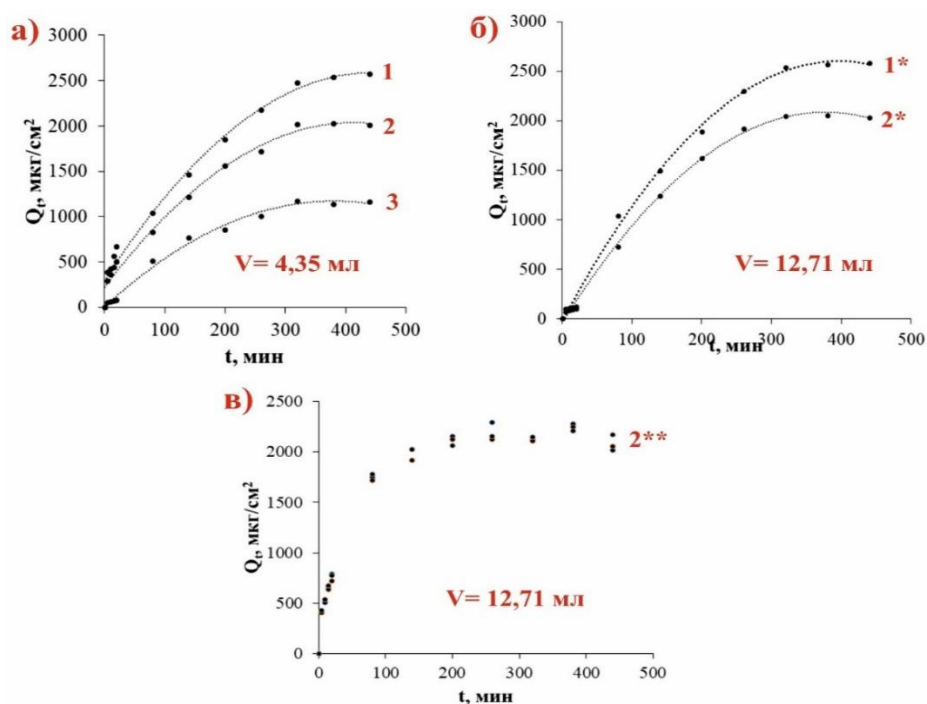


Рисунок 3.15 - Зависимость количества высвободившегося 5-фторурацила (Q_t) от времени через ацетилцеллюлозную мембрану (1,1*) и через липидную мембрану (2,2*,3) из геля 5ФУ (кривая 3) и геля “ CeO_2 нч-5ФУ” (кривые 1,1*,2,2*,2**); а) объём ячейки 4,35 мл; б) объём ячейки 12,71 мл, $n = 3$; в) ВЭЖХ-метод, объём ячейки 12,71 мл, $n = 3$. Цифры 1 и 2 относятся к ацетилцеллюлозной и липидной мембранам, соответственно

Таблица 3.8 - Данные по количеству высвободившегося 5-фторурацила из гелей с CeO_2 нч через липидную мембрану, полученные методом УФ-спектрофотометрии

t, мин	$X_{cp.}$ мкг	S^2	S	$t(P, f)$	ΔX	$RSD, \%$
80	734	444	21	2,45	$\pm 21,3$	2,0
140	1217	1082	33	2,45	$\pm 38,8$	2,0
200	1560	1138	34	2,45	$\pm 41,6$	2,0
320	2017	1704	41	2,45	$\pm 48,1$	2,0
440	2015	1698	41	2,45	$\pm 40,6$	1,9

Таблица 3.9 - Данные по количеству высвободившегося 5-фторурацила из гелей с CeO_2 нч через липидную мембрану, полученные методом ВЭЖХ

t, мин	$X_{cp.}$ мкг	S^2	S	$t(P, f)$	ΔX	$RSD, \%$
80	869	556	24	2,45	$\pm 31,4$	1,8
140	1252	1046	32	2,45	$\pm 37,9$	1,9
200	1555	1026	33	2,45	$\pm 41,6$	2,0
320	2003	1516	39	2,45	$\pm 48,1$	2,0
440	2048	1589	40	2,45	$\pm 40,7$	2,0

Из данных рисунков следует, что в отсутствии CeO_2 нч количество высвободившегося 5-ФУ (55%) почти в два раза меньше, чем в комбинированной МЛФ (75-80%). Следовательно, CeO_2 нч, в разработанной нами композиции усиливают высвобождение, а следовательно, и проницаемость через липофильную мембрану, имитирующую роговой слой кожи.

Полученные данные, обобщенные на рисунке 3.15, и таблицах 3.7-3.8, характеризуют методику оценки высвобождения 5-ФУ из геля с использованием ячейки Франца как УФ-спектральным методом, так и методом ВЭЖХ достоверной ($RSD \leq 2,0\%$).

Таким образом, валидация теста “Растворение” с использованием ячейки Франца для оценки количественного высвобождения 5-ФУ из гелей показала соответствие методики основным валидационным показателям. Протокол валидации включал валидацию количественного определения 5-ФУ методами УФ и ВЭЖХ по показателям правильности, прецизионности, специфичности, линейности и устойчивости методики, включающей объем ячейки, природа мембран, метод анализа.

Другим важным выводом из испытания “Растворение” является способность CeO_2 не улучшать профиль высвобождения 5-ФУ из МЛФ.

Математическое моделирование кинетики высвобождения 5-ФУ из геля через липидную и гидрофильную мембраны было проведено методом подбора основных уравнений, описывающих кинетику высвобождения: уравнение псевдо-второго порядка, Корсмейера-Пеппаса и Хигучи, по коэффициенту вариации (R^2). Полученные нами данные показали, что процесс высвобождения подчиняется уравнению псевдо-второго порядка, аналогично процессам десорбции веществ из полимерной мембраны. (рисунок 3.16)

Учитывая коэффициент корреляции ($R^2 = 0,9986$ для гидрофильной ацетилцеллюлозной мембраны и $R^2 = 0,9991$ для липидной мембраны), кинетика высвобождения 5-фторурацила как через гидрофильную, так и через липофильную мембраны соответствует уравнению реакции псевдо-второго порядка. Рассчитанные значения констант высвобождения 5-фторурацила соответствовали $K(5\text{-фторурацила}) = 7,3 \times 10^{-8} \text{ см}^2/\text{мкг} \times \text{мин}$ – для ацетилцеллюлозной мембраны и $K(5\text{-фторурацила}) = 1,0 \times 10^{-7} \text{ см}^2/\text{мкг} \times \text{мин}$ – для липидной мембраны.

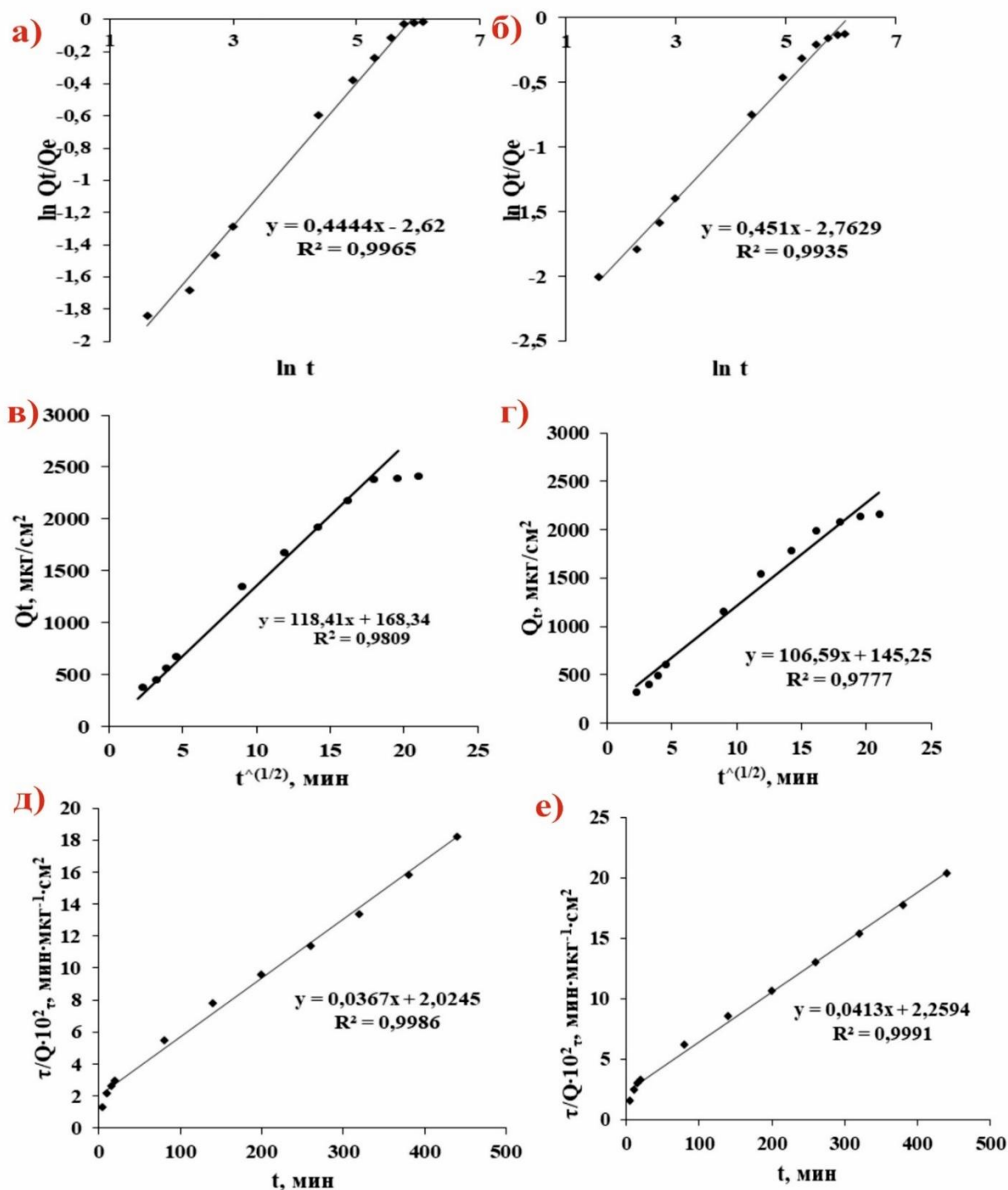


Рисунок 3.16 - Математическое моделирование процесса высвобождения 5-ФУ из геля через гидрофильную мембрану (а,в,д) и через липофильную (б,г,е) в соответствии с уравнениями Корсмейера-Пеппаса (а,б); Хигучи (в,г); псевдо-второго порядка (д,е)

Уравнения этого вида характеризуют высвобождение веществ из полимерной матрицы по механизму адсорбции-десорбции, лимитируемых диффузией в гранулах сорбента [134].

Решение этого уравнения позволяет рассчитать безразмерную константу скорости высвобождения $K_{кр}$, равную 13,62 и 15,67 для гидрофильной и липофильной мембран, соответственно. Рассчитанная экспонента высвобождения $n = 0,45$, отражающая механизм транспорта 5-ФУ, характеризует процесс высвобождения в период от двух до четырех часов как процесс контролируемой диффузии по Фику.

Таким образом, разработанные нами подходы к стандартизации геля 5-ФУ с наночастицами оксида церия и валидация методики испытания “Растворение” с ячейкой Франца для оценки высвобождения 5-ФУ из геля, показали, в что все методики контроля качества геля (подлинность, количественное определение) удовлетворяют валидационным показателям (специфичность, линейность, правильность, прецизионность). Введение CeO_2 нч в состав геля улучшает высвобождение 5-ФУ, которое описывается математически как уравнение псевдо-второго порядка, характерное для десорбции из гранул полимера, а в средней части кинетической кривой, за исключением начального периода, процесс высвобождения может рассматриваться как процесс контролируемой диффузии по Фику. Полученные результаты создают возможность использования этого геля в фармацевтической промышленности.

3.5. Технология изготовления комбинированного геля 5-фторурацила с наночастицами оксида церия

На основании лабораторных экспериментов, можно предложить следующую технологию получения геля. На первом этапе технологического процесса необходима подготовка сырья, помещений, оборудования и

персонала (рисунок 3.18, процесс ВР-1). Процесс включает следующие стадии:

1) Стадия ВР-1.1 включает в себя подготовку воздуха посредством фильтрации. Обработку поверхностей производят с применением перекиси водорода 3 % для исключения контаминации.

2) На стадии ВР-1.2 осуществляют подготовку воды очищенной посредством последовательных стадий предварительной фильтрации, ионообменной фильтрации, пропускания через мембрану обратного осмоса, электродеионизации.

3) На стадии ВР-1.3 осуществляется установка систем получения и распределения сжатого воздуха в помещении

4) Стадия ВР-1.4 включает в себя подготовку оборудования и приготовление дезинфицирующих растворов

5) На стадиях ВР-1.5 и ВР-1.6 осуществляется подготовка персонала и технологической одежды в соответствии с утвержденными процедурами предприятия.

На втором этапе подготовки сырья (ВР-2) производят посредством формирования навесок действующих и вспомогательных веществ в количестве, необходимых для приготовления геля.

Технологический процесс (ТП) состоит из четырех стадий:

1) Приготовление основы геля ТП-1 осуществляют путем диспергирования гидроксиэтилцеллюлозы в воде очищенной. Контроль (Кт) осуществляется визуально по отбору проб. Дисперсия должна быть прозрачной и однородной. Вариант оборудования для получения комбинированной МЛФ в лабораторных условиях представлен на рисунке 3.17.



Рисунок 3.17 – Лабораторное оборудование для приготовления комбинированных МЛФ

2) На этапе ТП-2 отдельно готовятся следующие растворы: определенное количество нитрата церия (III), меглумина и 5-фторурацила.

3) На стадии ТП-3 к основе геля добавляют растворы, полученные на этапе ТП-2.1 и ТП-2.2 при тщательном перемешивании и нагревании при 60 °С в течение 30-40 минут.

4) На стадии ТП-4 к гелю, содержащего наночастицы оксида церия, добавляют раствор 5-фторурацила при перемешивании и дополнительно вводят меглумин для достижения определенного pH. При получении геля отбираются пробы на контроль по таким показателям, как вязкость, pH, микробиологический контроль (категория 2).

ВР 1. Подготовка (санитарная обработка)

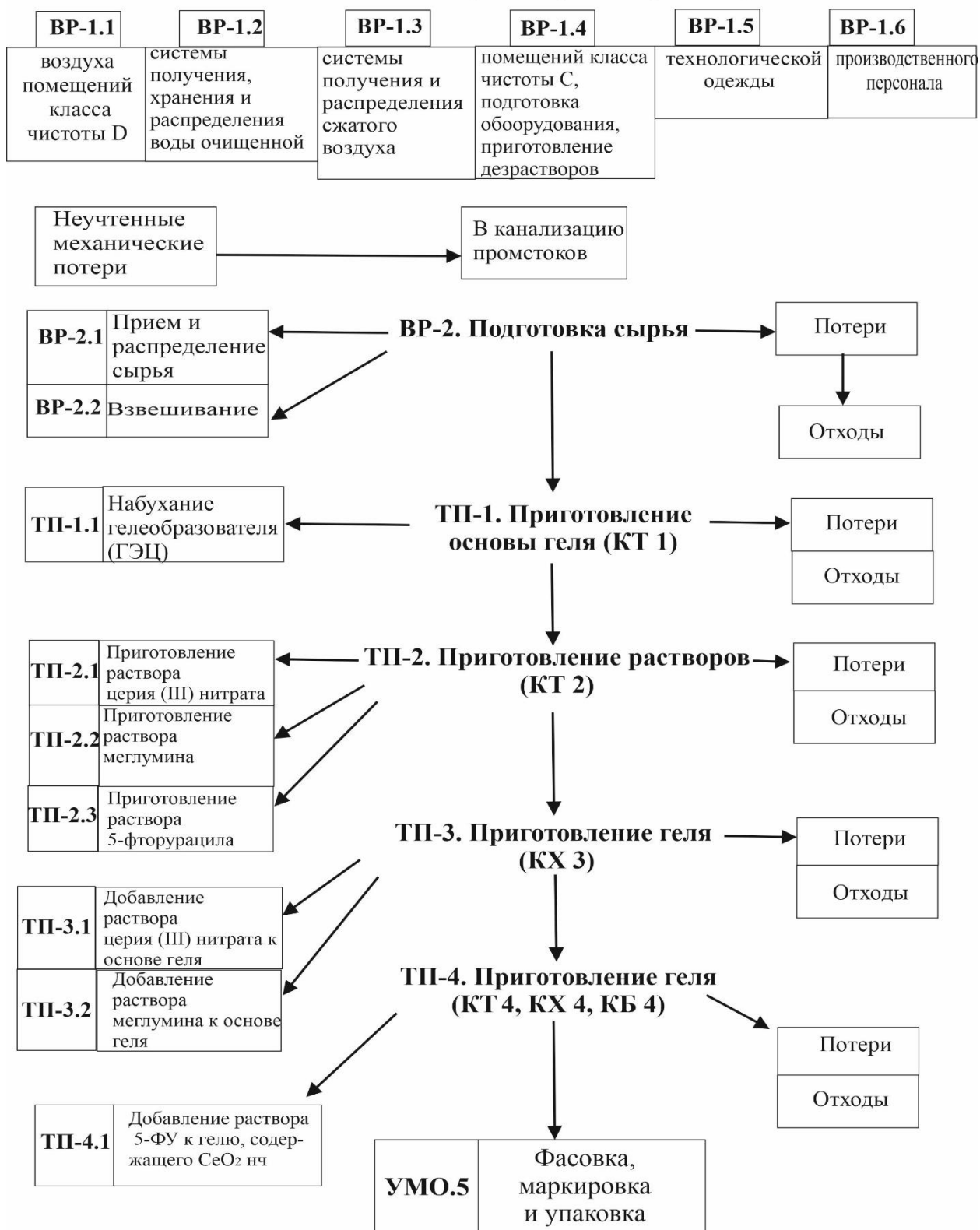


Рисунок 3.18 - Технологическая схема производства геля 5-фторурацила с наночастицами оксида церия

Критические стадии технологического процесса и обоснование точек контроля приведены в таблице 3.10

Таблица 3.10 - Контроль критических стадий технологического процесса

Наименование стадии	Критический параметр	Контрольная точка	Обоснование
ТП-1 Приготовление основы геля	Однородность основы	КТ 1	Подтверждение отсутствия нерастворимых компонентов гелеобразователя
ТП-2 Приготовление растворов	Прозрачность растворов	КТ 2	Подтверждение отсутствия нерастворимых компонентов
ТП-3 Приготовление геля с CeO_2 нч	Идентификация	КХ 3	Наличие экситона CeO_2 нч (УФ спектрофотометрия) $\lambda_{\text{max}} = 270\text{-}300$ нм
ТП-4 – МЛФ с 5- ФУ	Однородность основы	КТ 4	Подтверждение отсутствия нерастворимых компонентов геля
	Вязкость	КХ 4	3000-6000 мПа×с
	Микробиологическая чистота	КБ 4	Категория 2. Не более 10^2 КОЕ на 1,0 г геля.
	рН водного извлечения	КХ 4	7,0-7,4

При соответствии показателей, промежуточную продукцию передают на стадию УМО-5.

3.5.1. Изучение стабильности геля, разработка проекта спецификации качества

Важным показателем МЛФ является способность сохранять тиксотропность, микробиологическую чистоту, неизменность химического состава (сохранение концентрации действующих веществ, в данном случае – 5-ФУ и CeO_2 нч, а также индифферентность к упаковке при хранении и использовании).

Нами исследована стабильность (Таблица 3.11) оптимального разработанного состава №3 в течение 2 лет в условиях лаборатории, включающая определение следующих показателей: подлинность 5-фторурацила и CeO_2 нч, масса содержимого упаковки, размер частиц CeO_2 нч, pH, микробиологическая чистота и количественное определение 5ФУ. В таблице 3.10 представлены данные по изменению свойств препарата с 05.02.2023 по 20.02.2025. На основе полученных результатов был предложен проект спецификации качества комбинированного геля

Таблица 3.11 – Результаты изучения стабильности геля

<i>Показатель</i>	<i>Норма</i>	<i>Результаты исследования</i>						
		0	3 мес	6 мес	9 мес	12 мес	18 мес	24 мес
Описание	Однородный прозрачный гель желто- золотистого цвета	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.
Подлинность	Время удерживания пика 5-ФУ в геле должно	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.

	соответствовать времени удерживания СО 5-ФУ							
pH	7,0-7,4	7,2 ±0,1	7,2 ±0,1	7,2 ±0,1	7,3 ±0,1	7,3 ±0,1	7,4 ±0,1	7,4 ±0,1
Масса содержимого упаковки	95,0-100,0	98,0 ±0,5	98,0 ±0,5	98,0 ±0,5	98,0 ±0,5	98,0 ±0,5	98,0 ±0,5	98,0 ±0,5
Размер частиц CeO_2 нч	100-140 нм	120- 125	120- 128	120- 129	120- 131	120- 133	120- 137	120- 139
Микробиологическая чистота	Категория 2	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.
Количественное определение	Содержание 5- ФУ не менее 95,0% и не более 101,0%	98,2 ±0,1	98,2 ±0,1	98,2 ±0,1	98,2 ±0,1	98,2 ±0,1	97,9 ±0,1	97,9 ±0,1

Разработан проект спецификации показателей качества мягкой лекарственной формы “ CeO_2 нч-5ФУ” (Таблица 3.12)

Таблица 3.12 - Спецификации показателя качества геля “ CeO_2 нч-5-ФУ”

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Органолептический	Однородная, слегка опалесцирующую дисперсия легкого желтого оттенка.
Подлинность	УФ, ВЭЖХ	1) Время удерживания пика 5-фторурацила в испытуемом образце должно соответствовать времени удерживания основного пика на

		хроматограмме стандартного образца 2) Появление полосы поглощения экситона CeO_2 нч при $\lambda_{\text{max}} = 270\text{-}300 \text{ нм}$
Вязкость	ОФС.1.2.1.0015.15 Вязкость	3000-6000 мПа×с
рН раствора	ОФС.1.2.1.0004.15 Ионометрия	7,0-7,4
Количественное определение	ФС.2.1.0348	Не менее 95,0% и не более 101,0% 5-фторурацила
Микробиологическая чистота	ОФС.1.2.4.0002.15	Категория 2
Упаковка	В соответствии с НД	
Маркировка	В соответствии с НД	
Хранение	В оригинальной упаковке в защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С	
Срок годности	2 года	

Общие выводы к главе 3:

1. На основании исследования цитотоксичности наночастиц оксида церия в их комбинации с 5-фторурацилом разработаны состав и технология гидрофильного комбинированного геля 5-фторурацила и наночастиц оксида церия.
2. Разработана спецификация показателей качества полученного геля, проведена валидация методики количественного определения 5-фторурацила при высвобождении по показателям специфичность, правильность, прецизионность и линейность, результаты определения которой легли в основу технологической схемы производства геля.

ГЛАВА 4. ПОЛУЧЕНИЕ КОМБИНИРОВАННЫХ ГЕЛЕЙ КСИМЕДОНА С НАНОЧАСТИЦАМИ ОКСИДА ЦИНКА И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ

Ксимедон – оксопиримидиновый спирт с растворимостью в воде от 100-275 г/л, является АФС, относящийся к классу “репаранты-регенеранты” и наиболее широко известен своими ранозаживляющими и антиоксидантными свойствами, в частности, при лечении ожогов [96]. Усиление этих свойств возможно при комбинировании ксимедона с наночастицами оксида цинка, проявляющими бактерицидное, антиоксидантное и противовоспалительное действия и способен усиливать действие ксимедона, выступая в качестве вектора доставки. Кроме того, ксимедон, в отличие от 5-фторурацила, является слабым органическим основанием, рКа которого равно 3,25 [14]. Можно полагать, что хемосорбционное взаимодействие ксимедона более благоприятно с наночастицами оксида цинка чем с наночастицами оксида церия. Использование наночастиц оксида церия нецелесообразно также по причине легкой окисляемости спиртовой группы ксимедона в присутствии ионов четырехвалентного церия. Наночастицы оксида цинка, кристаллическую решетку которых составляет ион с постоянной валентностью, неспособны окислять ксимедон.

Фармацевтическая разработка комбинированной МЛФ ксимедона с наночастицами оксида цинка включала в себя исследования биологической активности комбинации ксимедона с ZnO нч, разработку и обоснование состава и технологии приготовления геля, выбор показателей качества, по которым препарат проходит испытание на стабильность на протяжении всего срока годности, оценку биофармацевтического показателя – высвобождение ксимедона. Подготовительный этап, включающий анализ научной литературы, анализ мирового рынка, анализ нормативно-правовой документации, определяющий стратегию разработки комбинированного геля, был представлен в литературном обзоре.

Дизайн эксперимента представлен на рисунке 4.1:



Рисунок 4.1 - Основные этапы фарм разработки состава и технологии геля ксимедона с наночастицами оксида цинка

4.1. Приготовление и модификация наночастиц оксида цинка

4.1.1. Выбор гелеобразователя

Для разработки комбинированной МЛФ гидрофильного ксимедона с наночастицами оксида цинка в виде геля необходимо обосновать выбор основы. В работах авторов [14] показано, что полиэлектролиты природных полимеров, например, Na-КМЦ, пектины и др. не образуют стабильные гели с ксимедоном [14]. Со временем гели теряли структурно-механические характеристики, уменьшалась структурная вязкость, пропадала прозрачность и становились микробиологически неустойчивыми при хранении. Кроме того, в этих системах ксимедон быстро окислялся под действием кислорода воздуха в течение времени и приобретал красную окраску [14]. Продуктами окисления являются соединения D1, D2, D3. (Рисунок 4.2)

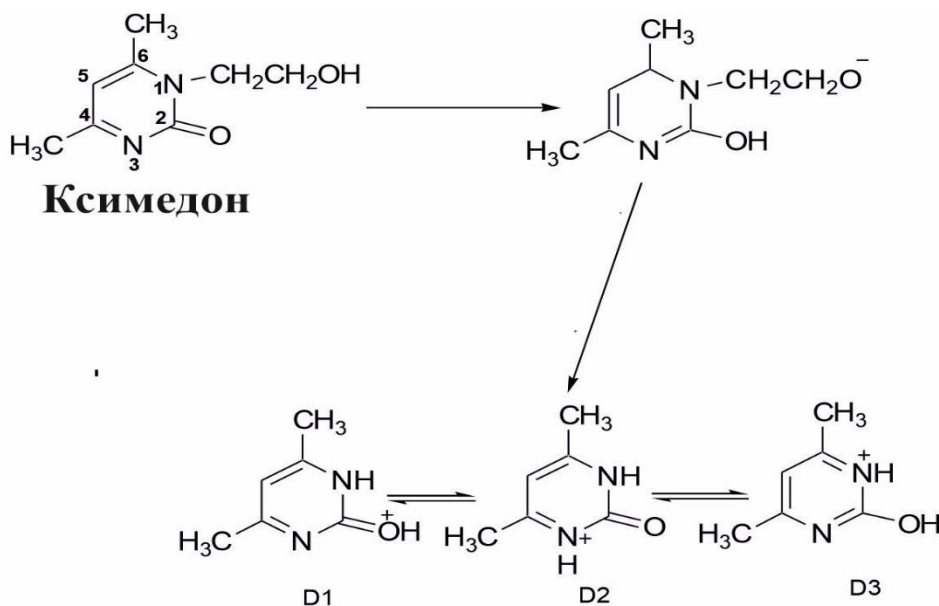


Рисунок 4.2 – Схема образования продуктов окисления ксимедона в присутствии кислорода в гелях полисахаридов

Ранее, в работах авторов было показано, что полиакрилатные основы типа карбопола (редко-сшитая полиакриловая кислота) является хорошей основой геля за счет мягкого комплексообразования ксимедона, являющийся слабым основанием с кислотными группами полиакриловой кислоты. Нами изучены карбомеры марки U-10, Carbopol® 980 NF, Carbopol® 940 NF.

Эксперименты по выбору гелеобразователя проводили, используя магнитную мешалку и 100 мл холодной воды очищенной и навеску полимеров (1,0 - 1,5 г) после предварительного набухания. Ксимедон хорошо диспергировался во всех гелевых основах. Наибольшая стабильность ксимедона отмечалась с карбомером PNF 974, введение ZnO нч в гелевые основы, не приводило к коагуляции и к окислению ксимедона. Гели оставались прозрачными слабого желтого цвета.

Использование гелеобразователя – карбомер PNF 974 в концентрации выше 1,0% обуславливало образование вязких гелей. Структурная вязкость изменялась от 8000 до 250 000 мПа×с при изменении скорости шпинделя от 1 до 60 об./мин. Требованием к качеству гелевой основы является небольшое время и условия (перемешивание в течение 30 минут при комнатной температуре) набухания, проявляющееся в однородности геля. Нами показано, что в интервале концентраций карбомер PNF 974 от 0,5 до 1,0% гель оставался прозрачным и однородным, хорошо гомогенизировался, и не вызывал окисления ксимедона.

4.1.2. Модификация наночастиц оксида цинка ксимедоном

Несмотря на то, что, гели ксимедона являются агрегативно устойчивыми в течение длительного времени, введение наночастиц оксида цинка может разрушить стабильность дисперсной системы.

В связи с этим, нами предложена методика приготовления комбинированного геля ксимедона с наночастицами оксида цинка, дополнительно защищенные ксимедоном.

Для создания комбинированного геля мы использовали и проанализировали наночастицы оксида цинка, предоставленные предприятием АО "Усолъе-Сибирский химфармзавод" с размером частиц 20-100 нм.

Количество примесных элементов контролировали методом индукционно-связанной плазмы (В, Mg, Ca, Fe, Si не более 20 ppm; Li – не

более 1 ppm); ИК-спектр должен содержать полосы, характерные для наноразмерных частиц оксида цинка: ν , см^{-1} , 3274 (-OH); 452 (Zn-O); элементный анализ – содержание Zn – не менее $78,8 \pm 0,1\%$; O – не менее $21,1 \pm 0,1\%$; C – не более $0,1\%$; количественное определение методом ААС, проведенное при растворении в смеси $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (6:1) в соответствии с ГФ должно показывать содержание Zn^{2+} не более $0,1\%$; порошковая дифрактограмма должна содержать рефлексы, присущие ZnO нч со структурой вюрцита - 2 Θ , град.: 32,02(100); 34,48(002); 36,76(101); 47,68(102); 56,41(110).

Стерилизацию проводили дважды гамма-облучением, один раз после приготовления для хранения в специальном боксе. Вторично наночастицы оксида цинка стерилизовали после загрузки ксимедона погружением в раствор наночастиц в раствор ксимедона.

Значение дзета-потенциала наночастиц, не модифицированных ксимедоном, в воде равно $+13,0 \pm 1,20$ мВ, а после модификации ксимедоном: $-23,79 \pm 3,55$ мВ.

В мультимодальном режиме было зарегистрировано наличие одной моды с максимумом при 4500 нм (Рисунок 4.3). В трех измерениях из десяти зафиксированы пики при 100-200 нм. В весовом (объемном) распределении также регистрировали одну моду с максимумом при 3700 нм (Рисунок 4.4). В трех измерениях и десяти зафиксированы пики при 100-200 нм.

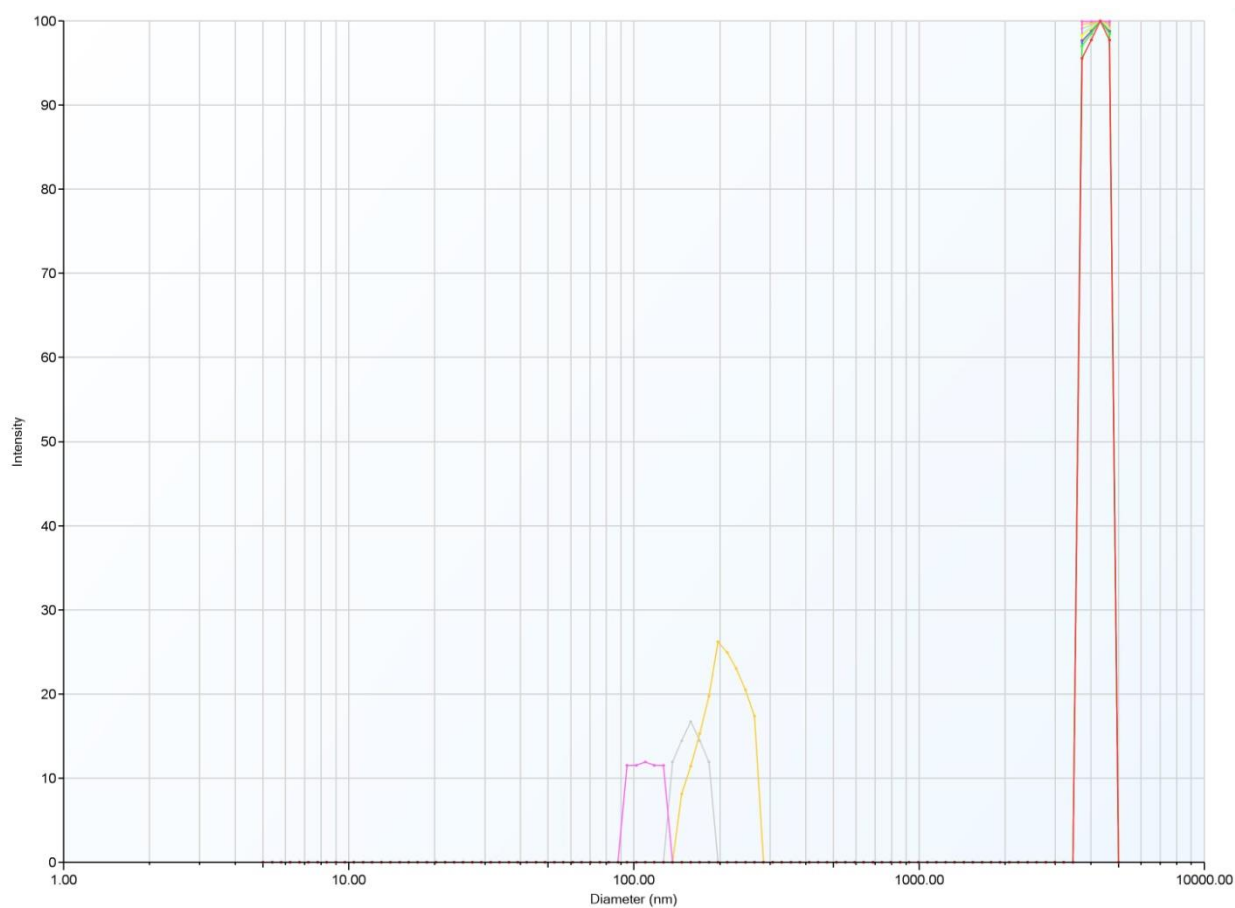


Рисунок 4.3 - Распределение размеров частиц ZnO нч, модифицированных ксимедоном по интенсивности рассеяния (мультимодальный режим).

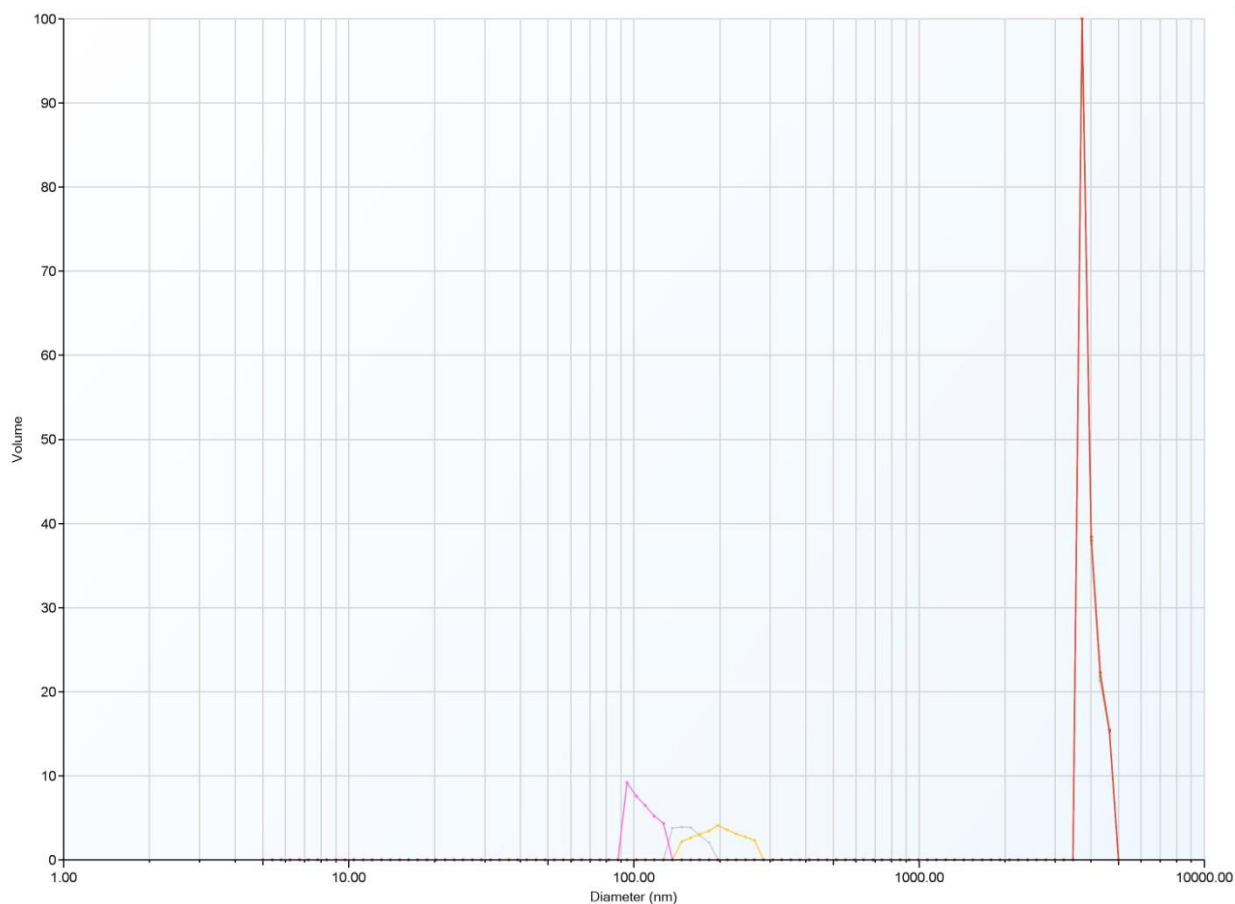


Рисунок 4.4 - Распределение размеров частиц для образца ZnO нч с ксимедоном по объему рассеяния (мультимодальный режим).

В изученных дисперсиях количество столкновений из-за межчастичных взаимодействий увеличивается, тогда как средняя длина пути, пройденного частицами между последовательными столкновениями, падает. Мы предполагаем, что увеличение размера ZnO NPs (4500 нм по интенсивности и 3700 нм по объему) связано с образованием защитной оболочки, состоящей из ксимедона.

Таким образом, сильное увеличение гидродинамических радиусов ZnO нч-ксимедон в полярной среде до 4500 нм является хорошим аргументом в пользу разработки гидрофильных МЛФ.

Иммобилизацию ксимедона проводили путём сорбции из водного раствора ксимедона при комнатной температуре. Высушенные образцы

анализировали методами УФ и ИК-спектрофотометрии и рентгеновской дифрактометрии (рисунки 4.5 - 4.7), таблица 4.1.

В ИК-спектрах присутствовали полосы, характерные, для ксимедона - ν , см^{-1} : 3209 (-ОН, -NH); 3100-2500 (-CH, -CH₂, -CH₃); 1606, 1659 (C=O, амид I, амид II), и полосы наноразмерных частиц оксида цинка: ν , см^{-1} , 3274 (-ОН); 452 (Zn-O).

Таблица 4.1 - Данные ИК-спектров анализируемых образцов, ν , см^{-1} (функциональные группы)

Образец	3600-3200 (-ОН, -NH и др.)	3100-2900 (-CH, -CH ₂ , -CH ₃)	1655-1541 (C=O, Амид I, Амид II)	470-450 (Zn-O в ZnO нч)
ZnO нч	3468	-	-	451
ZnO нч- Ксимедон	3274	3100-2500	1606, 1659, 1541	453
Ксимедон	3209	3100-2500	1602, 1655	452

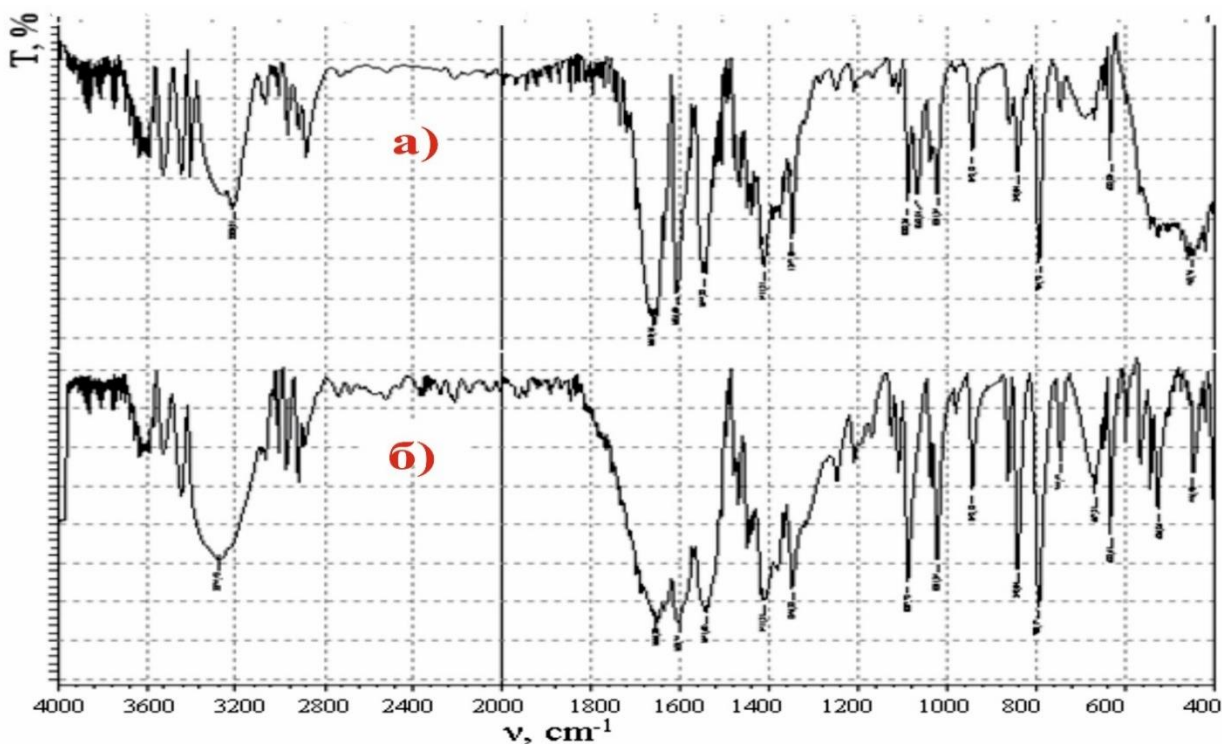


Рисунок 4.5 - ИК-спектры: а) ZnO нч-ксимедон; б) ксимедона

В УФ-спектрах образцов ZnO нч-ксимедон наблюдалась полоса поглощения экситона, характерная для полупроводниковых оксидов металлов в области 320-360 нм (рисунок 4.6)

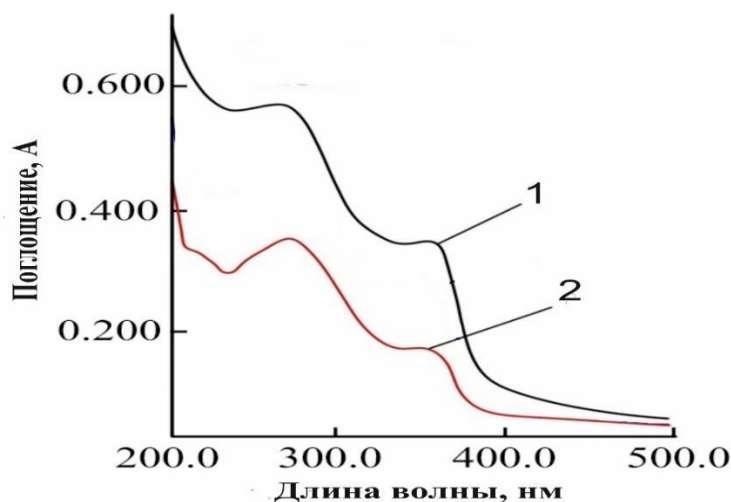


Рисунок 4.6 - УФ-спектры образцов: 1 – ZnO нч; 2 - ZnO нч-ксимедон

В УФ-спектре суспензии ZnO нч – ксимедон ($C = 2,8$ мг/100 мл этанола) поглощение полосы экситона (А) при длине волны 360 нм уменьшалось практически в полтора раза с 0,347 (для исходного ZnO нч) до 0,198 (для ZnO нч – ксимедон) при этой же концентрации, что также характеризует иммобилизацию ксимедона в ZnO нч.

Данные порошковой рентгенофазовой дифрактометрии исходных и модифицированных наночастиц оксида цинка приведены на рисунке 4.5.

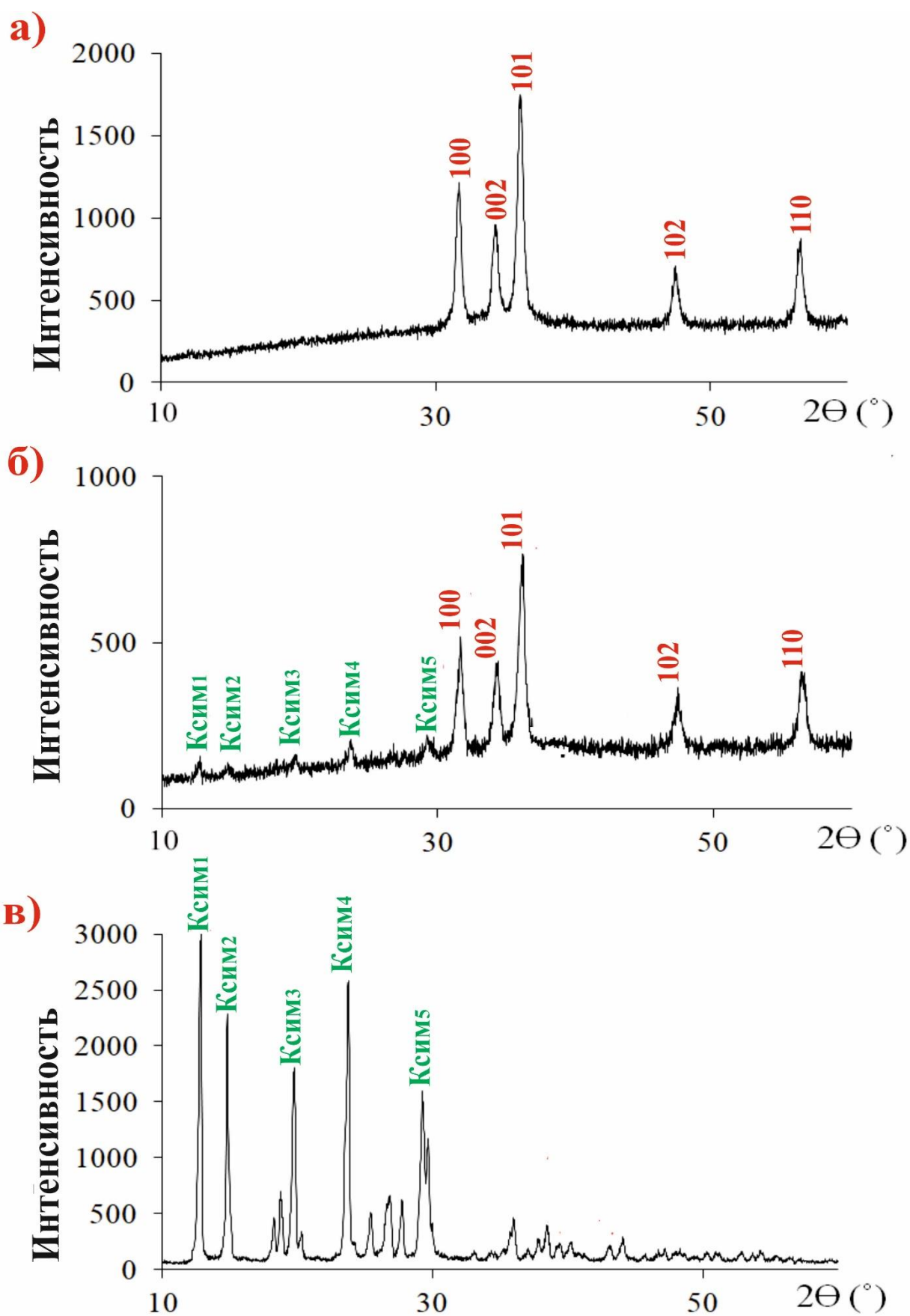


Рисунок 4.7 - ПРФД полученных образцов: а) ZnO нч; б) ZnO нч-ксимедон; в) ксимедона

Рентгенограммы (рисунок 4.7) полученных ZnO нч – ксимедон (б) содержали рефлексы, присущие ZnO нч (а) со структурой вюрцита - 2 Θ , град.: 32,02(100); 34,48(002); 36,76(101); 47,68(102); 56,41(110), и рефлексы, отражающие кристаллическую структуру ксимедона (в) - 2 Θ , град.: 13,12; 14,84; 19,86; 24,08; 30,76; 37,41; 44,26.

Таким образом, нами получены наночастицы оксида цинка, с иммобилизованным ксимедоном, пригодные для введения в гидрофильную основу полиакрилатного геля.

4.2. Разработка состава гидрофильного геля ксимедона с наночастицами оксида цинка

Гель ксимедона с наночастицами оксида цинка на гидрофильный основе карбопола 974Р NF был приготовлен последовательной загрузкой раствора ксимедона в водную 1,0 % дисперсию набухшего карбопола 974Р NF, затем загрузкой наночастиц оксида цинка с иммобилизованным ксимедоном при непрерывном перемешивании при комнатной температуре в течение 30 минут.

Алгоритм приготовления гидрофильных гелей ксимедона с ZnO нч

- 1) В соответствии с рассчитанным составом отвешивали необходимое количество ксимедона (0,8-1,2 г) в 5-20 мл воды очищенной. Образовывался ярко-золотистый раствор.
- 2) В соответствии с рассчитанным составом отвешивали необходимое количество ZnO нч (0,05-0,1 г) и помещали в раствор ксимедона на 12 часов при постоянном перемешивании при комнатной температуре.
- 3) После 12 часов перемешивания данную дисперсию сушили при помощи лиофильной сушки. Образовывался белый или почти порошок ZnO нч с иммобилизованным ксимедоном.
- 4) В соответствии с рассчитанным составом отвешивали необходимое количество карбопола 974Р NF (0,5 - 1,0 г), отмеривали 50 мл воды очищенной при 25 °С. стакан устанавливали на магнитную мешалку и добавляли навеску

карбопола через воронку. Оставшееся количество ксимедона (3,5-4,0 г) растворяли в 5-20 мл воды очищенной. Полученный раствор и высушенный порошок ZnO нч с иммобилизованным ксимедоном добавляли к основе геля при постоянном перемешивании.

5) В результате образовавшийся гель ярко-золотистого цвета выдерживают сутки при комнатной температуре.

Принципиальная схема последовательного получения геля ксимедона с ZnO нч представлена на рисунке 4.8

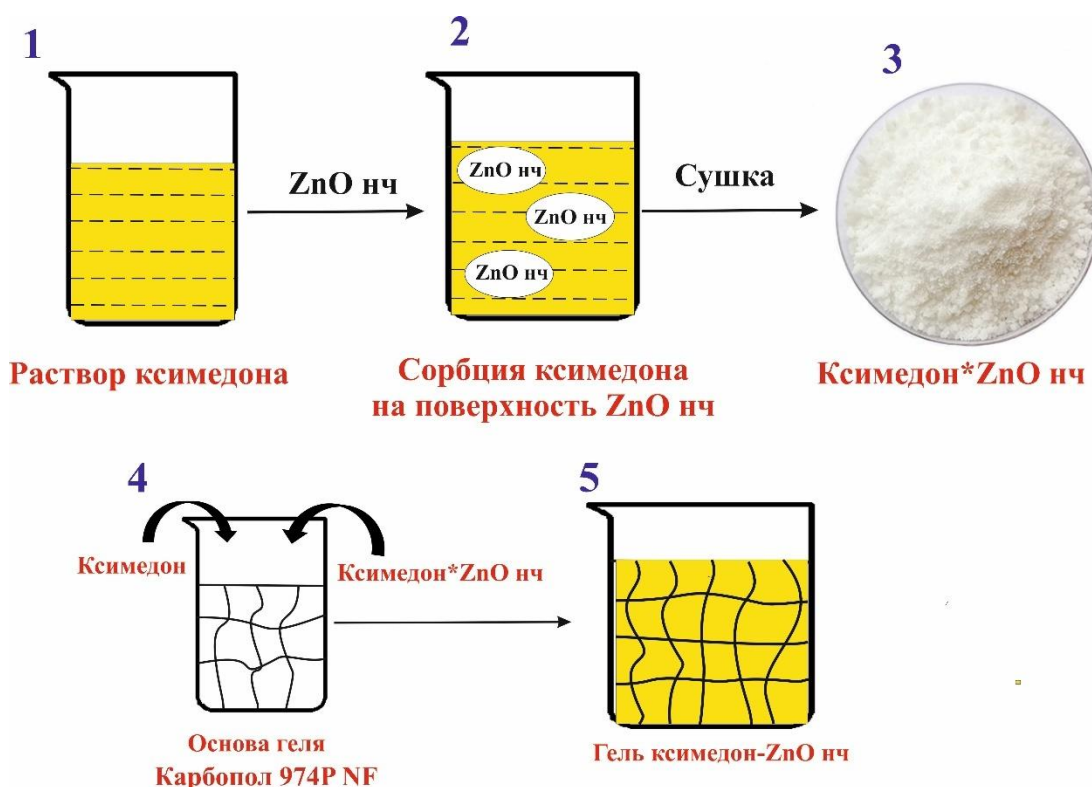


Рисунок 4.8 - Схематическая иллюстрация получения комбинированного геля ксимедона с ZnO нч

В таблице 4.2 приведены изучаемые составы гелей. Показано, что оптимальным составом, сохраняющий стабильность в течение полугода, является состав №2, содержащий 5,0 % ксимедона и 0,1% ZnO нч.

Состав гелей (соотношение между компонентами) был оптимизирован с помощью пакета программ “Minitab”, используя в качестве основного параметра вязкость геля (рисунок 4.9).

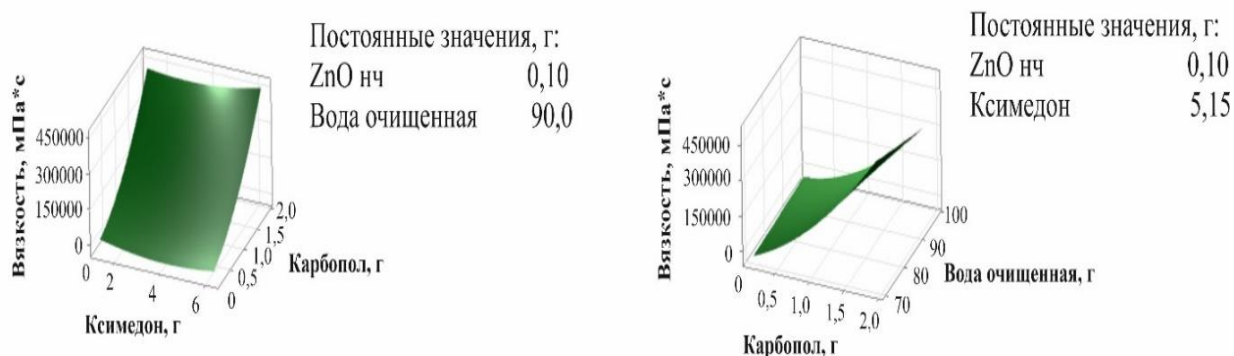


Рисунок 4.9 - Оптимизация составов гелей, содержащих ксимедон с наночастицами оксида цинка

Таблица 4.2 - Содержание компонентов в 100,0 г геля

№ Компонент	Содержание, г				
	1	2	3	4	5
Ксимедон	5,0	5,0	5,0	2,5	5,0
ZnO нч	0,05	0,1	0,1	0,1	-
Карбопол 974P NF	0,5	1,0	0,8	0,6	1,5

Воды очищенной до 100,0 г

Общая концентрация ксимедона в геле равна 5%, из них 4% вводится в виде раствора в основу, а 1,0% - используется на иммобилизацию наночастиц оксида цинка.

Величина pH водного извлечения из геля была в интервале 7,0-7,4. Структурная вязкость геля (Рисунок 4.10), оцененная по изменению вязкости от концентрации и скорости вращения имела значение от 8000 до 250000 мПа*с. Практическое отсутствие петли гистерезиса на зависимость “вязкость – скорость вращения шпинделя” характеризует предлагаемый гель как тиксотропный: площадь под кривой при сжатии и растяжении были равны 260957 и 262261, соответственно.

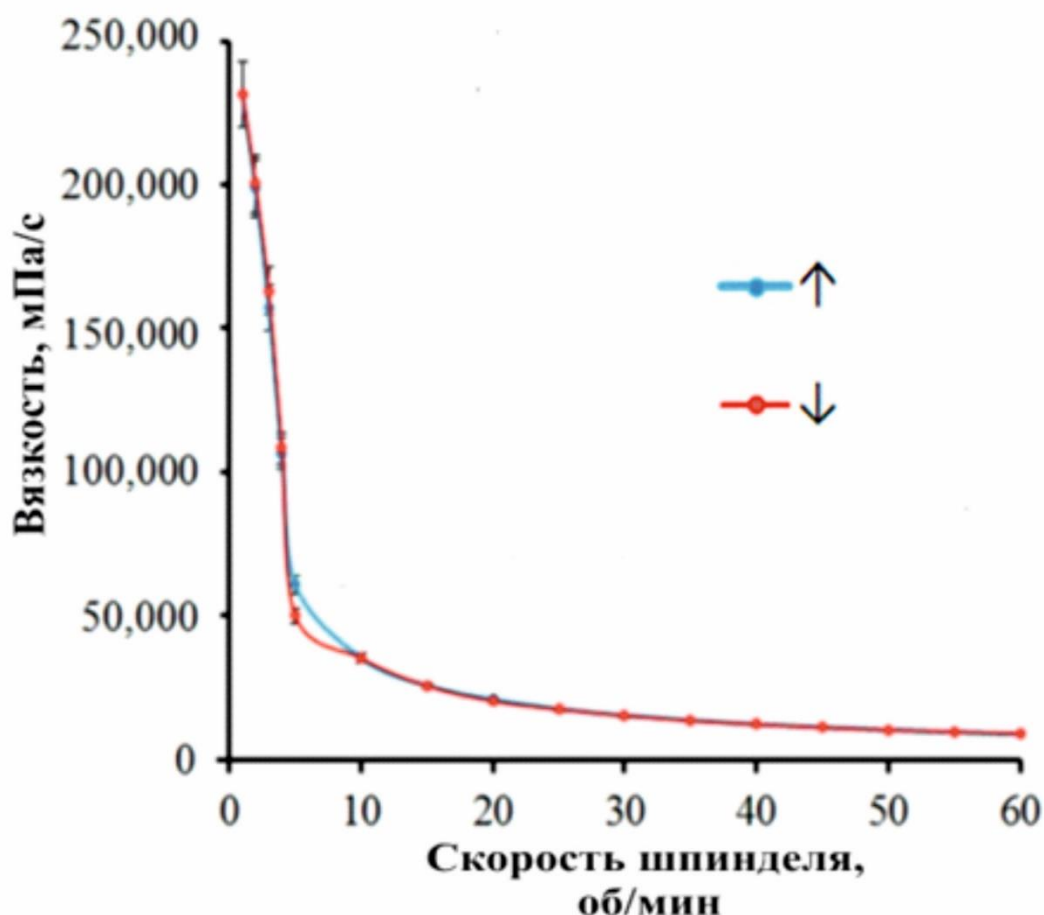


Рисунок 4.10 - Структурная вязкость как функция скорости шпинделя геля “ZnO нч-ксимедон”

В целом, следует отметить, что введение суспензии ксимедона с наночастицами оксида цинка в гидрофильную основу геля, содержащей карбопол при комнатной температуре позволяет получить комбинированную МЛФ с удовлетворительными тиксотропными свойствами.

4.3. Оценка высвобождения ксимедона из геля с использованием теста “Растворение”

Оценка высвобождения проводилась в соответствии с тестом “Растворение” с использованием ячейки Франца объемом 12,71 мл. Для валидации испытания на “Высвобождение” нами проведена валидация собственно аналитической методики количественного определения ксимедона в гелях – УФ-спектрального метода анализа.

4.3.1. Валидационные характеристики методики количественного определения ксимедона в гелях

Специфичность методики определялась по соответствию интенсивности поглощения растворов пробы из акцепторной камеры с интенсивностью поглощения раствора стандартного образца ксимедона известной концентрации в присутствии следов карбопола, измеренного в идентичных условиях на одном и том же приборе. Относительное стандартное отклонение (RSD, %) отдельного результата не превышало по показателю специфичность (таблица 4.3). Таким образом, методика удовлетворяет критерию специфичности.

Таблица 4.3 - Оценка специфичности количественного определения ксимедона в гелях УФ-спектральным методом в присутствии примесей – соединений цинка

Образец	Интенсивность поглощения растворов ксимедона, усл.ед.			Среднее значение интенсивности поглощения, усл.ед.	SD	RSD, %
Ксимедон в пробе	0,102	0,106	0,105	0,104	$2,12 \times 10^{-3}$	1,99
Стандарт ксимедона	0,221	0,220	0,228	0,223	$3,37 \times 10^{-3}$	1,51
ZnO (0,001%)	0	0	0	0	0	0

Правильность оценивали по относительному отклонению RSD, % на основании сравнения фактического и заданного количества стандарта. Метод удовлетворяет критериям правильности, так как относительное отклонение измеренного фактического значения ксимедона от истинного значения стандарта ксимедона не превышает $\pm 2,0\%$.

Линейность методики определяли для серии растворов ксимедона (с концентрациями в диапазоне линейности от 0,01 до 0,5 мг/мл). Зависимость интенсивности поглощения от концентрации имел вид $Y=aX+b$ (рисунок 4.11),

коэффициент корреляции $R^2=0,9984$, что подтверждает линейность методики.

Предел обнаружения ксимедона составлял 0,05 мг/мл.

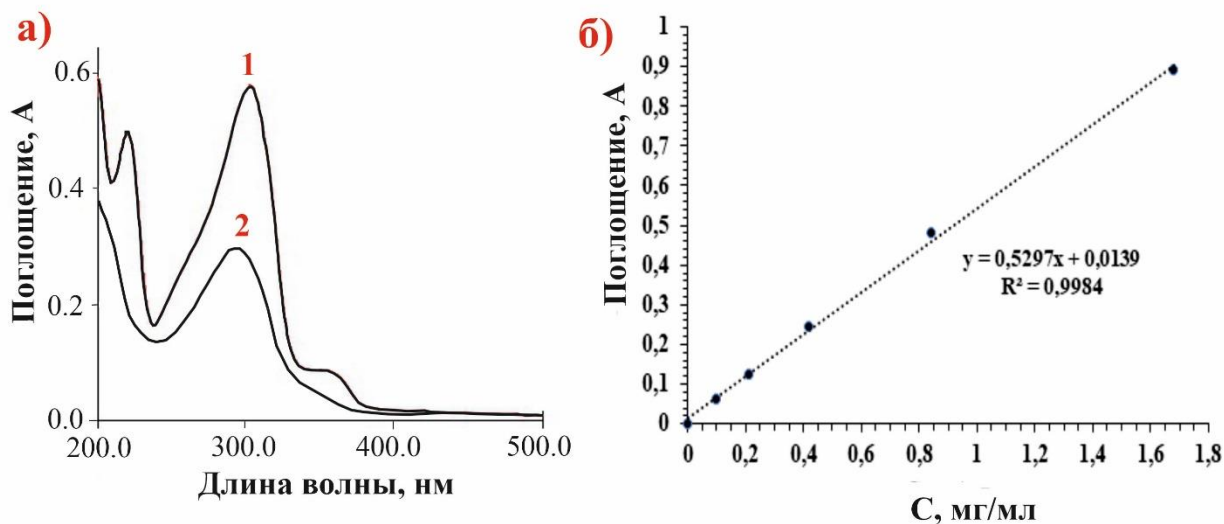


Рисунок 4.11 - (а) УФ-спектры $5,0 \times 10^{-5}$ М стандартного р-ра (кривая 1) и р-ра ксимедона из геля, разбавление в 100 раз (кривая 2); (б) градуировочная зависимость $A=f(C)$ ксимедона

Для определения **прецизионности** (таблица 4.4) (повторяемости и воспроизводимости) мы проводили многократно испытания при соблюдении следующих условий. **При определении повторяемости** проводили измерения количества ксимедона в пределах короткого промежутка времени в одной и той же лаборатории с использованием одного и того же прибора в лаборатории НИИ Химии университета Лобачевского. Прецизионность методики подтверждалась, поскольку коэффициент вариации составлял не более 2%.

Таблица 4.4 - Результаты расчетов при оценке прецизионности методики

Концентрация раствора ксимедона		День эксперимента	Значения интенсивности поглощения из трёх измерений, усл.ед.	SD	RSD, %
C, %	C, мкг/мл				
5,0	500	1	0,102 0,104 0,105	$1,58 \times 10^{-3}$	1,51
5,0	500	2	0,109 0,111 0,107	$2,08 \times 10^{-3}$	1,83
5,0	500	3	0,105 0,106 0,104	$1,87 \times 10^{-3}$	1,78

Таким образом, предлагаемая методика количественного определения ксимедона в геле с наночастицами оксида цинка соответствует валидационным характеристикам по показателям линейности, правильности, прецизионности, специфичности и может быть использована для количественного определения высвободившегося ксимедона.

4.3.2. Высвобождение ксимедона из комбинированного геля с наночастицами оксида цинка

На рисунке 4.12 представлены зависимость количества ксимедона (Q_t , мкг/см²), высвободившегося из геля ZnO нч-ксимедон в акцепторную камеру объёмом 12,71 мл от времени (t, мин): через гидрофильную ацетилцеллюлозную мембрану (кривая 1), через липидную мембрану (кривая 2)

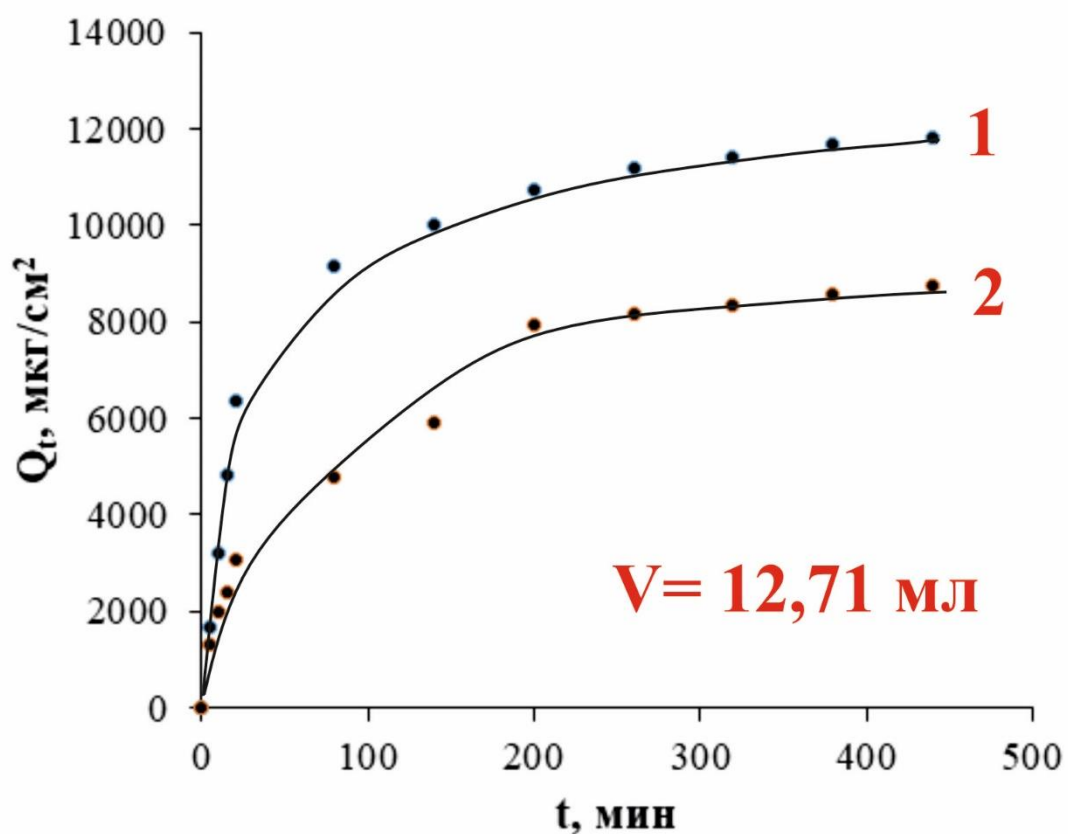


Рисунок 4.12 - Зависимость высвобождения ксимедона (Q_t) от времени через ацетилцеллюлозную мембрану (1) и через липидную мембрану (2) из геля ZnO нч-ксимедон ($n=7$).

Метрологические характеристики количественного определения ксимедона в гелях представлены в таблице 4.5

Таблица 4.5 - Метрологические характеристики количественного определения ксимедона в гелях

t , мин	X_{cp} мкг	S^2	S	$t(P, f)$	ΔX	$RSD, \%$
80	4765	8848	94	2,45	$\pm 88,4$	1,9
140	5784	12763	113	2,45	$\pm 105,3$	1,9
200	7938	25536	160	2,45	$\pm 149,5$	1,9
320	8113	28023	167	2,45	$\pm 156,9$	1,9
440	8596	29412	172	2,45	$\pm 161,7$	1,9

Математическое моделирование процесса высвобождения было проведено графическим методом, преобразуя данные (Q) в координатах уравнений нулевого порядка, псевдо-второго порядка, Корсмейерра-Пеппаса, Хигучи. Результаты по коэффициенту вариации показали, что высвобождение ксимедона подчиняется уравнению Корсмейера-Пеппаса в средней части кинетической кривой за исключением первоначального периода ($R^2 = 0,9972$) (рисунок 4.13). Процесс высвобождения может быть соответствовать уравнению псевдо-второго порядка ($R^2 = 0,9995$). Уравнения этого вида характеризуют высвобождение веществ из полимерной матрицы по механизму адсорбции-десорбции, лимитируемых диффузией в гранулах сорбента [135].

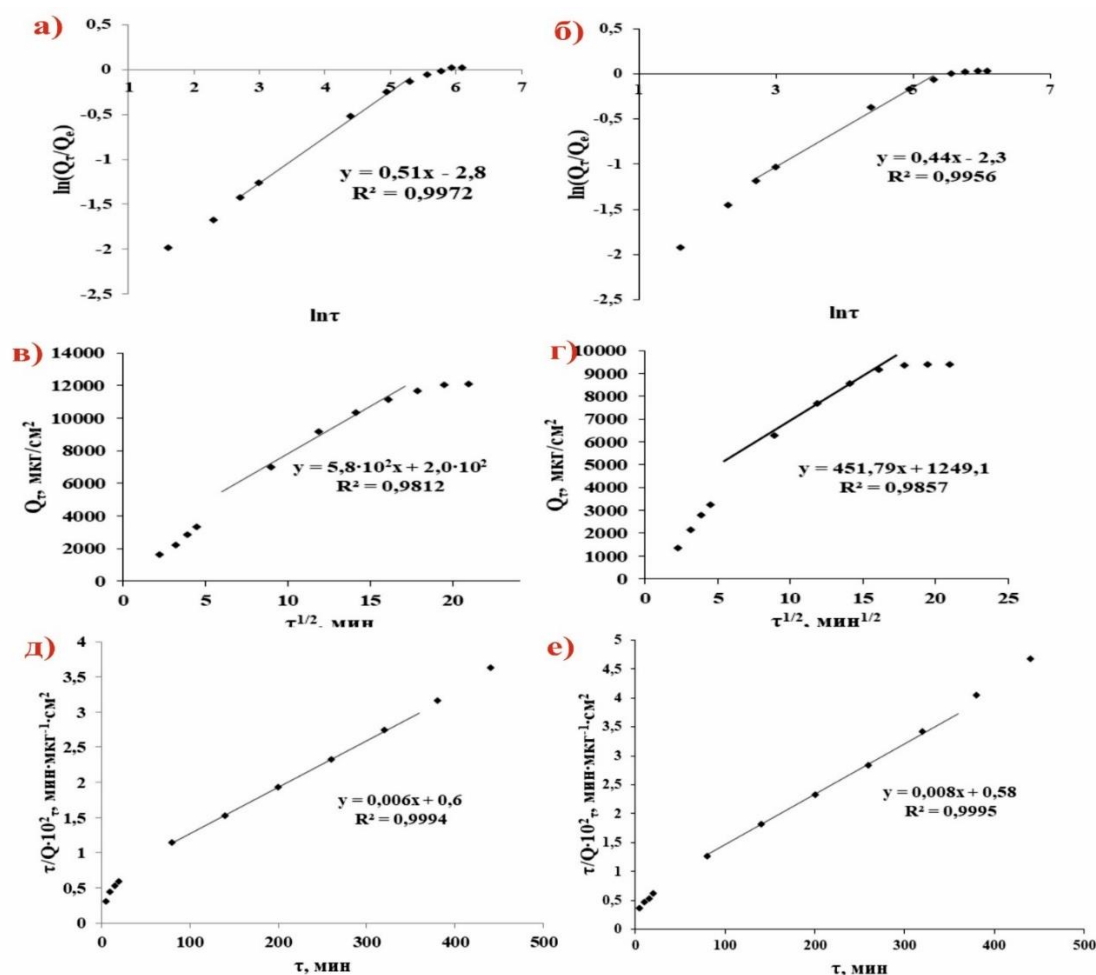


Рисунок 4.13 - Кинетическое моделирование процесса высвобождения ксимедона из геля в линейных координатах уравнений: а,б) Корсмейера-Пеппаса; в,г) Хигучи; д,е) псевдо-второго порядка; а,в,д – гидрофильная мембрана; б,г,е – липидная мембрана.

В целом, можно ответить, что разработанная нами методика приготовления геля ксимедона с наночастицами оксида цинка позволяет получить состав геля, контроль качества которого обуславливает валидационные характеристики – линейность, прецизионность, специфичность, требуемые для методик количественного определения и подлинности и может быть рекомендован для фармацевтической разработки.

4.3.3. Технология получения комбинированного геля ксимедона с наночастицами оксида цинка

На основании лабораторных экспериментов, можно предложить следующую технологию получения геля (рисунок 4.14).



Рисунок 4.14 - Технологическая схема производства геля ксимедона с наночастицами оксида цинка

Общие этапы технологического процесса были описаны ранее в главе 3.

1) На этапе подготовки сырья (ВР-2) производят посредством формирования навесок действующих и вспомогательных веществ в количестве, необходимых для приготовления геля.

2) Входной контроль наночастиц оксида цинка (ТП – 1)

3) Приготовление основы геля ТП - 2 осуществляют путем набухания гелеобразователя карбопола в воде очищенной

4) На этапе ТП-3 отдельно готовятся следующие растворы: а) ксимедон (1,0 г) растворяют в этаноле 96%; б) приготовление дисперсии наночастиц оксида цинка в растворе ксимедона (4,0 г).

5) На стадии ТП-4 к основе геля добавляют растворы и дисперсии, полученные на этапе ТП-3 при тщательном перемешивании. При получении геля отбираются пробы на контроль по таким показателям, как вязкость, рН водного извлечения геля и микробиологический контроль.

6) При соответствии показателей, промежуточную продукцию передают на стадию УМО-5.

Критические стадии технологического процесса и обоснование точек контроля приведены в таблице 4.6.

Таблица 4.6 - Контроль критических стадий

Наименование стадии	Критический параметр	Контрольная точка	Обоснование
ТП-1 Приготовление наночастиц оксида цинка	-	КТ 1	Входной контроль
ТП-2 Приготовление основы геля	Однородность основы	КТ 2	Подтверждение отсутствия нерастворимых компонентов
ТП-3 Приготовление растворов и дисперсии	Однородность растворов	КТ 3	Отсутствие нерастворимых компонентов
ТП-4 – Приготовление геля с ZnO нч и ксимедоном	Вязкость	КТ 4	8000-250000 мПа×с
	Микробиологическая чистота	КБ 4	Категория 2. Не более 10 ² КОЕ на 1,0 г геля.
	рН водного извлечения	КХ 4	7,0-7,4

При соответствии показателей, промежуточную продукцию передают на стадию УМО-5.

4.3.4. Изучение стабильности геля, разработка проекта спецификации качества

Нами изучены стабильность геля по показателям: способность сохранять тиксотропность, микробиологическая чистота, неизменность химического состава (сохранение концентрации действующих веществ, в данном случае – ксимедона и ZnO нч, а также индифферентность к упаковке при хранении и использовании).

Стабильность оптимального разработанного состава изучалась в течение 2 лет в условиях лаборатории, включающая определение следующих показателей: подлинность ксимедона, масса содержимого алюминиевой тубы, размер частиц ZnO нч, pH, микробиологическая чистота и количественное определение ксимедона. В таблице 4.7 представлены данные по изменению свойств препарата с 08.02.2022 по 20.02.2024. На основе полученных результатов был предложен проект спецификации качества комбинированного геля

Таблица 4.7 – Результаты изучения стабильности геля

<i>Показатель</i>	<i>Норма</i>	<i>Результаты исследования</i>						
		0	3 мес	6 мес	9 мес	12 мес	18 мес	24 мес
Описание	Однородный прозрачный гель яркого-золотистого цвета	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.
Подлинность	Появление полосы поглощения ксимедона при $\lambda_{\text{max}} = 299\text{-}300$ нм	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.
pH	7,0-7,4	7,2 $\pm 0,1$	7,2 $\pm 0,1$	7,2 $\pm 0,1$	7,3 $\pm 0,1$	7,3 $\pm 0,1$	7,4 $\pm 0,1$	7,4 $\pm 0,1$
Масса содержимого упаковки	95,0-100,0	98,0 $\pm 0,5$	98,0 $\pm 0,5$	98,0 $\pm 0,5$	98,0 $\pm 0,5$	98,0 $\pm 0,5$	98,0 $\pm 0,5$	98,0 $\pm 0,5$
Размер частиц ZnO нч	20-100 нм	40-45	40-45	40-45	40-45	45-50	45-50	55-60
Микробиологическая чистота	Категория 2	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.	соот.
Количественное определение	Содержание ксимедона не менее 95,0% и не	99,2 $\pm 0,1$	98,8 $\pm 0,1$	98,5 $\pm 0,1$	98,2 $\pm 0,1$	97,3 $\pm 0,1$	97,0 $\pm 0,1$	96,5 $\pm 0,1$

	более 101,0%							
--	-----------------	--	--	--	--	--	--	--

Разработан проект спецификации показателей качества мягкой лекарственной формы ZnO нч-ксимедон (таблица 4.8)

Таблица 4.8 – Проект спецификации показателя качества геля ZnO нч-ксимедон

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Визуальный	однородная, слегка опалесцирующую дисперсия легкого желтого оттенка.
Подлинность	УФ	Появление полосы поглощения ксимедона при $\lambda_{\max} = 299-300$ нм
Вязкость	ОФС.1.2.1.0015.15 Вязкость	8000-250000 мПа×с
рН	Ионометрия ОФС.1.2.1.0004.15	7,2-7,4
Количественное определение	УФ ОФС.1.2.1.1.0003.15	Содержание ксимедона не менее 95,0% и не более 101,0%
Микробиологическая чистота	ОФС.1.2.4.0002.15	Категория 2
Упаковка	В соответствии с НД	
Маркировка	В соответствии с НД	
Хранение	В оригинальной упаковке в защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С	
Срок годности	2 года	

4.4. Биологическая активность геля ксимедона с наночастицами оксида цинка

Оценена биологическая активность ранозаживляющего геля ксимедона с наночастицами оксида цинка на модели ожоговой раны. На рисунке 4.15 показана визуализация ожоговых ран во время лечения метилурацилом (положительный контроль) и гелем ZnO нч-ксимедон (экспериментальная группа).

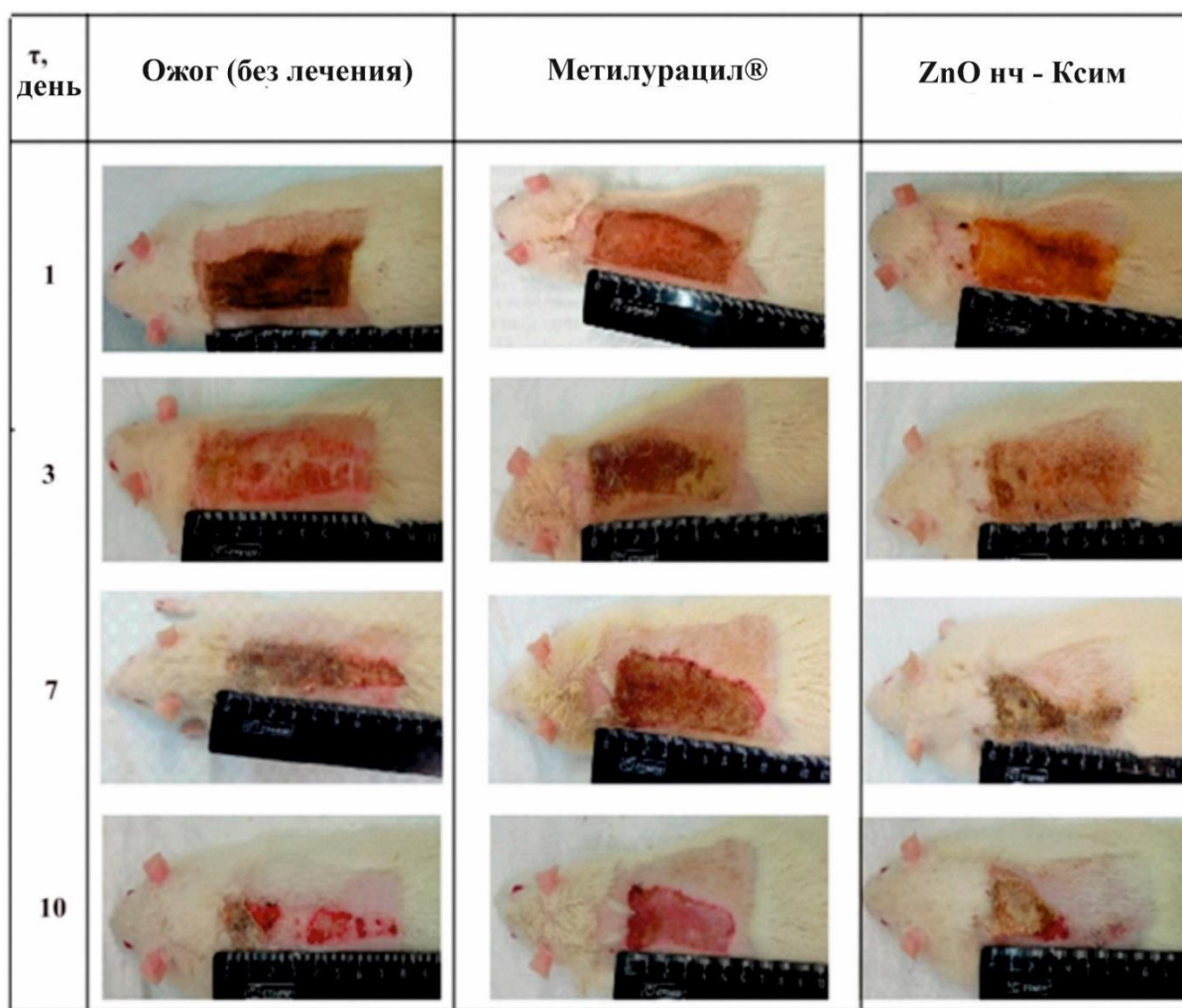


Рисунок 4.15 - Фотографии ожоговой раны у крыс, леченных метилурацилом и “ZnO нч–ксимедон” в течение 1, 3, 7 и 10 дней. (n=7)

Таблица 4.9 показывает уменьшение площади ожога при лечении Метилурацилом®, гелем ZnO нч и гелем ZnO нч-ксимедон. Уменьшение площади ожога при лечении гелем ZnO нч–ксимедон (на 48%) было более

значительным, чем при лечении гелем ZnO нч (на 31%) и мазью Метилурацила (на 40%).

Таблица 4.9 - Изменение площади раны во время лечения

Группа	Площадь ожога			
	День 0		День 10	
	см ²	%, контроль	см ²	%, контроль
Ожог	23,97±0,54	100	18,48±0,35	77
Метилурацил®	25,03±0,48	100	15,01±0,39	60
Гель ZnO нч– Ксим	24,45±0,25	100	12,75±0,54	52
Гель ZnO нч	24,67±0,23	100	16,94±0,27	69

В таблице 4.10 представлены данные по оценке удельной активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в прямой и обратной реакциях на крови крыс на 10-й день при обработке Метилурацилом®, гелем ZnO нч и гелем ZnO нч–ксимедон. Удельная активность ЛДГ_{пр.} под действием геля ZnO нч–ксимедон была на 22% и 31% выше, чем у ЛДГ_{пр.} при обработке Метилурацилом® и гелем ZnO нч соответственно. Напротив, удельная активность ЛДГ_{обр.} снизилась на 43% и на 34% при обработке крыс гелем ZnO нч–ксимедон по сравнению с гелем Метилурацила® и гелем ZnO нч. Результаты показывают, что гель ZnO нч–ксимедон обеспечивает более мягкое клеточное дыхание и энергетический обмен, поскольку он больше способствует выработке пирувата, что необходимо для цикла Кребса.

Таблица 4.10 - Удельная активность АлДГ и ЛДГ в прямой и обратной реакциях, а также уровень МДА в крови крыс на 10-е сутки после термического ожога при лечении мягкими лекарственными формами, в % от контроля

Группа	Биохимические показатели, % от контроля			
	ЛДГ _{пр.}	ЛДГ _{обр.}	АлДГ	МДА _{эр.}
Ожог	100	100	100	100
Метилурацил®	122±4	143±5	126±4	106±4
ZnO нч-ксимедон гель	142±5	99±4	124±4	102±4
ZnO нч	112±4	135±5	111±4	115±5

Такая пластичность в регуляции метаболических процессов имеет важное значение в условиях гипоксии при ожоговой травме.

Активность АлДГ, которая участвует в снижении окислительного стресса, в том числе утилизации МДА в эритроцитах, увеличилась на 24–25% при обработке гелем Метилурацил® и ZnO нч–ксимедон и на 10% при обработке гелем ZnO нч (таблица 4.10). Уровень МДА в эритроцитах существенно не изменился при обработке гелем Метилурацил® и ZnO нч–ксимедон и остался близким к активности АлДГ в группе «Ожог без лечения», но уровень МДА_{эр.} увеличился на 15%. Активация специфических антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза и глутатионредуктаза (ГР), наблюдалась в группе положительного контроля (мазь Метилурацил®), группе геля ZnO нч и экспериментальной группе (гель ZnO нч–ксимедон) (таблица 4.11).

Таблица 4.11 - Удельная активность СОД, каталазы и ГР в крови крыс на 10-е сутки после термического ожога при лечении мягкими лекарственными формами, в % от контроля (интактные крысы)

Группа	Биохимические показатели, % от контроля		
	СОД	Каталаза	ГР
Ожог (отр. контроль)	100	100	100
Метилурацил® (пол. контроль)	131±5	105±3	183±9
ZnO нч-Ксим гель	135±5	105±3	160±7
ZnO нч	110±4	98±3	121±4

Различия в удельной активности СОД и каталазы были незначительными, а активность ГР возрастала интенсивнее для мази метилурацила (на 83%) по сравнению с гелем ZnO нч–ксимедон (на 60%). Следовательно, глутатион, сильный антиоксидант, образуется больше под действием мази метилурацила, что косвенно характеризует более сильные антиоксидантные свойства метилурацила по сравнению с предлагаемой фармацевтической композицией. Вероятно, этот эффект можно объяснить конкурентной генерацией активных форм кислорода под действием ZnO нч. Однако присутствие только ZnO нч не обеспечивало таких эффектов. Данные по антиоксидантным свойствам и данным по заживлению ран под действием геля ZnO нч–ксимедон показывают синергетический эффект за счет ксимедона, ZnO нч и конъюгатов ксимедона с ZnO нч. Поверхностные комплексы ZnO нч–ксимедон были подтверждены данными ИК-спектроскопии, рефlekсами ПРФД после иммобилизации ксимедона. Комплексы ZnO нч–ксимедон улучшают динамику высвобождения компонентов из лекарственной формы в отличие от ZnO нч без модификации.

Более того, образование конъюгатов ZnO нч–ксимедон позволяет разрабатывать стабильные тиксотропные гели на основе гидрофильной полиакриловой кислоты с использованием малой концентрации ксимедона и ZnO нч.

Общие выводы к главе 4:

Разработан состав и технология ранозаживляющего комбинированного гидрофильного геля ксимедона с наночастицами оксида цинка на основе карбопола 974Р NF. Разработаны спецификации показателей качества ксимедона в мягкой лекарственной форме, технологическая схема производства препарата, изучены показатели качества препарата. Продемонстрированы антиоксидантные и высокие ранозаживляющие свойства мягкой лекарственной формы ксимедона с наночастицами оксида цинка на модели ожоговой раны на крысах.

Заключение

В работе разработаны подходы получения дермальных мягких лекарственных форм хорошо растворимых в воде оксопиримидинов – ксимедона и 5-фторурацила. Предложены составы и технология получения комбинированных гелей оксопиримидинов с наночастицами оксидов металлов: ранозаживляющий гель ксимедона с наночастицами оксида цинка и противоопухолевый гель 5-фторурацила с наночастицами оксида церия. Эффективность мягких лекарственных форм подтверждена биологическими экспериментами и оценкой высвобождения оксопиримидинов.

Выводы

1. Патентно-информационные исследования по разработке технологии и состава мягких лекарственных форм полярных пиримидиновых соединений – ксимедона и 5-фторурацила, показали низкую эффективность гелей и мазей, не имеющих компонентов системы доставки. Наночастицы оксидов металлов, такие как наночастицы оксида цинка и церия, способны не только выступать в качестве носителей полярных молекул, но и действовать в синергизме с основным фармакологическим эффектом. Данные о составах и технологии получения комбинированных мягких лекарственных форм для ксимедона и 5-фторурацила практически отсутствуют, нет отечественных препаратов на фармацевтическом рынке.
2. На основании исследования цитотоксичности наночастиц оксида церия и их комбинаций с 5-фторурацилом на клеточных линиях меланомы (B16), колоректального рака (HCT116) показана возможность создания комбинированных лекарственных средств, при этом IC_{50} (мкмоль) снижалась с 10,1 мкмоль/л до 6 мкмоль/л по отношению к 5-фторурацилу и уменьшалось с 219 мкг/мл до 89 мкг/мл по отношению к наночастицам оксида церия.
3. Разработана методика синтеза наночастиц оксида церия в матрице полисахарида методом окислительного осаждения аминспиртом – меглюмином, используя в качестве прекурсора нитрат церия (III), при

температуре 60 градусов в течение 40 минут. Методами рентгеновской дифрактометрии, РФЭС, УФ и ИК-спектроскопии, элементного анализа (ИСП) доказано образование наночастиц оксида церия в матрице полисахарида.

4. Разработан и оптимизирован состав комбинированной мягкой лекарственной формы 5-фторурацилом с наночастицами оксида церия на основе гидроксиэтилцеллюлозы: (%): ГЭЦ -1,6; CeO_2 нч – 0,08; 5-ФУ – 1,0; меглюмина – 0,87; воды очищенной до 100,0.
5. Разработана технология получения стабильной мягкой лекарственной формы “ CeO_2 нч-5-ФУ”, включающий введение раствора 5-фторурацила в гелевую основу с наночастицами оксида церия и предложена технологическая схема производства.
6. Разработаны спецификации показателей качества 5-фторурацила, CeO_2 нч и геля “ CeO_2 нч-5-ФУ” (подлинность, количественное определение 5-фторурацила, pH, вязкость), валидация методики оценки высвобождения по показателям специфичность, линейность, правильность, повторяемость, аналитическая область, результаты которой легли в основу технологической схемы производства геля “ CeO_2 нч-5-ФУ”.
7. Разработан состав ранозаживляющего стабильного комбинированного гидрофильного геля ксимедона с наночастицами оксида цинка на основе карбопола 974P NF состава, (%): ксимедон – 5,0; ZnO нч – 0,1; Карбопол 974P NF – 1,0; вода очищенная до 100,0 и спецификации показателей качества ксимедона в мягкой лекарственной форме.
8. Разработана технологическая схема производства мягкой лекарственной формы ксимедона с наночастицами оксида цинка. Высвобождение ксимедона из комбинированного геля составляло 80%, что на 25% больше, чем в геле в отсутствии наночастиц оксида цинка. Валидация методики оценки высвобождения ксимедона с использованием ячейки Франца показала, что методика удовлетворяет требованиям по показателям линейности, правильности, специфичности, прецизионности.

9. Продемонстрированы антиоксидантные и высокие ранозаживляющие свойства мягкой лекарственной формы ксимедона с наночастицами оксида цинка на модели ожоговой раны на крысах. Уменьшение площади ожога при лечении гелем ZnO нч–Ксим (на 48%) было более значительным, чем при лечении гелем ZnO нч (на 31%) и мазью Метилурацила (на 40%).

Литература

1. Фармацевтическая разработка. Концепция и практические рекомендации. Научно-практическое руководство для фармацевтической области / Под ред. Быковского, С.Н., проф., д.х.н. Василенко И.А., проф., д.фарм. н., Деминой Н.Б., к.фарм.н. Шохина И. Е., к.х.н., Новожилова О.В., Мешковского А.П., Спицкого О.Р. – М. – Изд-во Перо, 2015. – 472 с.: ил.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-4/1-4-1-lekarstvennye-formy/myagkie-lekarstvennye-formy>.(дата обращения:16.01.2025).
3. Srivastava, A. Polymers in Drug Delivery / A. Srivastava T. Yadav, S. Sharma, A. Nayak, A. Kumari, N. Mishra // Journal of Biosciences and Medicines. – 2016. – V.4. – P. 69-84. <http://dx.doi.org/10.4236/jbm.2016.41009>
4. Margaux V., Hydrogels as Drug Delivery Systems: A Review of Current Characterization and Evaluation Techniques / V. Margaux, C. Meinert, D. W. Hutmacher, N. Bock // Pharmaceutics. – 2020. V. 12. - № 1188. – P. 1-45. doi:10.3390/pharmaceutics12121188
5. Thang, N. H. Polymer-Based Hydrogels Applied in Drug Delivery: An Overview / N. H. Thang, T. B. Chien, D. X. Cuong // Gels. – 2023. – V. 9. - № 523. – P. 1-38. <https://doi.org/10.3390/gels9070523>
6. Hajebi, S. Stimulus-responsive polymeric nanogels as smart drug delivery systems / S. Hajebi, N. Rabiee, M. Bagherzadeh, S. Ahmadi, M. Rabiee, H. Roghani-Mamaqani, M. Tahriri, L. Tayebi, M. R. Hamblin //Acta Biomaterialia. – 2019. – V. 92. – P. 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.018>
7. Kim, B. Transdermal delivery systems in cosmetics / H.-E. Cho, S. H. Moon, H.-J. Ahn, S. Bae, H.-D. Cho, S. An // Biomedical Dermatology. – 2020. – V. 4. - №10. – P. 1-12. <https://doi.org/10.1186/s41702-020-0058-7>

8. Yardley, H. J. Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis / H. J. Yardley, R. Summerly // *Pharmacology and therapeutics*. – 1981. - V. 13. - P. 357-383.
9. Karim, N. Human stratum corneum proteomics reveals cross-linking of a broad spectrum of proteins in cornified envelopes / N. Karim, B. S. Phinney, M. Salemi, P.-W. Wu, M. Naeem, R. H. Rice // *Experimental Dermatology*. – 2019. V. 28. – P. 618–622. DOI: 10.1111/exd.13925
10. Schurer, N. Y. The Biochemistry and Function of Stratum Corneum Lipids / N. Y. Schurer, P. M. Elias // *Advances in lipid research*. – 1991. - V. 24. – P. 1-30.
11. Denda, M. Age- and sex-dependent change in stratum corneum sphingolipids / M. Denda, J. Koyama, J. Hori, I. Horii, M. Takahashi, M. Hara, H. Tagami // *Archives of Dermatological Research*. – 1993. - V. 285. - P. 415-417.
12. Ibrahim, A. A. E. Anatomy and Organization of Human Skin / A. A. E. Ibrahim, N. Bagherani, B. Smoller, N. Bagherani, C. Reyes-Barron // *Atlas of Dermatology. Dermatopathology and Venereology*. - 2022. - P. 109-132. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53811-2_3
13. Oliveira, B. E. 5-Fluorouracil, innovative drug delivery systems to enhance bioavailability for topical use / B. E. de Oliveira, O. H. Amorim, L. L. Lima, R. A. Rezende, N. C. Mestnik, E. Bagatin, G. R. Leonardi // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2020. – Vol.61 (102155). – P. 1 – 11 <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102155>.
14. Пантелеев Д. А. Физико-химические и фармакологические свойства ксимедона в новых гидрофильных гелях и мазях: специальность 15.00.02 – “Фармацевтическая химия, фармакогнозия”: диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Пантелеев Дмитрий Александрович. – Казань, 2012. – 125 с.

15. Пат. 2188016, Российская Федерация, А61К 31/513, 31/505, 47/30, 9/70. Клеевая лечебно-профилактическая композиция / Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова Казанского научного центра РАН (RU); заявитель и патентообладатель. С. Г., Измайлов, Г. А., Измайлов, В. С. Резник, В. М. Лазарев, А. А. Бодров, А. Г. Измайлов, М. А. Карпов, В. В. Бесчастнов, И. В. Подушкина, Б. В. Зельдин, М. Ю. Гусев; авторы // № 2001105058/14; заяв. 21.02.2001; опубл. 27.08.2002. – 9 с.: ил.

16. Пат. 2317811, Российская Федерация, А61К 9/06, А61К 31/505, А61Р 17/02. Фармацевтическая композиция для лечения ожогов (варианты) и способ ее получения (варианты) / Раснецов Л. Д.; патентообладатель. Л. Д. Раснецов, Я. Ю. Шварцман, О. К. Яшнова, Н. Б. Мельникова, П. В. Сорокин, О. Е. Зимнякова; авторы // № 2006121794/15; заяв. 19.06.2006; опубл. 27.02.2008. Бюл. №6. – 13 с.: ил.

17. Пат. 2348396, Российская Федерация, А61К 9/06, А61К 31/505, А61Р 17/00. Композиция для лечения гнойных ран / Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Институт Федеральной службы безопасности Российской Федерации (г. Нижний Новгород)” (Институт ФСБ России), Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова Казанского научного центра РАН (ИОФХ им. А. Е. Арбузова Каз НЦ РАН); патентообладатель. С. Г. Измайлов, В. В. Бесчастнов, А. Ю. Жаринов, А. А. Ботяков, М. Г. Рябков, В. С. Резник, А. Г. Измайлов, М. Ю. Аверьянов, Н. В. Казарина; авторы // № 2006144987/15; заяв. 27.06.2008; опубл. 10.03.2009. Бюл. №7. – 6 с.: ил.

18. Пат. 2082402, Российская Федерация, А61К 31/505. Способ стимулирования заживления ран / Измайлов Сергей Геннадьевич; заявитель и патентообладатель. С. Г. Измайлов; автор // № 93028731/14; заяв. 26.05.1993; опубл. 27.06.1997. 4 с.: ил.

19. Пат. 2404745, Российская Федерация, А61К 9/06, А61К 31/513, А61К 31/16, А61К 31/133, А61К 31/245, А61Р 17/02. Гидрофильная фармацевтическая композиция для лечения ожогов (варианты) / Раснецов Лев Давидович; патентообладатель. Н. Б. Мельникова, Л. Д. Раснецов, Я. Ю. Шварцман, О. К. Яшнова, Д. А. Пантелеев; авторы // № 2008146608/15; заяв. 27.11.2008; опубл. 10.06.2010. Бюл. №33. – 12 с.: ил.

20. Пат. 2370265, Российская Федерация, А61К 31/513, А61К 9/06, А61К 47/00, А61Р 17/00, А61Р 17/02, А61Р 17/04, А61Р 31/00, А61Р 11/02, А61Р 27/14. Гель, обладающий противовоспалительным и противоаллергическим действием / Раснецов Лев Давидович; патентообладатель. Л. Д. Раснецов, Я. Ю. Шварцман, О. К. Яшнова, Н. Б. Мельникова, А. А. Волков; авторы // № 2008108006/15; заяв. 04.03.2008; опубл. 20.10.2009. Бюл. № 29. – 15 с.: ил.

21. Micali, G. Topical pharmacotherapy for skin cancer /G. Micali, F. Lacarrubba, M. R. Nasca, S. Ferraro, R. A. Schwartz // Journal American Academy of Dermatology. – 2014. –V. 979. – P. 1-12.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2013.12.037>

22. Chetty, P. Primary Care Review of Actinic Keratosis and Its Therapeutic Options: A Global Perspective / P. Chetty, F. Choi, T. Mitchell // Dermatologic Therapy (Heidelb). – 2015. – P. 1-17. doi:10.1007/s13555-015-0070-9

23. Papanastasopoulos, P. Molecular Basis of 5-Fluorouracil-related Toxicity: Lessons from Clinical Practice / P. Papanastasopoulos, J. Stebbing // Anticancer research. – 2014. – V. 34. – P. 1531-1536. PMID: 24692679

24. Pünnel, L. C. Film-Forming Systems for Dermal Drug Delivery /L. C. Pünnel, D. J. Lunter // Pharmaceutics. – 2021. – V. 13. - № 932. – P. 1-19.
<https://doi.org/10.3390/>

25. Lunter, D. Progress in Topical and Transdermal Drug Delivery Research—Focus on Nanoformulations / D. Lunter, V. Klang, A. Eichner, S. M. Savic, S. Savic, G.

- Lian F. Erdo // Pharmaceutics. – 2024. – V. 16. - № 817. – P. 1-51.
<https://doi.org/10.3390>
26. Sievers, J. / Determination of hydrogel swelling factors by two established and a novel non-contact continuous method / J. Sievers, K. Sperlich, T. Stahnke, C. Kreiner, T. Eickner, H. Martin, R. F. Guthoff, M. Schünemann, S. Bohn, O. Stachs // Journal Applied Polymer Science. – 2020. – V. 50326. – P. 1-9.
<https://doi.org/10.1002/app.50326>
27. Blanco, A. Mathematical Modeling of Hydrogels Swelling Based on the Finite Element Method / A. Blanco, G. González, E. Casanova, M. E. Pirela, A. Briceño // Applied Mathematics. -2013. V. 4. – P. 161-170. doi:10.4236/am.2013.48A022
28. Jozaghkar, M. R. Preparation, Characterization, and swelling study of N,N'-dimethylacrylamide/acrylic acid amphiphilic hydrogels in different conditions / M. R. Jozaghkar, A. S. Azar, F. Ziaee // Polymer Bulletin. – 2022. – V. 79. – P. 5183–5195. <https://doi.org/10.1007/s00289-021-03760-4>
29. Hubbell, J. A. Synthetic biodegradable polymers for tissue engineering and drug delivery / J. A. Hubbell // Biomaterials. – 1998. – V. 3. – P. 246-251.
30. McKinnon, D. D. Design and Characterization of a Synthetically Accessible, Photodegradable Hydrogel for User-Directed Formation of Neural Networks / D. D. McKinnon, T. E. Brown, K. A. Kyburz, E. Kiyotake, K. S. Anseth // Biomacromolecules. – 2014. – P. 1-9. [dx.doi.org/10.1021/bm500731b](https://doi.org/10.1021/bm500731b)
31. Caló, E. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products /E. Calo, V. V. Khutoryanskiy // European Polymer Journal. – 2015. - V. 65. P. 252-267. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024>
32. Nagai, N. An in situ Gelling System Based on Methylcellulose and Tranilast Solid Nanoparticles Enhances Ocular Residence Time and Drug Absorption Into the Cornea and Conjunctiva / N. Nagai, M. Minami, S. Deguchi, H. Otake, H. Sasaki,

- N. Yamamoto // *Frontiers Bioengineering Biotechnology*. - 2020. – V. 8. - № 764. - P. 1-12. doi: 10.3389/fbioe.2020.00764
33. Al-Saidan S.M. Formulation of an HPMC Gel Drug Reservoir System with Ethanol-Water as a Solvent System and Limonene as a Penetration Enhancer for Enhancing in vitro Transdermal Delivery of Nicorandil / S. M. Al-Saidan, Y.S.R. Krishnaiah, D.V. Chandrasekhar, J. K. Lalla, B. Rama, B. Jayaram, P. Bhaskar // *Skin Pharmacology and Physiology*. – 2004. V. 17. – P. 310–320. DOI: 10.1159/000081117
34. Risaliti, L. X. Hydroxyethyl cellulose hydrogel for skin delivery of khellin loaded in ascosomes: Characterization, in vitro/in vivo performance and acute toxicity / L. Risaliti, Yu, G. Vanti, M. C. Bergonzi, M. Wang, A. R. Bilia // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. -V. 179. – P. 217–229. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.206>
35. Bahmani, S. Transdermal drug delivery system of lidocaine hydrochloride based on dissolving gelatin/sodium carboxymethylcellulose microneedles / S. Bahmani, R. Khajavi, M. Ehsani, M. K. Rahimi M. R. Kalae // *American Association of Pharmaceutical Scientists*. – 2023. V. 9. - № 7. P. 1-15. <https://doi.org/10.1186/s41120-023-00074-9>
36. Chena, C. C. Transdermal delivery of selegiline from alginate–Pluronic composite thermogels / C. C. Chena, C.-L. Fang, S. A. Al-Suwayehc, Y.-L. Leud, J.-Y. Fang // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2011. – V. 415. – P. 119-128. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.060
37. Witting, M. Interactions of Hyaluronic Acid with the Skin and Implications for the Dermal Delivery of Biomacromolecules / M. Witting, A. Boreham, R. Brodewolf, K. Vavrova, U. Alexiev, W. Friess, S. Hedtrich // *Molecular Pharmaceutics*. – 2015. – V. 12. – № 5. – P. 1-11. DOI: [10.1021/mp500676e](https://doi.org/10.1021/mp500676e)
38. Mavondo, G. A. A. Asiatic acid-pectin hydrogel matrix patch transdermal delivery system influences parasitaemia suppression and inflammation reduction in P. berghei murine malaria infected Sprague–Dawley rats / G. A. A. Mavondo, M. C.

Tagumirwa // Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. – 2016. – V. 9. - № 12. – P. 1172-1180. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.10.008>

39. Xu, Q. Fabrication of Cellulose Nanocrystal/Chitosan Hydrogel for Controlled Drug Release / Q. Xu, Y. Ji, Q. Sun, Y. Fu, Y. Xu, L. Jin // Nanomaterials. – 2019. – V. 9. – № 253. – P. 1-13. doi:10.3390/nano9020253

40. Luo, Z. Biodegradable Gelatin Methacryloyl Microneedles for Transdermal Drug Delivery / Z. Luo, W. Sun, J. Fang, K. Lee, S. Li, Z. Gu, M. R. Dokmeci, A. Khademhosseini // Advanced Healthcare Materials. – 2019. – V. 8. - № 3. – P. 1-17. doi:10.1002/adhm.201801054.

41. Garg, A. In-vitro and in-vivo assessment of dextran appended cellulose acetate phthalate nanoparticles for transdermal delivery of 5- fluorouracil /A. Garg, G. Rai, S. Lodhi, A. P. Jain, A. K. Yadav // Drug Delivery. – 2016. – V. 23. - № 5. – P. 1525-1535. DOI: 10.3109/10717544.2014.978512

42. Nair, A. B. Gellan Gum-Based Hydrogel for the Transdermal Delivery of Nebivolol: Optimization and Evaluation / A. Nair, J. Shah, B. M. Aljaeid, B. E. Al-Dhubiab, S. Jacob // Polymers. – 2019. – V. 11. – №1699. – P. 1-17. doi:10.3390/polym11101699

43. Karakoti, A. S. Direct Synthesis of Nanoceria in Aqueous Polyhydroxyl Solutions / A. S. Karakoti, S. V. N. T. Kuchibhatla, K. S. Babu, S. Seal // Journal of Physical Chemistry. – 2007. – V. 111. - № 46. – P. 17232-17240.DOI: 10.1021/jp076164k

44. Shcherbakov, A. B. Synthesis and Antioxidant Activity of Biocompatible Maltodextrin Stabilized Aqueous Sols of Nanocrystalline Ceria / A. B. Shcherbakov, N. M. Zholobak, V. K. Ivanov, O. S. Ivanov, A. V. Marchevsky, A. E. Baranchikov, N. Y. Spivak, Y. D. Tretyakov // Russian Journal of Inorganic Chemistry. – 2012. – V. 57. - № 11. – P. 1411-1418. DOI: 10.1134/S0036023612110137

45. Li, Y. Poly(acrylic acid)/Poly(vinyl alcohol) Microarray Patches for Continuous Transdermal Delivery of Levodopa and Carbidopa: In Vitro and In Vivo Studies / Y. Li, L. K. Vora, J. Wang, A. H. B. Sabri, A. Graham, H. O. McCarthy, R. F. Donnelly

- // Pharmaceutics. – 2024. - V. 16. - №. 676. – P. 1-15.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16050676>
46. Arunprasert, K. Nanostructured lipid carrier-embedded polyacrylic acid transdermal patches for improved transdermal delivery of capsaicin / K. Arunprasert, C. Pornpitchanarong, C. Piemvuthi, S. Siraprapapornsakul, S. Sripeangchan, O. Lertsrimongkol, P. Opanasopit, P. Patrojanasophon // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2022. – V. 173 (106169). – P. 1-11.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106169>
47. Zhang, K. Poly(Acrylic Acid)-Modified MoS₂ Nanoparticle-Based Transdermal Delivery of Atenolol / K. Zhang, Y. Zhuang, J. Li, X. Liu, S. He // International Journal of Nanomedicine. – 2020. – V. 15. – P. 5517–5526.
<http://doi.org/10.2147/IJN.S257906>.
48. Wang, W. Dual-functional transdermal drug delivery system with controllable drug loading based on thermosensitive poloxamer hydrogel for atopic dermatitis treatment / W. Wang, E. Wat, P. C. L. Hui, B. Chan, F. S. F. Ng, C.-W. Kan, X. Wang, H. Hu, E. C. W. Wong, C. B. S. Lau, P.-C. Leung // Scientific Reports. – 2015. – V. 6. – P. 1-10. DOI: 10.1038/srep24112.
49. Nguyena, H. X. Poly (vinyl alcohol) microneedles: Fabrication, characterization, and application for transdermal drug delivery of doxorubicin / H. X. Nguyena, B. D. Bozorga, Y. Kima, A. Wieberb, G. Birkb, D. Lubdab, A. K. Banga // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2018. – V. 129 (88-103). – P. 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.05.017>
50. Hajra, K. Recent Advancements of Metal Oxide Nanoparticles and their Potential Applications: A Review / K. Hajra, D. Maity, S. Saha // Advanced Material Letters. – 2024. – P. 1-19. DOI: 10.5185/amlett.2024.011740.
51. Negrescu, A. M. Metal Oxide Nanoparticles: Review of Synthesis, Characterization and Biological Effects / A. M. Negrescu, M. S. Killian, S. N. V. Raghu, P. Schmuki, A. Mazare, A. Cimpean // Journal of Functional Biomaterials. – 2022. – V. 13. - № 274. – P. 1-47. <https://doi.org/10.3390/jfb13040274>

52. Hsu, C. Y. An overview of nanoparticles in drug delivery: Properties and applications / C. Y. Hsu, A. M. Rheima, M. M. Kadhim, N. N. Ahmed, S. H. Mohammed, F. H. Abbas, Z. T. Abed, Z. M. Mahdi, Z. S. Abbas, S. K. Hachim, F. K. Ali, Z. H. Mahmoud, E. Kianfar // South African Journal of Chemical Engineering. – 2023. – V. 46. – P. 1-38. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2023.08.009>.
53. Kotrange, H. Metal and Metal Oxide Nanoparticle as a Novel Antibiotic Carrier for the Direct Delivery of Antibiotics / H. Kotrange, A. Najda, A. Bains, R. Gruszecki, P. Chawla, M. M. Tosif // International Journal of Molecules Science. – 2021. – V. 22. - № 9596. – P. 1-16. <https://doi.org/10.3390/ijms22179596>.
54. Jafari, S. M. TiO₂ Nanoparticles as a Common Component of Sunscreens: An Experimental Study of Dermal/Ocular Safety Assessment / S. M. Jafari, G. Sadeghi-Hashgjin, M. K. Koohi, A. Rassouli, E. Shahroozian // Iranian Journal of Veterinary Medicine. – 2019. – V. 13. - № 1. – P. 79-86. DOI: 10.22059/ijvm.2018.257860.1004898
55. Pusta, A. Recent Advances in the Development of Drug Delivery Applications of Magnetic Nanomaterials / A. Pusta, M. Tertis, I. Crăciunescu, R. Turcu 3, S. Mirel, C. Cristea // Pharmaceutics. – 2023. – V. 15. - № 1082. – P. 1-37. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071872>.
56. Jiang, J. The Advancing of Zinc Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications / J. Jiang, J. Pi, J. Cai // Bioinorganic Chemistry and Applications. – 2018. – P. 1-18. <https://doi.org/10.1155/2018/1062562>.
57. Lansdown, A. B. G. Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects / A. B. G. Lansdown, U. Mirastschijski, N. Stubbs, E. Scanlon, M. S. Agren // Wound Repair and Regeneration. – 2006. – V. 15. – P. 2-16. DOI:10.1111/j.1524-475X.2006.00179.x.
58. Yin, X. Zinc oxide nanoparticles ameliorate collagen lattice contraction in human tenon fibroblasts / X. Yin, Q. L. H. Wei, N. Chen, S. Wu, Y. Yuan, B. Liu, C. Chen, H. Bi, D. Guo // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2019. – V. 669. – P. 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.05.016>.

59. Ghasemi, F. Antimicrobial action of zinc oxide nanoparticles in combination with ciprofloxacin and ceftazidime against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* / F. Ghasemi, R. Jalal // *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. – 2016. - V. 6. – P. 118-122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2016.04.007>.
60. Wessels, I. Zinc as a Gatekeeper of Immune Function / I. Wessels, M. Maywald, L. Rink // *Nutrients*. – 2017. – V. 9. - № 1286. – P. 1-44. doi:10.3390/nu9121286.
61. Ahmed, B. Bacterial toxicity of biomimetic green zinc oxide nanoantibiotic: insights into ZnONP uptake and nanocolloid–bacteria interface / B. Ahmed, B. Solanki, A. Zaidi, M. S. Khan, J. Musarrat // *Toxicology Research*. – 2019. – V. 8. – P. 246-261. DOI: 10.1039/c8tx00267c.
62. Amiri, E. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles with bioactive compounds of *Actinomyces*, *Amyculatopsis roodepoortensis* strain EA7 and its effect on cell line HT-29 / E. Amiri, M. Mirpour, K. Issazadeh, B. Rasti // *Research Square*. – 2024. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4545269/v1>.
63. Lin, P. H. Zinc in Wound Healing Modulation / P. H. Lin, M. Sermersheim, H. Li, P. H. U. Lee, S. M. Steinberg, J. Ma // *Nutrients*. – 2018. – V. 10. - № 16. – P. 1-20. doi:10.3390/nu10010016.
64. Ramenzoni, L. L. Cerium Chloride Application Promotes Wound Healing and Cell Proliferation in Human Foreskin Fibroblasts / L. L. Ramenzoni, F. E. Weber, T. Attin, P. R. Schmidlin // *Materials*. – 2017. – V. 10. - № 573. – P. 1-9. doi:10.3390/ma10060573.
65. Magnano, G. C. Transdermal permeation of inorganic cerium salts in intact human skin / G. C. Magnano, G. Marussi, F. L. Filon, M. Crosera, M. Bovenzi, G. Adami // *Toxicology in Vitro*. – 2022. – V. 82. – P. 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105381>.
66. Fricker, S. P. The therapeutic application of lanthanides / S. P. Fricker // *Chemical Society Reviews*. – 2006. – V. 35. – P. 524-533. DOI: 10.1039/b509608c
67. Qian, L. W. Cerium Nitrate Treatment Provides Eschar Stabilization through Reduction in Bioburden, DAMPs, and Inflammatory Cytokines in a Rat Scald

- Burn Model / L. W. Qian, S. J. Evani, P. Chen, K. S. Brandenburg, A. J. Weaver, A. B. Fourcaudot, J. J. Abercrombie, E. A. Sebastian, K. P. Leung // *Journal of Burn Care and Research*. – 2020. – V. 41. - № 3. – P. 576-584. DOI:10.1093/jbcr/irz199
68. Barker, E. The Use of Cerium Compounds as Antimicrobials for Biomedical Applications / E. Barker, J. Shepherd, I. O. Asencio // *Molecules*. – 2022. – V. 27. - № 2678. – P. 1-23. <https://doi.org/10.3390/molecules27092678>.
69. Chen, S. Cerium oxide nanoparticles in wound care: a review of mechanisms and therapeutic applications / S. Chen, Y. Wang, S. Bao, L. Yao, X. Fu, Y. Yu, H. Lyu, H. Pang, S. Guo, H. Zhang, P. Zhou, Y. Zhou // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2024. – V. 12. – P. 1-19. doi: 10.3389/fbioe.2024.1404651.
70. Jairam, L. S. A review on biomedical and dental applications of cerium oxide nanoparticles d Unearthing the potential of this rare earth metal / L. S. Jairam, A. Chandrashekar, T. N. Prabhu, S. B. Kotha, M.S. Girish, I. M. Devraj, M. D. Shri, K. Prashantha // *Journal of Rare Earths*. – 2023. – V. 41. – P. 1645-1661. <https://doi.org/10.1016/j.jre.2023.04.009>.
71. Yi, L. The regulatory mechanisms of cerium oxide nanoparticles in oxidative stress and emerging applications in refractory wound care / L. Yi, L. Yu, S. Chen, D. Huang, C. Yang, H. Deng, Y. Hu, H. Wang, Z. Wen, Y. Wang, Y. Tu // *Frontiers in Pharmacology*. – 2024. – P. 1-12. doi: 10.3389/fphar.2024.1439960.
72. Shcherbakov, A. B. Biological, biomedical and pharmaceutical applications of cerium oxide / A. B. Shcherbakov, N. M. Zholobak, V. K. Ivanov // *The book - Cerium Oxide (CeO₂): Synthesis, Properties and Applications*. – 2020. – P. 279-358. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815661-2.00008-6>.
73. Garner, J.P. The use of Flammacerium in British Burns Units / J.P. Garner, P.S.J. Heppell // *Burns*. – 2005. – V. 31. – P. 379-382. doi:10.1016/j.burns.2004.12.001.
74. Scholten-Jaegers, S. M. H. J. Epidemiology and Outcome of Patients With Burns Treated With Cerium Nitrate Silversulfadiazine / S. M. H. J. Scholten-Jaegers, M. K. Nieuwenhuis, M. E. van Baar, A. S. Niemeijer, J. Hiddingh, G. I. J. M. Beerthuizen, Dutch Burn Repository group, Martini Hospital // *Journal of Burn Care*

- and Research. - 2017. - V. 38. - №1. - P. 432-442. DOI: 10.1097/BCR.0000000000000448.
75. Petkov, N. Novel Cerium(IV) Coordination Compounds of Monensin and Salinomycin / N. Petkov, I. Pantcheva, A. Ivanova, R. Stoyanova, R. Kukeva, R. Alexandrova, A. Abudalleh, P. Dorkov // *Molecules*. – 2023. – V. 28. – №4676. – P. 1-22. <https://doi.org/10.3390/molecules28124676>.
76. Da Silva Assis, M. B. Cerium oxide nanoparticles: Chemical properties, biological effects and potential therapeutic opportunities (Review) / M. B. Da Silva Assis, G. N. De Moraes, K. R. De Souza // *Biomedical Reports*. – 2024. – V. 20. - № 48. – P. 1-9. DOI: 10.3892/br.2024.1736.
77. Tang, J. L.Y. Nanoceria: an innovative strategy for cancer treatment / J. L.Y. Tang, S. S. Moonshi, H. T. Ta // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2023. – V. 80. - № 46. – P. 1-34. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04694-y>.
78. Filippi, A. Antioxidant activity of cerium dioxide nanoparticles and nanorods in scavenging hydroxyl radicals / A. Filippi, F. Liu, J. Wilson, S. Lelievre, K. Korschelt, T. Wang, Y. Wang, T. Reich, U. Poschl, W. Tremel, Haijie Tong // *The Royal Society of Chemistry*. – 2019. – V. 9. – P. 11077-11081. DOI: 10.1039/c9ra00642g.
79. Datta, A. Pro-Oxidant Therapeutic Activities of Cerium Oxide Nanoparticles in Colorectal Carcinoma Cells / A. Datta, S. Mishra, K. Manna, K. D. Saha, S. Mukherjee, S. Roy // *American Chemical Society Omega*. – 2020. – V. 5. – P. 9714-9723. <https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.9b04006>.
80. Nelson, B. C. Antioxidant Cerium Oxide Nanoparticles in Biology and Medicine / B. C. Nelson, M. E. Johnson, M. L. Walker, K. R. Riley, C. M. Sims // *Antioxidants*. – 2016. – V. 5. - № 15. – P. 1-21. doi:10.3390/antiox5020015.
81. Nosrati, H. Cerium oxide nanoparticles: Synthesis methods and applications in wound healing / H. Nosrati, M. Heydari, M. Khodaei // *Materials Today Bio*. – 2023. – V. 23. – P. 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100823>.

82. Khalid, A. Bacterial cellulose-zinc oxide nanocomposites as a novel dressing system for burn wounds / A. Khalid, R. Khan, M. Ul-Islam, T. Khan, F. Wahid // Carbohydrate Polymers. – 2017. – V. 164. – P. 214-221. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.061>.
83. Petrova, V. A. Bacterial Cellulose Composites with Polysaccharides Filled with Nanosized Cerium Oxide: Characterization and Cytocompatibility Assessment / V. A. Petrova, I. V. Gofman, A. S. Golovkin, A. I. Mishanin, N. V. Dubashynskaya, A. K. Khripunov, E. M. Ivankova, E. N. Vlasova, A. L. Nikolaeva, A. E. Baranchikov, Y. A. Skorik, A. V. Yakimansky, V. K. Ivanov // Polymers. – 2022. – V. 14. - № 5001. – P. 1-18. doi.org/10.3390/polym14225001.
84. Ul-Islam, M. Synthesis of regenerated bacterial cellulose-zinc oxide nanocomposite films for biomedical applications / M. Ul-Islam, W. A. Khattak, M. W. Ullah, S. Khan, J. K. Park // Cellulose. – 2014. – V. 21. – P. 433-447. DOI 10.1007/s10570-013-0109-y.
85. Blinov, A. V. Synthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles Stabilized with Biopolymers for Application in Wound-Healing Mixed Gels / A. V. Blinov, M. D. Kachanov, A. A. Gvozdenko, A. A. Nagdalian, A. A. Blinova, Z. A. Rekhman, A. B. Golik, D. S. Vakalov, D. G. Maglakelidze, A. G. Nagapetova, A. D. Pokhilko, I. V. Burkina // Gels. – 2023. – V. 9. - № 57. – P. 1-23. <https://doi.org/10.3390/gels9010057>.
86. Rather, H. A. Antioxidative study of Cerium Oxide nanoparticle functionalised PCL-Gelatin electrospun fibers for wound healing application / H. A. Rather, R. Thakore, R. Singh, D. Jhala, S. Singh, R. Vasita // Bioactive Materials. – 2017. – P. 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.09.006>.
87. Huang, X. Chitosan-coated cerium oxide nanocubes accelerate cutaneous wound healing by curtailing persistent inflammation / X. Huang, L. D. Li, G. M. Lyu, B. Y. Shen, Y. F. Han, J. L. Shi, J. L. Teng, L. Feng, S. Y. Si, J. H. Wu, Y. J. Liu, L.D. Sun, C. H. Yan // Inorganic Chemistry Frontiers. – 2018. – V. 5. – P. 386-393. DOI: 10.1039/c7qi00707h.

88. Cao, L. Cerium oxide nanoparticle-loaded polyvinyl alcohol nanogels delivery for wound healing care systems on surgery / L. Cao, G. Shao, F. Ren, M. Yang, Y. Nie, Q. Peng, P. Zhang // Drug Delivery. – 2021. – V. 28. - № 1. – P. 390-399. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1858998>.
89. Xu, C. Nanoceria-Triggered Synergetic Drug Release Based on CeO₂ -Capped Mesoporous Silica Host–Guest Interactions and Switchable Enzymatic Activity and Cellular Effects of CeO₂ / C. Xu, Y. Lin, J. Wang, L. Wu, W. Wei, J. Ren, X. Qu // Advanced Healthcare Materials. – 2013. – P. 1-9. DOI: 10.1002/adhm.201200464.
90. Yang, Z. Y. Alendronate as a robust anchor for ceria nanoparticle surface coating: facile binding and improved biological properties / Z. Y. Yang, S. L. Luo, H. Li, S. W. Dong, J. He, H. Jiang, R. Li, X. C. Yang // The Royal Society of Chemistry. 2014. – V. 4 – P. 59965–59969. DOI: 10.1039/c4ra12007h.
91. Yusefi, M. 5-Fluorouracil loaded magnetic cellulose bionanocomposites for potential colorectal cancer treatment / M. Yusefi, M. S. Lee-Kiun, K. Shameli, S. Y. Teow, R. R. Ali, K. K. Siew, H. Y. Chan, M. M. T. Wong, W. L. Lim, K. Kuca // Carbohydrate Polymers. – 2021. V. 273. – P. 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118523>.
92. Dabaghi, M. Iron Oxide Nanoparticles Carrying 5-Fluorouracil in Combination with Magnetic Hyperthermia Induce Thrombogenic Collagen Fibers, Cellular Stress, and Immune Responses in Heterotopic Human Colon Cancer in Mice / M. Dabaghi, S. M. M. Rasa, E. Cirri, A. Ori, F. Neri, R. Quaas, I. Hilger // Pharmaceutics. – 2021. V. 13. - № 1625. – P. 1-19. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101625>.
93. Sathiyaseelan, A. Cerium oxide decorated 5-fluorouracil loaded chitosan nanoparticles for treatment of hepatocellular carcinoma / A. Sathiyaseelan, K. Saravanakumar, M. H. Wang // International Journal of Biological Macromolecules. – 2022. – V. 216. – P. 52-64. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.112>.
94. Satpathy, S. S. Combinational delivery of berbamine and 5-fluorouracil in cerium oxide nanoparticles for colon cancer therapy: Insights from in vitro and in

silico studies / S. S. Satpathy, S. Mishra, S. Pattnaik, C. Mohanty // European Journal of Medicinal Chemistry Reports. – 2024. – V. 12. – P. 1-13.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2024.100224>.

95. Пат. 2743342. А61К 31/505, А61Р 35/00, А61К 47/10, Российская Федерация. Мягкая лекарственная форма для лечения онкологических заболеваний. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Уральский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России); патентообладатель. О. А. Мельникова, М. Ю. Мельников, А. С. Минин, А. Е. Ермаков, А. М. Мельников; авторы. № 2020122113; заяв. 29.06.2020; опубл. 17.02.2021. Бюл. № 5. – 13 с.: ил.

96. Измайлов С.Г., Измайлов Г.А., Аверьянов М.Ю., Резник В.С. Ксимедон в клинической практике. Н.Новгород: Изд-во НГМА, 2001.;

97. Измайлов Г.А., Шафиков И.З., Эвранова Г.Б. и др. Результаты клинических испытаний у взрослых в качестве противоожогового средства препарата ксимедон в лекарственной форме — таблетки по 0,25 г в сравнении с метилурацилом. В кн.: Ксимедон. Казань: Изд-во ИОФХ им. А.Е.Арбузова КФАН СССР; 1986; с. 78—105.

98. Измайлов Г.А., Резник В.С., Измайлов С.Г. и др. Опыт применения отечественного препарата ксимедон в хирургии // Актуальные вопросы диагностики и лечения. - Казань: 1998.

99. Клиническое применение препарата ксимедон в лечении ожоговой болезни / Вихреев В.С., Матвиенко А.В. // Ксимедон. Казань: изд-во ИОФХ им. А.Е.Арбузова КФАН СССР, 1986. С. 41—46.

100. Измайлов С.Г. Профилактика гнойно-воспалительных осложнений послеоперационных ран в неотложной абдоминальной хирургии. Автореф.дис. ... докт. мед. наук: М; 1994.

101. Измайлов Г.А., Горбунов С.М., Измайлов С.Г. и др. Использование ксимедона для лечения термической травмы В кн.: Актуальные вопросы диагностики и лечения. Казань; 1998.
102. Gupta, R. R. AOT water-in-oil microemulsions as a penetration enhancer in transdermal drug delivery of 5-fluorouracil / R. R. Gupta, S. K. Jain, M. Varshney // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2005. – V. 41. – P. 25-32. doi:10.1016/j.colsurfb.2004.09.008.
103. Werschler, W. P. Considerations for use of Fluorouracil cream 0.5% for the treatment of actinic keratosis in elderly patients / W. P. Werschler // *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. – 2008. – V. 1. - № 2. – P. 1-7. PMC2989823.
104. Calienni, M. N. Nano-formulation for topical treatment of precancerous lesions: skin penetration, in vitro, and in vivo toxicological evaluation / M. N. Calienni, C. F. Temprana, M. J. Prieto, D. Paolino, M. Fresta, A. B. Tekinay, S. V. Alonso, J. Montanari // *Drug Delivery and Translational Research*. – 2017. – P. 1-19. <https://doi.org/10.1007/s13346-017-0469-1>.
105. Alvi, I. A. Comparative study of transfersomes, liposomes, and niosomes for topical delivery of 5-fluorouracil to skin cancer cells: preparation, characterization, in-vitro release, and cytotoxicity analysis / I. A. Alvi, J. Madan, D. Kaushik, S. Sardana, R. Shankar, P. and A. Ali // *Anti-Cancer Drugs*. – 2011. – V. 22. – P. 774–782. DOI: 10.1097/CAD.0b013e328346c7d6.
106. Paolino, D. Innovative bola-surfactant niosomes as topical delivery systems of 5-fluorouracil for the treatment of skin cancer / D. Paolino, D. Cosco, R. Muzzalupo, E. Trapasso, N/ Picci, M. Fresta // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2008. – V. 353. – P. 233–242. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.11.037.
107. Hao, Y. Nearinfrared responsive 5-fluorouracil and indocyanine green loaded MPEG-PCL nanoparticle integrated with dissolvable microneedle for skin cancer therapy / Y. Hao, Y. W. Chen, X. L. He, F. Yang, R. X. Han, C. L. Yang, W. Li, Z. Y. Qian // *Bioactive Materials*. – 2020. - V. 5. - №3. - P. 542–552. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.04.002>.

108. De, A. Formulation & optimization of the transdermal film of 5-FU with in-vitro and ex-vivo study using ethyl cellulose and two grades of hydroxy propyl methyl cellulose / A. De, S. Chakraborty, A. Mukherjee, J. Chattopadhyay, S. Ghatak // *Der Pharmacia Sinica*. – 2013. – V. 4. - №4. – P. 103-111. ISSN: 0976-8688.
109. Chandrashekar, N. S. Clinical Evaluation of 5-Fluorouracil from Transdermal Patches on EAC and DLA Cell-induced Tumors in Mice / N. S. Chandrashekar, V. V. Prasanth // *Asian Pacific Journal Cancer Prevention*. – 2008. – V. 9. – P. 437-440.
110. Регистр лекарственных средств [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.rlsnet.ru/drugs/ksimedon-5338>. (дата обращения: 16.01.2025).
111. Пат. 2400250. А61К 47/36, А61К 47/38, А61К 9/70, А61L 15/28, А61L 15/44, Российская Федерация. Способ получения лечебной композиции для нанесения ее на текстильный материал. Общество с ограниченной ответственностью “НПО Текстильпрогресс ИА” (ООО “НПО Текстильпрогресс ИА), Общество с ограниченной ответственностью “Колетекс” (ООО “Колетекс”); патентообладатели. Н. Д. Олтаржевская, Л. Б. Савилова, М. А. Коровина, Г. Е. Кричевский; авторы. № 2009100947/15; заяв. 14.01.2009; опубл. 27.09.2010. Бюл. № 27. – 6 с.: ил.
112. Олтаржевская, Н. Д. Лечебные текстильные и гидрогелевые материалы для направленной доставки лекарств в онкологической практике / Н. Д. Олтаржевская, М. А. Коровина // *Российский химический журнал*. – 2011. – Т. 55. - № 3. – С. 97-106. УДК 616-006+616-08.
113. Procaccio, L. The role of nanoliposomal irinotecan plus fluorouracil/ leucovorin in the continuum of care of patients with metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma / L. Procaccio, V. Merz, M. Fasano, V. Vaccaro, E. Giommoni, A. Pretta, S. Novent, M. A. Satolli, G. Giordano, C. Zichi, C. Pinto, C. Zecchetto, G. Barsotti, F. De Vita, M. Milella, L. Antonuzzo, M. Scartozzi, A. Zaniboni, R. Spadi, S. Casalino, F. Bergamo, C. De Toni, D. Melisi, S. Lonardi // *Cancer Medicine*. - 2023. V. 12. – P. 14337–14345. DOI: 10.1002/cam4.6111.

114. US Food and Drug Administration [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/appletter/2022/020985Orig1s0191tr.pdf. (дата обращения: 10.01. 2025).
115. Goindi, S. Development of Novel Ionic Liquid-Based Microemulsion Formulation for Dermal Delivery of 5-Fluorouracil / S. Goindi, P. Arora, N. Kumar, A. Puri // *Pharmaceutical Science Technology*. - 2014. - V. 15. - № 4. – P. 810-821. DOI: 10.1208/s12249-014-0103-1.
116. Sack, M. Combination of conventional chemotherapeutics with redox-active cerium oxide nanoparticles – a novel aspect in cancer therapy / M. Sack, L. Alili, E. Karaman, S. Das, A. Gupta, S. Seal, P. Brenneisen // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2014. – P. 1-34. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0950.
117. Williams, A. C. Transdermal and Topical Drug Delivery. From Theory to Clinical Practice / A. C. Williams // *Pharmacy Education*. – 2004. - V. 4(1). – P. 49–50. ISBN: 0 85369 489 3.
118. Karkia, S. Thin films as an emerging platform for drug delivery / S. Karkia, H. Kima, S.-J. Na, D. Shina, K. Joa, J. Lee // *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2016. - P. 1-51. <http://dx.doi.org/doi: 10.1016/j.ajps.2016.05.004>.
119. Villarreal-Gómez, L. J. Polymeric advanced delivery systems for antineoplastic drugs: doxorubicin and 5-fluorouracil / L. J. Villarreal-Gómez, A. Serrano-Medina, E. J. Torres-Martínez, G. L. Perez-González, J. M. Cornejo-Bravo // *e-Polymers*. – 2018. – P. 1-135 <https://doi.org/10.1515/epoly-2017-0202> .
120. Salamanca, C. H. Franz Diffusion Cell Approach for Pre-Formulation Characterisation of Ketoprofen Semi-Solid Dosage Forms / C. H. Salamanca, A. Barrera-Ocampo, J. C. Lasso, N. Camacho, C. J. Yarce // *Pharmaceutics*. – 2018. V. 10. - № 148. – P. 1-10. doi:10.3390/pharmaceutics10030148
121. Fasiolaa, L. T. M. D. Manniello, S. Banellaa, L. Napolia, F. Bortolottia, E. Quartab, P. Colombo, E. Balafase, N. Kostomitsopoulou, D. M. Rekkas, G. Valsamif, P. Papakyriakopoulou, G. Colomboa, P. Russo // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2021.

122. Franz, T. J. Percutaneous absorption. on the relevance of in vitro data / T. J. Franz // The journal of investigative dermatology. – 1975. – V. 64. – P. 190-195.
123. Altun, E. Kinetic Release Studies of Antibiotic Patches for Local Transdermal Delivery / E. Altun, E. Yuca, N. Ekren, D. M. Kalaskar, D. Fikai, G. Dolete, A. Fikai, O. Gunduz // Pharmaceutics. 2021. V. 13. - № 613. – P. 1-18. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050613>.
124. Adepu, S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions / S. Adepu, S. Ramakrishna // Molecules. – 2021. – V. 26, - № 5905. – P. 1-45. <https://doi.org/10.3390/molecules26195905>.
125. Trucillo, P. Drug Carriers: A Review on the Most Used Mathematical Models for Drug Release / P. Trucillo // Processes. – 2022. – V. 10. - № 1094. – P. 1-24. <https://doi.org/10.3390/pr10061094>.
126. Watkinson, A. C. Basic mathematical principles in skin permeation / A. C. Watkinson, K. R. Brain // Journal of Toxicology. 2002. – V. 21 - № 4. – P. 371-402. DOI: 10.1081/CUS-120016396.
127. Smith, K.L. Penetrant characteristics influencing skin absorption. Methods for skin absorption / K. L. Smith, B.W. Kemppainen, W.G. Reifenrath // – Boca Raton, CRC Press. - 1990. – P. 232. <https://doi.org/10.1201/9781003574248>.
128. Lane, M. E. In vitro permeation testing for the evaluation of drug delivery to the skin / M. Lane // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2024. – V. 201. - P. 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2024.106873>.
129. Dash, S. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems P. N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury // Acta Poloniae Pharmaceutica and Drug Research. – 2010. -V. 67 - №. 3. – P. 217-223. ISSN 0001-6837.
130. Bhasarkar, J. Kinetic investigation of a controlled drug delivery system based on alginate scaffold with embedded voids / J. Bhasarkar, D. Bal // Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials. – 2019. – P. 1-8. <https://doi.org/10.1177/2280800018817>.

131. Paarakh, M. P. Release kinetics – concepts and applications / M. P. Paarakh, P. A. Jose, C. M. Setty, G.V. P. Christoper // International Journal of Pharmacy Research and Technology. – 2018. – V. 8. P. 12-20.
132. Higuchi, T. Theoretical Analysis of Rate of Release of Solid Drugs Dispersed in Solid Matrices / T. Higuchi // Mechanism of Sustained-Action Medication. – 1963. V. 52. - №12. – P. 1145-1149.
133. Nazir, S. Nanocomposite hydrogels for melanoma skin cancer care and treatment: In-vitro drug delivery, drug release kinetics and anti-cancer activities / S. Nazir, M. U. A. Khan, W. S. Al-Arjan, S. I. A. Razak, A. Javed, M. R. A. Kadir // Arabian Journal of Chemistry. – 2021. – V. 14. – P. 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103120>.
134. Khamizov, R. K. A Pseudo-Second Order Kinetic Equation for Sorption Processes / R. K. Khamizov // Russian Journal of Physical Chemistry A. – 2020. - V. 94. - №. 1. - P. 171–176. DOI: 10.1134/S0036024420010148.
135. Plazinski, W. Modeling of sorption kinetics: the pseudo-second order equation and the sorbate intraparticle diffusivity / W. Plazinski, J. Dziuba, W. Rudzinski // Adsorption. – 2013. -V. 19. – P.1055–1064. DOI 10.1007/s10450-013-9529-0.
136. Ruiz, E. A. C. Experimental and mathematical approaches for drug delivery for the treatment of wet age-related macular degeneration / E. A. C. Ruiz, K. E. Swindle-Reilly, A. N. F. Versypt // Journal of Controlled Release. – 2023. – V. 363. – P. 464-483. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.09.021>.
137. Шохин, И. Е. Современные подходы к валидации методик испытания “Растворение” / И. Е. Шохин, Г. В. Раменская, К. С. Давыдова // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45. - № 3. – С. 41-44.
138. Corti, G. Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption I. Assessment of artificial membrane composition / G. Corti, F. Maestrelli, M. Cirri, S. Furlanetto, P. Mura // European journal of pharmaceutical sciences. – 2006. – V. 27. – P. 346–353. doi:10.1016/j.ejps.2005.11.004.

139. **Sheferov, I.** The Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Properties and Burn Wound Healing Activity of Thixotropic Xymedone Gels / I. Sheferov, A. Balakireva, D. Panteleev, I. Spitskaya, S. Orekhov, O. Kazantsev, A. Solovyeva, D. Novopol'tsev, N. Melnikova // *Scientia Pharmaceutica*. – 2022. – Vol. 90, № 61. – P. 1-17. <https://doi.org/10.3390/scipharm90040061> (Q2)
140. Melnikova, N. Design and Study of Nanoceria Modified by 5-Fluorouracil for Gel and Polymer Dermal Film Preparation / N. Melnikova, **I. Sheferov**, D. Panteleev, A. Emasheva, I. Druzhkova, N. Ignatova, T. Mishchenko, M. Vedunova // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 16, № 8. – P. 1-20. <https://doi.org/10.3390/ph16081082> (Q1)
141. Мельникова, Н. Б. Оценка высвобождения лекарственных веществ из мягких лекарственных форм и прогнозирование проницаемости через кожный барьер (обзор) / Н. Б. Мельникова, **И. А. Шеферов**, А. А. Емашева, А. А. Шеферова, Д. А. Пантелеев, А. И. Сливкин // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2024. – Т. 13, № 3. – С. 52-65. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1793>
142. **Sheferov, I.** Study of xymedone release from hydrogels with zinc oxide nanoparticles / I. Sheferov, A. Emasheva, A. Sheferova, D. Panteleev, A. Mitin, V. Kuzmichev, N. Melnikova // *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. – 2024. – Vol. 14, № 8. P. 43-48. <http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v14i8.6728>
143. Шеферова, А. А. Исследование способности наночастиц оксида церия к окислению и адсорбции органических красителей / А. А. Шеферова, В. Ж. Корокин, Хайдер Аль-Аззави, **И. А. Шеферов**, Е. А. Захарычев, И. В. Спицкая, Н. Б. Мельникова, А. И. Сливкин // *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. – 2025. – № 1. – С. 45-57.
144. **Шеферов И. А.** Синтез и свойства наночастиц оксида цинка с иммобилизованным оксопиримидином – ксимедоном / И. А. Шеферов, А. А. Балакирева // *Сборник тезисов XXV Всероссийской конференции молодых*

учёных-химиков (с международным участием), 19-21 апреля, 2022. - Нижний Новгород: Изд-во ННГУ им. Н. И. Лобачевского, 2022. С. 37

145. Космачева К. Д. Физико–химические свойства наночастиц оксида церия с привитыми якорными группами для доставки лекарственных веществ / К. Д. Космачева, **И. А. Шеферов** // Сборник тезисов XXV Всероссийской конференции молодых учёных-химиков (с международным участием), 19-21 апреля, 2022. - Нижний Новгород: Изд-во ННГУ им. Н. И. Лобачевского, 2022. С. 88

146. Сулейманова А. Р. Возможности применения наночастиц оксида церия в медицине / А. Р. Сулейманова, Н. И. Игнатова, **И. А. Шеферов**, Н. Б. Мельникова, И. Н. Дружкова //Сборник тезисов 76-й Всероссийской школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», 11–14 апреля 2023. – Нижний Новгород: Изд-во ННГУ им. Н. И. Лобачевского, 2023. С. 300

147. **Шеферов И. А.** Влияние нанокластеров оксида церия в матрице производных целлюлозы на проницаемость 5-фторурацила из дерматологических пленок и гидрогелей / И. А. Шеферов, А. А. Балакирева, И. В. Спицкая, Н. Б. Мельникова // Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 15-летию создания фармацевтического отделения на факультете фундаментальной медицины МГУ “Образование и наука – стратегическая платформа для будущего фармации” – Москва, РУДН, 2023. С. 204 – 206

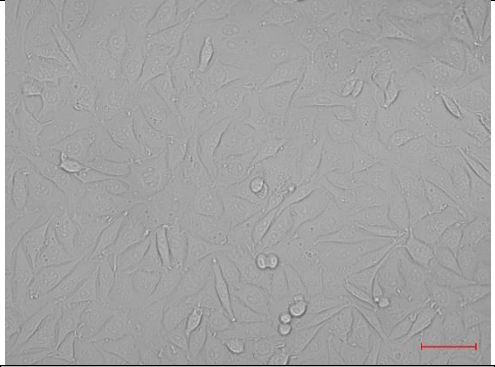
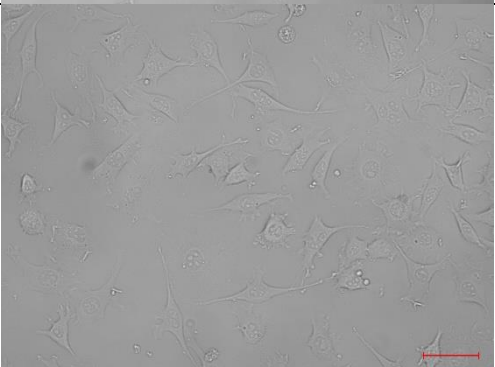
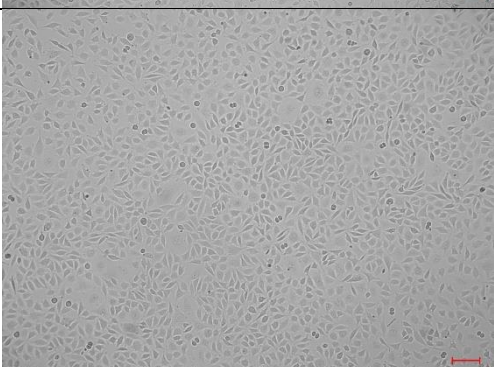
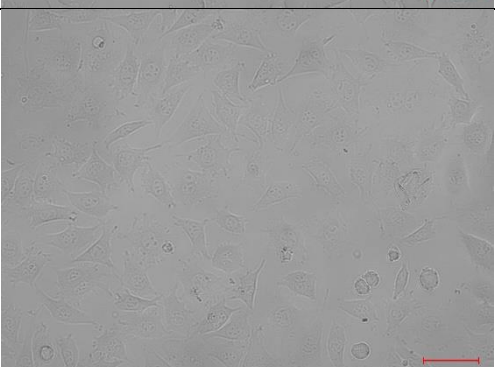
148. Емашева А. А. Влияние липофильности мембраны и пленкообразующего полимера в гелях на высвобождение 5-фторурацила из гидрофильных гелей с наночастицами оксида церия / А. А. Емашева, **И. А. Шеферов**, А. А. Шеферова // Сборник материалов Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов – 2024”, секция “Химия”, Москва, изд-во Перо, 2024. С. 785

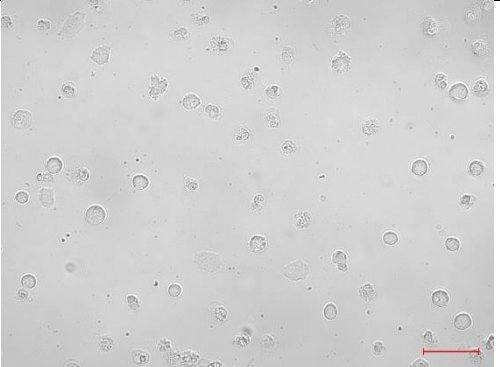
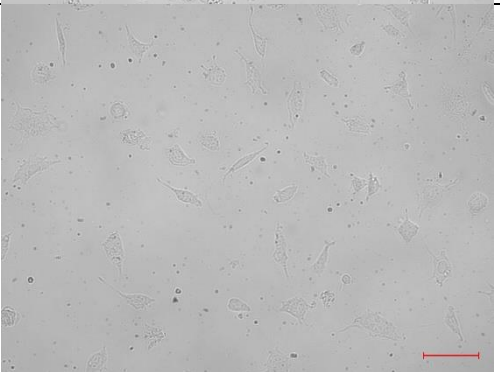
149. **Шеферов И. А.** Разработка и исследование плёнок для трансдермальной доставки 5- фторурацила, привитого к наноцерию / И. А. Шеферов, А. А. Емашева, А. А. Шеферова, Н. Б. Мельникова // Сборник тезисов XXVII Всероссийской конференции молодых ученых-химиков (с международным участием), 16-18 апреля, 2024. - Нижний Новгород: Изд-во ННГУ им. Н. И. Лобачевского, 2024 С. 699

150. **Шеферов И. А.** Математическое моделирование кинетики высвобождения 5-фторурацила в *in vitro* экспериментах из дермальных гелей и пленок / И. А. Шеферов, А. А. Емашева, А. А. Шеферова, Д. А. Пантелеев, Н. Б. Мельникова // Сборник тезисов 6-й Российской конференции по медицинской химии, 1 – 4 июля, 2024 г., Нижний Новгород: Изд-во ООО “Адмирал-принт”, 2024. С. 178

Приложение 1

Таблица П.1 - Качественная оценка цитотоксичности культур клеток NCTC клон 929 через 24 часа после инкубации с полимером ГЭЦ

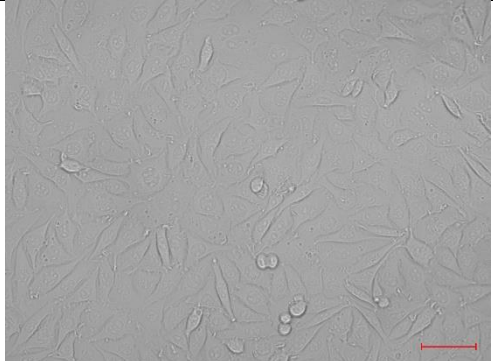
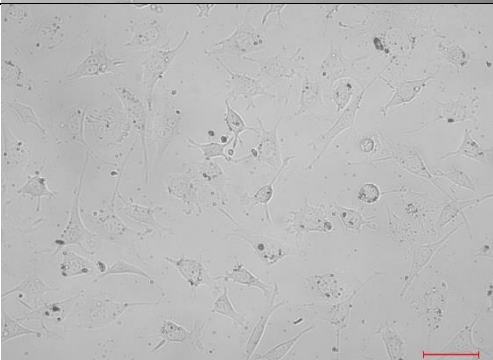
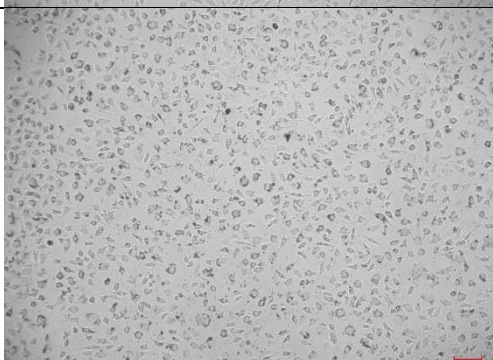
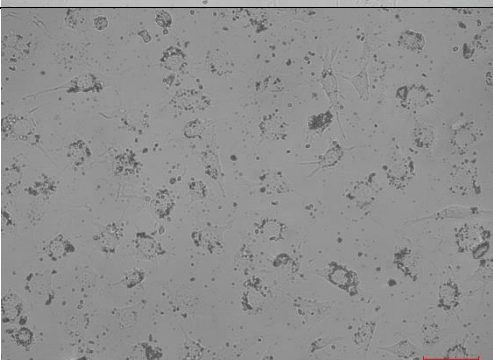
Наименование группы	Репрезентативные микрофотографии культур	
	Ув. 10х	Ув. 20х
Отрицательный контроль Цитотоксичность - 0		
Положительный контроль Цитотоксичность – 4 (острая)		
Образец ГЭЦ, 0,1 мкМ Цитотоксичность - 0		
Образец ГЭЦ, 1 мкМ Цитотоксичность - 0		

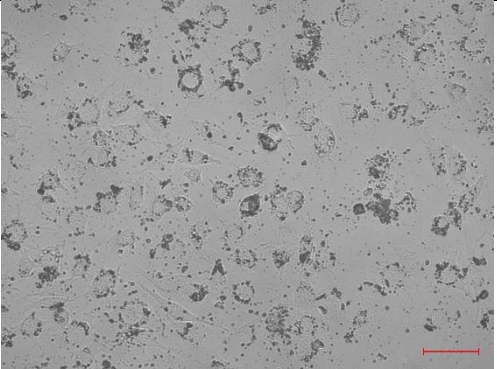
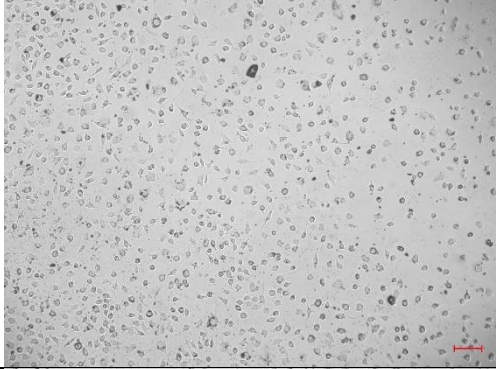
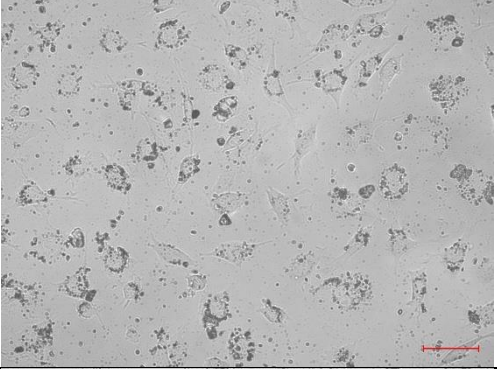
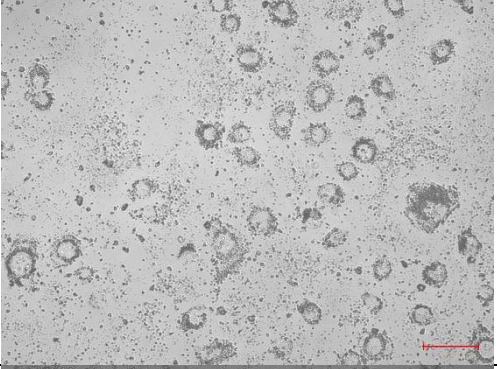
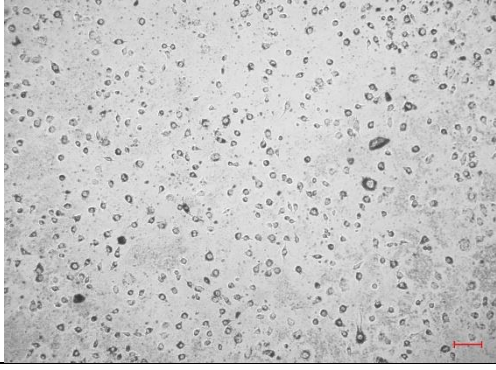
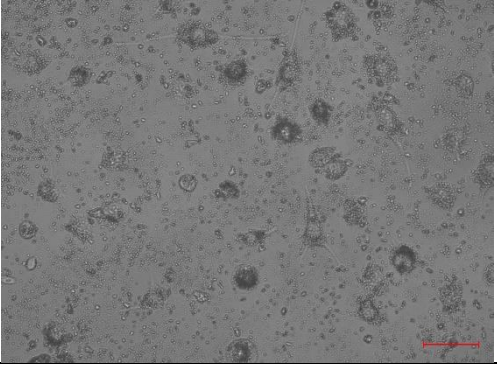
Образец ГЭЦ, 10 мкМ Цитотоксичность – 4 (острая)		
Образец ГЭЦ, 25 мкМ Цитотоксичность – 4 (острая)		

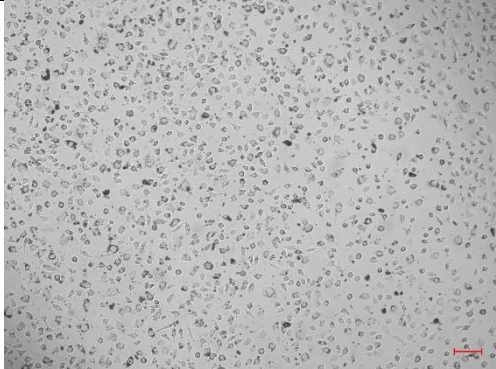
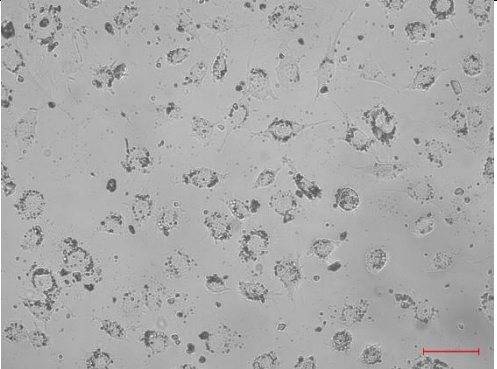
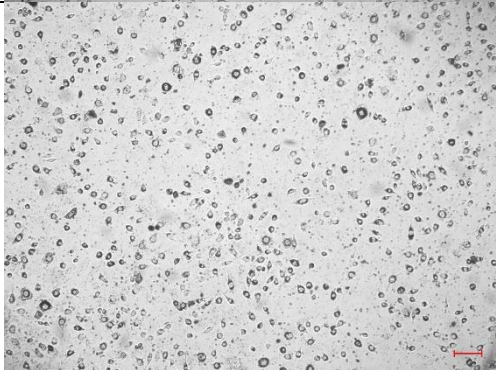
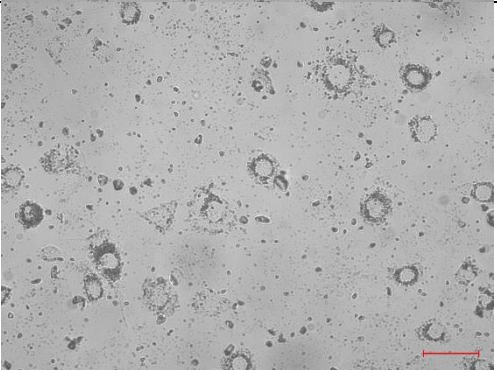
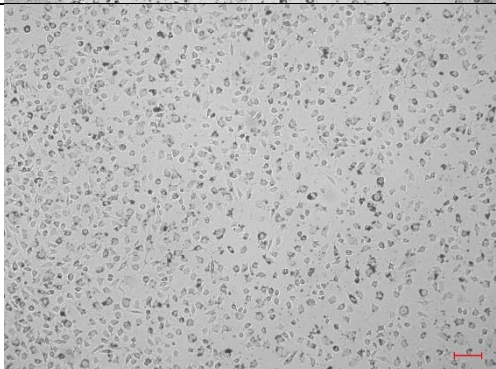
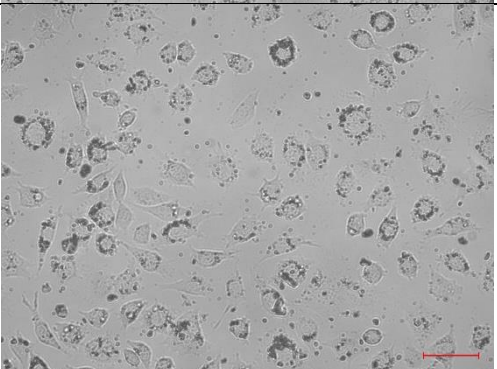
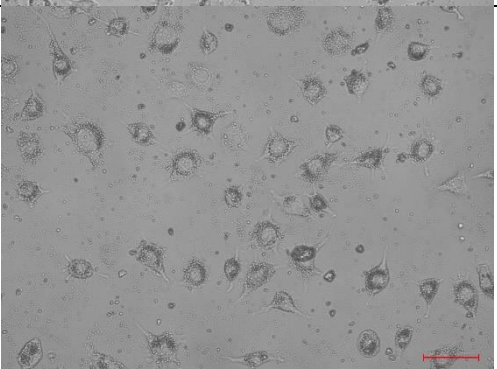
Примечание – масштабная линейка 100 мкм

Приложение 2

Таблица П.2 - Качественная оценка цитотоксичности культур клеток NCTC клон 929 через 24 часа после инкубации с наночастиц церия CeO_2 нч, покрытых полимерами на основе ГЭЦ

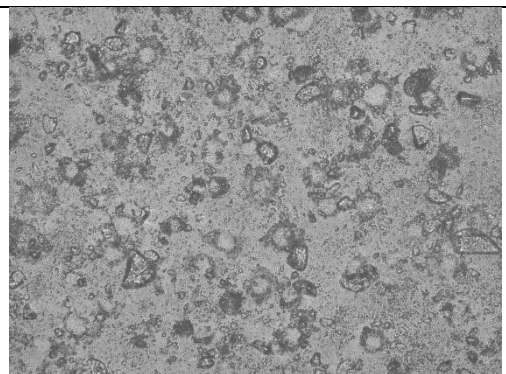
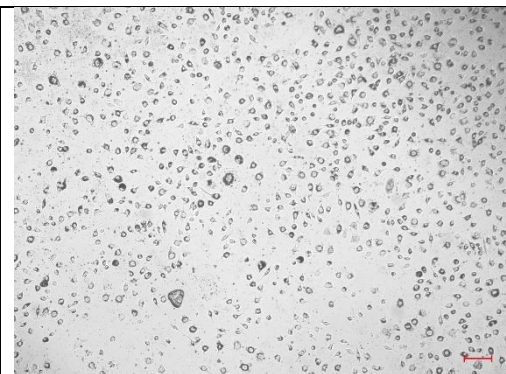
Наименование группы	Репрезентативные микрофотографии культур	
	Ув. 10х	Ув. 20х
Отрицательный контроль Цитотоксичность - 0		
Положительный контроль Цитотоксичность – 4 (острая)		
Образец CeO_2 нч+ГЭЦ 10 мкг/мл Цитотоксичность – 1 (легкая)		
Образец CeO_2 нч+ГЭЦ, 50 мкг/мл Цитотоксичность – 3 (значительная)		

Образец CeO_2 нч+ГЭЦ, 100 мкг/мл Цитотоксичность – 3 (значительная)		
Образец CeO_2 нч+ГЭЦ, 200 мкг/мл Цитотоксичность – 3 (значительная)		
Образец CeO_2 нч+ГЭЦ, 400 мкг/мл Цитотоксичность – 4 (острая)		
Образец CeO_2 нч+ГЭЦ, 600 мкг/мл Цитотоксичность – 4 (острая)		

Образец CeO_2 нч, 10 мкг/мл Цитотоксичность — 3 (значительная)		
Образец CeO_2 нч, 100 мкг/мл Цитотоксичность — 4 (острая)		
Образец CeO_2 нч, 200 мкг/мл Цитотоксичность — 4 (острая)		
Образец CeO_2 нч, 400 мкг/мл Цитотоксичность — 4 (острая)		

Образец CeO_2 нч,
600 мкг/мл

Цитотоксичность
– 4 (острая)



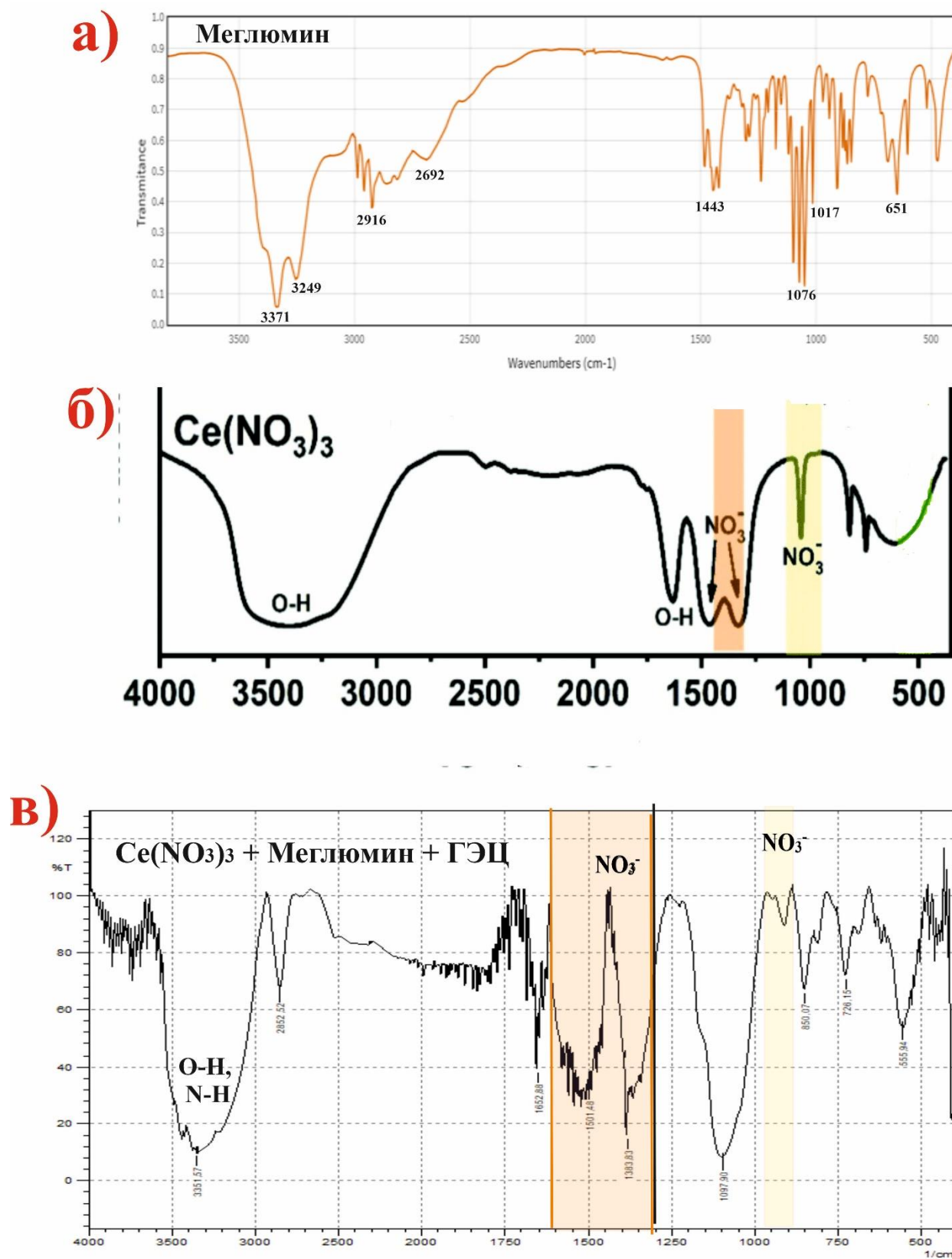


Рисунок П. 3 - ИК-спектры исходных продуктов реакций (а- меглюмин, б - нитрат церия, в - продукт взаимодействия в течение первых минут синтеза)

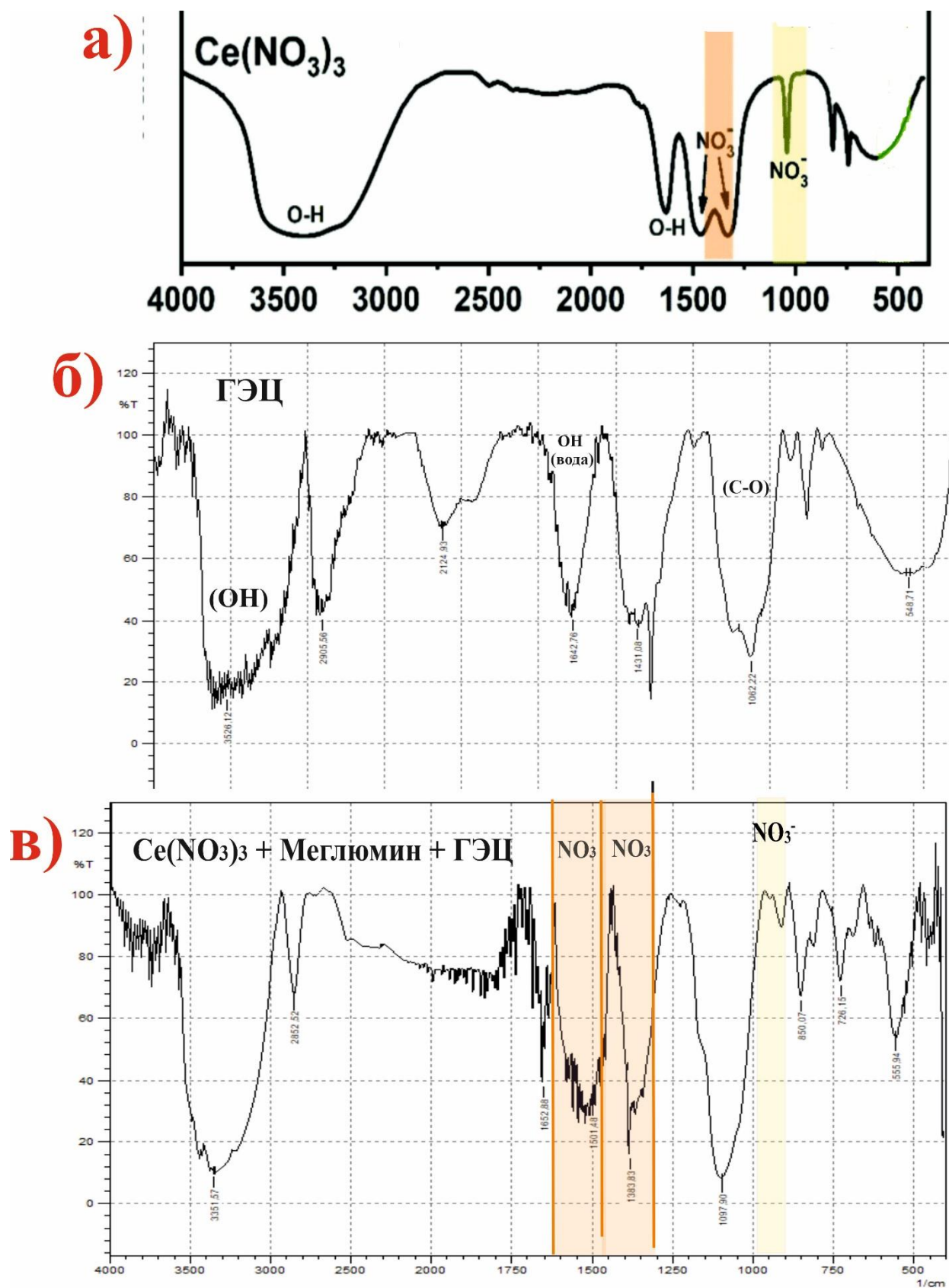


Рисунок П. 4 - ИК-спектры исходных продуктов реакций (а- нитрат церия, б -ГЭЦ, в - продукт взаимодействия в течение первых минут синтеза)



«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ГАУЗ НОЦККСЛС
к.фарм.н.,
И.В. Спицкая

21 января 2025 г.

АКТ АПРОБАЦИИ

результатов кандидатской диссертации Шеферова Ильи Александровича на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук по специальности – 3.4.1. «Промышленная фармация и технология получения лекарств» по разделу: «Валидация методики высвобождения водорастворимых пиримидинов (5-фторурацила и ксимедона) из мягкой лекарственной формы» в государственное автономное учреждение здравоохранения Нижегородской области «Нижегородский областной центр по контролю качества и сертификации лекарственных средств»

Комиссия в составе директора, к.ф.н., И.В. Спицкой; начальника испытательной лаборатории Е.В. Митрофановой подтверждает достоверность полученных результатов по высвобождению 5-фторурацила и ксимедона из мягкой лекарственной формы (гели), полученных Шеферовым Ильей Александровичем в ходе работы над кандидатской диссертацией в государственном автономном учреждении здравоохранения Нижегородской области «Нижегородский областной центр по контролю качества и сертификации лекарственных средств» (603141, г. Нижний Новгород, ул. Геологов, д.6, тел. (831)466-70-55, e-mail: nokksls@sandy.ru).

Протокол валидации методики оценки высвобождения пиримидинов из гелей включал: 1. Тип и структура ячейки Франца, объём ячейки, объём пробы, температура; 2. Тип мембраны; 3. Методику количественного определения пиримидинов (ВЭЖХ).

При совместных экспериментах в испытательной лаборатории в соответствии с протоколом валидации показано, что предлагаемая методика оценки высвобождения пиримидинов из гелей и количественное определение соответствовала валидационным параметрам по показателям линейность, специфичность, воспроизводимость, правильность, прецизионность, робастность.

Ответственные за апробацию:

Директор, к.фарм.н.

И.В. Спицкая

Начальник испытательной лаборатории
603141, г. Нижний Новгород, ул. Геологов, д.6

Е.В. Митрофанова

«УТВЕРЖДАЮ»

Заведующий структурным подразделением
ГБПОУ НО «Нижегородский медицинский
колледж», канд.фарм.наук, отличник
здравоохранения РФ



И.А. Пегова

20 января 2025 г

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Результатов кандидатской диссертации Шеферова Ильи Александровича, посвященной технологии получения мягких лекарственных форм активных фармацевтических субстанций и наночастиц оксидов металлов для местного применения для улучшения биофармацевтических показателей, представленной на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.1. «Промышленная фармация и технология получения лекарств» в научно-исследовательскую работу фармацевтического отделения государственного бюджетного профессионального образовательного учреждения Нижегородской области «Нижегородский медицинский колледж».

Комиссия в составе канд.фарм.наук, преподавателя Л.И. Запорожской и канд.хим.наук, заведующего практикой Е.С. Рыжовой подтверждает использование результатов, полученных Шеферовым Ильей Александровичем в ходе работы над кандидатской диссертацией по разработке составов и технологии получения комбинированных мягких лекарственных форм растворимых оксопиримидинов и наночастиц оксидов металлов для местного применения с улучшенными биофармацевтическими показателями в научно-исследовательской и учебной работе фармацевтического отделения государственного бюджетного профессионального образовательного учреждения Нижегородской области «Нижегородский медицинский колледж».

Канд.хим.наук, заведующий
практикой

Е.С. Рыжова

Канд.фарм.наук, преподаватель

Л.И. Запорожская

603011, г. Нижний Новгород, ул. Ильинская, д.20