

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
факультет медико-фармацевтичних технологій
кафедра клінічної фармакології та клінічної фармації**

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему «**ВИВЧЕННЯ МОЖЛИВОСТЕЙ ОЦІНКИ ЕКВІВАЛЕНТНОСТІ
IN VITRO ПРЕПАРАТІВ IV КЛАСУ ЗА БІОФАРМАЦЕВТИЧНОЮ
КЛАСИФІКАЦІЙНОЮ СИСТЕМОЮ**»

Виконав: здобувачка вищої освіти

групи Кл.Дос.21(1,63)

спеціальності: 226 Фармація, промислова фармація

освітньої програми Клінічні дослідження

Лілія АВЕРКОВА-САВІНА

Керівник: доцент закладу вищої освіти кафедри

клінічної фармакології та клінічної фармації.,

д.фарм.н., доцент Сергій ШЕБЕКО

Рецензент: доцент закладу вищої освіти кафедри

клінічної лабораторної діагностики, д.фарм.н.,

доцент Олена ДОЛЖИКОВА

Харків – 2023 рік

АНОТАЦІЯ

Робота присвячена вивченню можливостей оцінки еквівалентності *in vitro* препаратів IV класу за біофармацевтичною класифікаційною системою. Проведено аналіз методів дослідження еквівалентності, які можна теоретично та практично застосувати для речовин IV класу за біофармацевтичною класифікаційною системою та запропоновано підходи дослідження *in vitro*, що є альтернативною дослідженню еквівалентності *in vivo* для речовин даного класу на прикладі препаратів діосміну. Робота складається з 3 розділів, викладених на 50 сторінках, має 12 таблиць, 25 рисунка, 34 джерела інформації.

Ключові слова: біоеквівалентність, *in vitro*, біофармацевтична класифікаційна система, IV клас, біолейвер

ANNOTATION

The paper is devoted to the study of the possibilities to assess the equivalence of Class IV drugs *in vitro* pursuant to the biopharmaceutical classification system. Analysis of the equivalence research methods that can be applied for Class IV substances pursuant to the biopharmaceutical classification system is executed both theoretically and practically, and *in vitro* research approaches are proposed, thus constituting an alternative to the equivalence research *in vivo* for this class of substances as illustrated by diosmin medications. The work consists of 3 sections on 50 pages, has 12 tables, 25 figures, 34 sources of information

Keywords: bioequivalence, *in vitro*, biopharmaceutical classification system, Class IV, biowaiver

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ПРОБЛЕМА ВИВЧЕННЯ БІОЕКВІВАЛЕНТНОСТІ ПРЕПАРАТІВ IV КЛАСУ ЗА БІОФАРМАЦЕВТИЧНОЮ КЛАСИФІКАЦІЙНОЮ СИСТЕМОЮ (огляд літератури).....	8
1.1. Загальні уявлення про речовини IV класу за біофармацевтичною класифікаційною системою.....	8
1.2. Характеристика флавоноїдів групи діосміну згідно з принципами біофармацевтичної класифікаційної системи...	9
Висновки до розділу 1	19
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	20
РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА МЕТОДІВ ДОВЕДЕННЯ ЕКВІВАЛЕНТНОСТІ ПРЕПАРАТІВ ДІОСМІНУ IN VITRO.....	24
3.1. Дослідження еквівалентності препаратів діосміну за процедурою біовейвера.....	24
3.2. Порівняльне мікроскопічне дослідження препаратів діосміну	33
Висновки до розділу 3	47
ВИСНОВКИ.....	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	51

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт

БКС – біофармацевтична класифікаційна система

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДФУ – Державна фармакопея України

ЛЗ – лікарський засіб

МКЯ – методи контролю якості

МОФФ – мікронізована очищена флавоноїдна фракція

ВСТУП

Актуальність теми. Останнім часом в Україні виробництво генеричних лікарських засобів (ЛЗ) значно перевищує виробництво оригінальних. Не викликає сумнівів, що фармацевтичне виробництво в Україні в основному націлено на відтворення генеричних ЛЗ і, відповідно, фармацевтичний ринок складається переважно з генериків, що пов'язано з відносно низькою вартістю, а також простим і менш витратним способом розробки. Щоб забезпечити належну якість, ефективність та безпеку генериків, повинні виконуватись всі вимоги щодо виробництва ЛЗ та проводитись необхідні дослідження з доведення біоеквівалентності. Існує два методи досліджень: *in vivo* та *in vitro*. Оскільки дослідження *in vivo* потребують великих витрат і мають ризики, то активно розробляються методи *in vitro*. Але ці дослідження мають проблеми з кореляцією отриманих результатів та реальною фармацевтичною практикою, тому що метод *in vivo* базується на низці спрощень фармакокінетичних перетворень в організмі людини, насамперед на етапі абсорбції [1].

Найбільш використовуваним методом доказу еквівалентності *in vitro* є вивчення препаратів за процедурою біоєвейвера на основі біофармацевтичної класифікаційної системи (БКС).

Система класифікації запропонована Amidon et al. стала відома як «біофармацевтична класифікаційна система» і згодом була прийнята різними регулюючими органами, щоб надати дозвіл на дослідження біоеквівалентності (біоєвейвери на основі БКС) для твердих лікарських форм з негайним вивільненням за певних умов [1]. На практиці прийнятність біоєвейвера на основі БКС залежить від таких аспектів: фармакологічний профіль (терапевтичний діапазон), фізико-хімічні характеристики активної речовини (що впливають на розчинність та проникність) та характеристики лікарської форми (профіль розчинення *in vitro*, допоміжні речовини) [2].

БКС ділить усі препарати на 4 класи на основі розчинення у воді та ступеня проникнення в кишечник діючої речовини:

- I клас – висока розчинність, високий ступінь проникнення;
- II клас – низька розчинність, високий ступінь проникнення;
- III клас – висока розчинність, низький ступінь проникнення;
- IV клас – низька розчинність, низький ступінь проникнення.

Найбільш проблемним для вивчення є IV клас, оскільки препарати цього класу погано розчиняються у водному середовищі та погано проникають через цитоплазматичну мембрану. Це, своєю чергою, впливає на абсорбцію. Тому препарати IV класу рекомендується вивчати лише за допомогою методу *in vivo*, насамперед порівняльних фармакокінетичних досліджень, які є більш фінансово витратними та ризиковими, а також потребують більшого періоду часу для їх проведення.

Виникає питання про перспективи використання модифікованих підходів до проведення процедури біоєвейвера для дослідження препаратів IV класу за БКС або про можливість застосування додаткових альтернативних методів з цією метою.

З урахуванням всього вищезгаданого науковий інтерес представляє вивчення можливостей оцінки еквівалентності препаратів IV класу за БКС на прикладі препаратів діосміну.

Мета дослідження.

Метою роботи стало обґрунтування альтернативних методів дослідження еквівалентності *in vivo* препаратів IV класу за БКС.

Завдання дослідження. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Провести літературний огляд щодо проблеми вивчення біоеквівалентності препаратів IV класу згідно з БКС.
2. Проаналізувати можливість застосування альтернативних методів визначення біоеквівалентності *in vitro* на прикладі діосміну.
3. Здійснити модифікацію стандартного методу *in vitro* з доказу

біоеквівалентності препаратів діосміну згідно з процедурою біовейвера.

4. Надати альтернативні методи *in vitro* доведення еквівалентності препаратів діосміну.

5. Проаналізувати практичні рекомендації щодо оптимізації методів вивчення біоеквівалентності *in vitro* для препаратів IV класу за БКС.

Об'єкт дослідження. Біоеквівалентність лікарських засобів IV класу за БКС.

Предмет дослідження. Доведення еквівалентності *in vitro* препаратів діосміну.

Методи дослідження. Літературний пошук, тест на розчинення, мікроскопічний метод, методи доведення біоеквівалентності ЛЗ, порівняльний аналіз, статистичні методи.

Практичне значення отриманих результатів. В роботі виявлена та узагальнена проблема вивчення біоеквівалентності препаратів IV класу за БКС. У ході дослідження було проведено аналіз можливих модифікацій існуючих методів доказів біоеквівалентності *in vitro* для речовин IV класу за БКС на прикладі препаратів діосміну, згідно з процедурою біовейвера. Запропоновано альтернативний підхід доказу еквівалентності препаратів діосміну, зареєстрованих в Україні, на основі ступеня мікронізації очищеної флавоноїдної фракції. Запропонований підхід дозволяє проводити дослідження з доказу еквівалентності препаратів IV класу за БКС, що обумовлює підвищення якості генеричних препаратів на фармацевтичному ринку України.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Робота складається зі вступу, 3 розділів (огляд літератури, матеріали та методи, основна частина) та висновків. Робота викладена на 50 сторінках, має 12 таблиць, 25 рисунка, 34 джерела інформації.

РОЗДІЛ 1

ПРОБЛЕМА ВИВЧЕННЯ БІОЕКВІВАЛЕНТНОСТІ ПРЕПАРАТІВ IV КЛАСУ ЗА БІОФАРМАЦЕВТИЧНОЮ КЛАСИФІКАЦІЙНОЮ СИСТЕМОЮ (огляд літератури)

1.1. Загальні уявлення про речовини IV класу за біофармацевтичною кваліфікаційною системою

Препарати IV класу мають багато характеристик, які є проблематичними для ефективної пероральної доставки. Деякі з пов'язаних проблем включають низьку розчинність у воді, погану проникність, нестабільне та погане поглинання, внутрішньосуб'єктну та міжсуб'єктну варіабельність та значний позитивний вплив їжі, що призводить до низької та змінної біодоступності. Крім того, більшість препаратів класу IV є субстратом для Р-глікопротеїну (низька проникність) і субстратом для CYP3A4 (інтенсивний пресистемний метаболізм), що ще більше збільшує проблему низького терапевтичного потенціалу цих препаратів. Десять років тому екстремальні приклади сполук класу IV були скоріше винятком, ніж правилом, але сьогодні багато препаратів-кандидатів, які розробляються, потрапляють до цієї категорії. Створення рецептури та розробка ефективної системи доставки препаратів IV класу є важким завданням для будь-якого розробника. Невід'ємні перешкоди, створювані цими препаратами, перешкоджають їх впровадженню на фармацевтичний ринок. Важливість складу та дизайну рецептури для успішної розробки ліків особливо ілюструється випадком IV класу. Щоб бути клінічно ефективними, ці ліки вимагають розробки належної системи доставки для перорального введення. Ідеальні пероральні лікарські форми повинні забезпечувати як досить високу біодоступність, так і низьку варіабельність абсорбції між суб'єктами і всередині кожного суб'єкта [3].

Таким чином, ці препарати потребують більш сумісної та ефективної

системи доставки. Тест розчинення *in vitro* застосовується тільки для високорозчинних діючих речовин з передбачуваною абсорбцією у людини, IV клас препаратів для цього не підходить. Концепція може бути застосована для твердих лікарських форм для прийому всередину з негайним вивільненням і системною дією, в тій же лікарській формі [4].

1.2. Характеристика флавоноїдів групи діосміну згідно з принципами біофармацевтичної класифікаційної системи

БКС розділяє активні фармацевтичні інгредієнти (АФІ) на 4 класи у відповідності до характеристик розчинності та всмоктування у організмі [5].

Діосмін відноситься до 4 класу БКС [6], це підтверджується характеристиками діосміну: показниками розчинності та показниками ступеню проникнення.

Діосмін має низьку розчинність у воді [6-8], яка при 20°C дорівнює 0.0012 г/л, $\log P = -0,10$ [9]. Через низьку розчинність у воді діосмін погано абсорбується з шлунково-кишкового тракту; отже, для підвищення як біодоступності, так і ефективності діосмін, все частіше мікронізується, щоб отримати частинки менше 2-20 мкм [6, 8, 9].

Мікронізація досягається за рахунок використання струменів повітря, що працюють при надзвукових швидкостях, для створення повторюваних зіткнень між частинками, в результаті чого середній розмір частинок становить <2 мкм. Поглинання сполук, отриманих з метаболізму діосміну, вимірюване виділенням сечі з загальної радіоактивності після орального введення ^{14}C -діосміну у людей, було значно ($P = 0,0004$, аналіз дисперсії) покращилося при мікронізації ($57,9 \pm 20,2\%$) проти немікронізації ($32,7 \pm 18,8\%$). [6, 10]. Мікронізація збільшує швидкість розчинення діосміну та покращує його метаболізм, що, у свою чергу, покращує вплив метаболітів, які відповідають за його фармакологічну активність [11-13].

Позитивний вплив мікронізації на фармакологічну активність

мікронізованої очищеної флавоноїдної фракції (МОФФ), яка складається з 90% діосміну та 10% гесперидину, продемонстровано як у доклінічних, так і в клінічних фармакологічних дослідженнях. У дослідженні, проведеному у хом'яків, МОФФ зменшила макромолекулярну проникність, викликану ішемією / реперфузією, у мікроциркуляції щік більшою мірою, ніж немікронізована очищена флавоїдна фракція (83,4% проти 47,9% відповідно) [6, 14].

У клінічному дослідженні [6, 10] 500 мг МОФФ в дозуванні двічі на день протягом 2 місяців, покращили клінічні симптоми та зменшили параметри венозного відтоку в порівнянні з 300 мг немікронізованого діосміну, що приймали тричі на день. Отже, мікронізація має важливе значення для ефективного поглинання активних сполук [12].

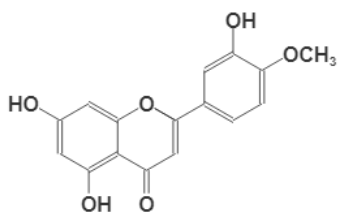


Рис. 1.1. Діосметин

Діосметин не поглинається безпосередньо організмом, і, як показують дослідження [6, 9, 15], він не виявляється в плазмі після перорального введення. Після перорального введення діосмін швидко перетворюється в кишечнику кишкової флорою і поглинається як аглікон, діосметин (рис. 1.1). Діосметин поглинається і швидко поширюється по всьому тілу з періодом напіввиведення плазми 26-43 години [9, 13, 15].

Дослідження *in vitro* [9, 15] МОФФ показало, що 13С- та 14С-діосмін, інкубований флорою кишечника людини, перетворюються на діосметин, лютеолін та фенольні кислоти. Приблизно половина оральної дози 500 мг радіоактивно позначеного МОФФ поглиналась протягом 48 годин після призначення фармакокінетичного дослідження у 12 здорових чоловіків-добровольців [5]. Це подвійне сліпе, кросове дослідження з 14-денним періодом вимивання порівнювало поглинання радіоактивно позначеного МОФФ з немікронізованим діосміном. Оскільки діосмін не виділяється з сечею, абсорбцію оцінюють на основі усунення радіоактивності в сечі. Зменшення розміру частинок діосміну призвело до значного збільшення

Діосмін не поглинається безпосередньо організмом, і, як показують дослідження [6, 9, 15], він не виявляється в плазмі після перорального введення. Після перорального введення діосмін швидко перетворюється в

абсорбції; середня гастроентерологічна абсорбція мікронізованого ^{14}C -діосміну була значно більшою, ніж немікронізованого ^{14}C -діосміну (57,9% проти 32,7% протягом 0 до 168 год після дози, $P = 0,0004$). Діосметин мав швидкий період розповсюдження, а потім повільний період виведення в одноклозовому дослідженні немікронізованого діосміну 10 мг/кг. Час до максимальної концентрації діосметину у плазмі становив 1 год, з повільним зниженням концентрації через 2 год. Діосметин був виявлений ще через 48 год. [9].

Діосметин швидко деградується до фенольних кислот або їхніх похідних гліцину, які виділяються в сечі. Переважним метаболітом у людині є 3-гідроксифенілпропіонова кислота, яка в основному виводиться у кон'югованій формі. Метаболіти, виявлені в менших кількостях, включають інші фенольні кислоти, такі як 3-гідрокси-4-метоксибензойна кислота, 3-метокси-4-гідроксифенілацетатна кислота та 3,4-дигідроксибензойна кислота. У людей виведення мікронізованого діосміну є порівняно швидким-34% радіоактивно позначеної дози ^{14}C -діосміну виділяється з сечею та фекаліями протягом перших 24 год та 86% протягом перших 48 год. Неметаболізовані діосмін та діосметин не виділяються з сечею. Кумулятивна екскреція дози в сечі та фекаліях була 100% ($109 \pm 23\%$ від 0 до 168 год). Приблизно половина дози виділялася в фекаліях як незмінний діосмін та діосметин. [6, 9, 15].

Велика кількість доклінічних та клінічних випробувань [6, 9, 16, 13-19], показують, що діосмін ефективний на всіх стадіях венозної недостатності, включаючи венозні виразки. Діосмін збільшує судинозвужувальну дію норадреналіну на венозні стінки, що веде до підвищення венозного тону, і, отже, знижує венозну ємність, розтяжність і застій. Це збільшує венозний відтік і знижує венозний гіпертиск, присутній у пацієнтів, які страждають хронічною венозною недостатністю. Діосмін покращує лімфатичний дренаж, збільшуючи частоту і інтенсивність скорочення лімфатичних судин і загальної кількості функціональних лімфатичних капілярів. Крім того,

Діосмін разом з гесперидином зменшує діаметр лімфатичних капілярів і інтролімфатичний тиск. На рівні мікроциркуляції, Діосмін зменшує проникність капілярів і збільшує резистентність капілярів, захищаючи мікроциркуляцію від ушкоджувальних процесів.

Так, дослідження МОФФ – венозного препарату на основі флавоноїду, який є більш ефективним, ніж чистий діосмін, через наявність додаткових флавоноїдів, таких як гесперидин, діосметин, лінарін та ізоргіфілін, що МОФФ покращує венозний тонус шляхом модуляції норадренергічної сигналізації та зменшення метаболізму норадреналіну, а МОФФ також захищає від пошкодження клапанів, пов'язаних з запаленням, шляхом зниження проникності капілярів, поліпшення капілярної резистентності та збільшення лімфатичного дренажу. Найкраще співвідношення дози-ефект досягається при 1000 мг на добу [16].

Проведені рандомізовані, подвійні сліпі, плацебо-контрольовані дослідження у пацієнтів з хронічною венозною недостатністю показали, що МОФФ, вживаний двічі на день протягом 2 місяців, покращив багато симптомів хронічної венозної недостатності (функціональний дискомфорт, термічна сенсація, біль, тяжкість у нозі, відчуття набряку). Через 2 місяці лікування у пацієнтів, які отримували Daflon 500 мг, виявили суттєве зменшення об'ємної щиколотки. Удосконалення венозної гемодинаміки полягали у збільшенні венозного тону та зниженні венозної ємності при 50 мм рт. ст., венозної розтяжності при 40,50 і 60 мм рт. ст., загального часу спорожнення венозних речовин та 50% кінцевого спорожнення [9].

Діосмін як відомо, має виражені антиоксидантні та протизапальні властивості [9, 17, 18-22].

Вивчення молекулярних механізмів, що лежать в основі радіаційно-індукованого фіброзу печінки та оцінка можливого впливу діосміну на пероральну пероксисому проліфераторну активність рецептора- γ (PPAR- γ) показало, що лікування діосміном знижає окислювальний стрес запальну реакцію печінки, скасовує профіброгенні цитокіни та стимулює експресію

PPAR- γ , посилює антиоксидантний захист [23].

Дослідження ролі Діосміну в лікуванні змін тканин печінки, нирок та серця у мишей, викликаного метотрексатом, показало, що дози Діосміну (50 або 100 мг / кг маси тіла) суттєво знизили рівні тканин альдоніальдегіду та оксиду азоту та збільшували рівні глутатіону, глутатіон пероксидази, глутатіонредуктази, глутатіон-S-трансфераз, супероксиддисмутази та каталази порівняно з метотриксат-інтоксикацією [22, 24, 25]. Гістопатологічне дослідження показало, що діосмін значно мінімізував гістологічні зміни, індуковані МТХ, і практично відновив нормальну архітектуру печінкової, ниркової та серцевої тканин. Виходячи з цих даних, діосмін може бути багатообіцяючим засобом для захисту від цитотоксичності, індукованої метотриксатом, у пацієнтів з раком та аутоімуними захворюваннями [23].

Діосмін, показує антиканцерогенні властивості *in vivo*, здатен інгібувати ініціювання раку, можливо, через індукцію печінкових детоксикаційних ферментів, а також через антиоксидантні властивості [22, 24, 26].

Дослідженні дії Діосміну на клітинні лінії раку молочної залози, а саме MCF-7 (ER +, PR +/-, HER2-), MDAMB-231 (ER -, PR-, HER2-) і SK-BR-3 (ER-, PR-, HER2 +) показало, що клітинна лінія MCF-7 виявилася найбільш чутливою до лікування діосмином. Діосмін викликав зупинку клітинного циклу G2/M, підвищення рівня p53, p21 та p27, а також стрес-індукованого апоптозу при застосуванні при менших концентраціях (5 і 10 мкМ). Діосмін (20 мкМ) також сприяє апоптозу, який не спостерігався в нормальних клітинах епітеліальних клітин молочної залози людини (НМЕС). Діосмін стимулював окислювальні та нітрозативні стреси, пошкодження ДНК та зміни глобальних моделей метилювання ДНК. Так, діосмін, який діє при низькому мікромольному діапазоні проти клітин раку молочної залози, може розглядатися як перспективний кандидат на протиракову терапію [25].

Діосмін має потенціал в лікуванні нейродегенеративних захворювань,

таких як хвороба Альцгеймера, і його протизапальна і анти-апоптотична активність була продемонстрована в нейронних клітинах *in vitro* [23, 24, 26]. Діосмін пригнічує нейропатичні ноцицептивні механізми спинного мозку, що вказує на те, що цей флавоноїд є потенційною терапевтичною молекулою для зменшення невропатичного болю, викликаного нервовою аномалією [25].

На фармацевтичному ринку України зареєстровано декілька генеричних препаратів діосміну, інформацію щодо яких наведено нижче.

До дослідження було залучено генеричні лікарські засоби «Нормовен» таблетки вкриті оболонкою, по 500 мг, виробництва «Київський вітамінний завод» та «Діофлан» таблетки вкриті оболонкою, по 500 мг, виробництва «Корпорація Артеріум», напрацьовані в умовах виробництва (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Дані про досліджувані препарати-копії

Назва	Серія	Дата виготовлення
«Нормовен» таблетки, вкриті оболонкою, по 500 мг	FY160317	03.20.17
«Діофлан» таблетки, вкриті оболонкою, по 500 мг	162328	04.05.2017

Препарати відповідають вимогам ДФУ* [27] та проекту Методи контролю якості (МКЯ) за тестом «Розчинення».

Склад препаратів - генериків «Нормовен» таблетки, вкриті оболонкою, по 500 мг, виробництва «Київський вітамінний завод» та «Діофлан» таблетки, вкриті оболонкою по 500 мг, виробництва «Корпорація Артеріум» згідно проекту МКЯ, наведений у табл. 1.2 та 1.3 відповідно.

Згідно з «Переліком референтних препаратів, які можуть використовуватись при доведенні еквівалентності лікарських засобів» для препаратів з АФІ діосміну референтним препаратом є інноваційний препарат «Детралекс» (Detralex®), таблетки, вкриті оболонкою, по 500 мг, виробництва «Серв'є» (Les Laboratoires Servier), Франція, зареєстрований в

Україні на основі повного досьє реєстр. №UA/4329/01/01 (табл. 1.4).

Таблиця 1.2

Склад препарату «Нормовен» таблетки, вкриті оболонкою, по 500 мг

Склад на одну таблетку:	
Діосмін	450 мг
Гесперидин	50 мг
1 таблетка містить: флавоноїдної фракції 500 мг: діосмину 450 мг, гесперидину 50 мг	
Допоміжних речовин: натрію крохмаль гліколят (тип А), целюлоза мікрокристалічна, гідроксипропілметилцелюлоза, бетациклодекстрин, магнію стеарат, плівкова оболонка (Opadry II yellow)	–

Таблиця 1.3

Склад препарату «Діофлан» таблетки, вкриті оболонкою, по 500 мг

Склад на одну таблетку	
Діосмін	450 мг
Гесперидин	50 мг
1 таблетка містить очищеної мікронізованої флавоноїдної фракції — 500 мг : діосмину — 450 мг, гесперидину — 50 мг;	
Допоміжних речовин: целюлоза мікрокристалічна; натрію крохмаль гліколят (типу А); гіпромелоза; тальк; натрію лаурилсульфат; магнію стеарат; суміш для покриття «Opaglos 2 Orange» № 97A23967 містить: натрія карбоксиметилцелюлозу, мальтодекстрин, декстрази моногідрат, титану діоксид (E171), кислоту стеаринову очищену, тальк, заліза оксид жовтий (E172), заліза оксид червоний (E172)	

Таблиця 1.4

Дані про референтний препарат

Назва	Виробництво	Серія	Дата виготовлення	Термін придатності
«Детралекс» (Detralex®), таблетки, вкриті оболонкою, по 500 мг №60	Серв'є (Les Laboratories Servier), Франція	620747	04/2017	04/2021

Склад препарату «Детралекс» (Detralex®), таблетки, вкриті оболонкою, по 500 мг, виробництва Серв'є (Les Laboratories Servier), Франція згідно до інструкції на препарат та довідкової інформації, наведений у табл. 1.5.

Таблиця 1.5

**Склад препарату «Детралекс» (Detralex®), таблетки, вкриті оболонкою,
по 500 мг**

Склад на одну таблетку:	
Діосміну	450 мг
Флавоноїди, у т.ч. гесперидину	50 мг
Допоміжних речовин: желатин, магнію стеарат, целюлоза мікрокристалічна, натрію крохмаль гліколят (тип А), тальк, вода очищена; Плівкова оболонка: гліцерин, макрогол 6000, магнію стеарат, гіпромелоза, заліза оксид червоний (Е 172), натрію лаурилсульфат, титану діоксид (Е 171), заліза оксид жовтий (Е 172)	

Зразки референтного препарату відповідають вимогам ДФУ* [23] за тестом «Розчинення».

Основна фармакологічна дія препарату «Детралекс» обумовлена, згідно з літературними даними, присутністю таких речовин як діосмін і гесперидин [28]. З наведених вище за даних, був зроблений висновок про те,

що ці речовини згідно БКС треба відносити до 4 класу речовин, тобто тих речовин, що мають низьку розчинність і низьку проникність[25]. Проте, використання виробником препарату заздалегідь мікронізованої субстанції, різко міняє розчинність вказаних речовин, що дає можливість відносити їх швидше не до 4 класу, а 3 класу по БСК. Цей факт, а також використання виробником препарату «Детралекс» – Серв'є (Les Laboratoires Servier), Франція, допоміжних речовин, що прискорюють вивільнення діосміну з препарату – лаурилсульфат натрію, дозволяє розглядати препарат цього виробника як об'єкт для проведення біоєксперименту.

Для виготовлення препаратів «Нормовен» і «Діофлан» виробники, також використовують як субстанцію мікронізовану флавоноїдну фракцію, яка містить 90% діосміну і 10% суми флавоноїдів, де переважають гесперидин, лімарин, ізооріфілін і диосметин. Проте, склад допоміжних речовин досліджуваних препаратів «Нормовен» таблетки, вкриті оболонкою, по 500 мг, виробництва «Київський вітамінний завод» та «Діофлан» таблетки, вкриті оболонкою по 500 мг, виробництва «Корпорація Артеріум» відрізняється від складу допоміжних речовин референтного препарату «Детралекс» (Detralex®), таблетки, вкриті оболонкою, по 50 мг, виробництва Серв'є (Les Laboratoires Servier), Франція.

Так, склад допоміжних речовин препарату "Діофлан" – целюлоза мікрокристалічна; натрію крохмальгліколят (тип А); гіпромелоза; тальк; натрію лаурилсульфат; магнію стеарат; суміш для покриття "Opaglos 2 Orange" № 97A23967 містить: натрію карбоксиметилцелюлозу, мальтодекстрин, декстрази моногідрат, титану діоксид (E171), кислоту стеаринову очищену, тальк, залоза оксид жовтий (E172), залоза оксид червоний (E172), жовтий захід FCF (E110).

При цьому препарат аналогічної дії «Нормовен» таблетки, вкриті оболонкою, по 500 мг має наступний склад допоміжних речовин: натрію крохмаль гліколят (тип А), целюлоза мікрокристалічна, гідроксипропілметилцелюлоза, бетациклодекстрин, магнію стеарат, плівкова

оболонка (Opadry II yellow).

Порівняльний аналіз наведених складів препаратів генериків та оригінального препарату дозволяє виявити кілька фармакотехнологічних особливостей складу препаратів генериків. Виробник препарату «Нормовен» вводить до складу препарату додаткову речовину – розпушувач натрію крохмальгліколят, хоча в препараті вже присутній дезінтегрант – бетациклодекстрин. Це свідчить про спробу збільшити вивільнення діючої речовини з таблетки.

Спроба може бути пояснена двома причинами: по-перше впливом таких наповнювачів як целюлоза мікрокристалічна та гідроксипропілметилцелюлоза, а також ковзної добавки магнію стеарату. Інша причина це недостатня мікронізація субстанції, що вимагає додаткових заходів по її вивільненню з таблетки.

Такі ж проблеми присутні у виробника препарату «Діофлан». Незважаючи на те що він використовує той самий дезінтегрант що і виробник оригінального препарату – лаурилсульфат натрію в складі препарату «Діофлан» також присутній крохмальгліколят.

Висновки до розділу 1.

1. Препарати IV класу за БКС є самими проблемними об'єктами для доведення еквівалентності, оскільки погано розчинюються у водному середовищі та погано всмоктуються у шлунково-кишковому тракті. Тому їх еквівалентність рекомендується вивчати лише за допомогою методів *in vivo*, насамперед порівняльних фармакокінетичних досліджень, які є більш фінансово витратними та ризиковими, а також потребують більшого періоду часу для їх проведення. Це обумовлює актуальність використання модифікованих підходів до проведення випробувань *in vitro* для оцінки еквівалентності препаратів цього класу або застосування додаткових альтернативних методів досліджень.

2. Препарати діосміну є типовими представниками IV класу за БКС, оскільки виявляють низьку розчинність та низький ступінь проникності. Застосування мікронізації флавоноїдної фракції у технології виробництва препаратів даної групи, дещо покращують характеристики їх проникності, що наближує їх до III класу речовин за БКС та збільшує можливості застосування методів *in vitro* для оцінки еквівалентності.

3. В Україні зареєстровані генеричні препарати діосміну, такі як «Діофлан» та «Нормовен», а також оригінальний препарат «Детралекс» (Detralex®). Порівняльний аналіз складу допоміжних речовин препаратів генериків і оригінального препарату показав, що профіль допоміжних речовин препаратів відрізняється, що може призводити до різного ступеня вивільнення АФІ, а, отже, потребує проведення досліджень з доведення еквівалентності.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проведення досліджень з модифікації стандартного методу *in vitro* з доказу еквівалентності із дотриманням принципів БКС та розробки альтернативних методів *in vitro* для доведення еквівалентності препаратів діосміну «Детралекс», «Нормовен» і «Діофлан» було проведено на базі Сектору фармакокінетичних досліджень та біоеквівалентності Державної науково-дослідної лабораторії з контролю якості лікарських засобів НФаУ, а також на базі кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації НФаУ.

У дослідженні було використано наступні лікарські засоби:

- досліджуваний лікарський засіб «Нормовен», таблетки вкриті оболонкою, по 500 мг, № 60 (по 10 таблеток у блістері; по 6 блістерів у пачці), виробництва ЗАТ «Київський вітамінний завод», Україна (с. FУ160317);
- досліджуваний лікарський засіб «Діофлан», таблетки вкриті оболонкою, по 500 мг; №60 (по 10 таблеток у блістері, по 6 блістерів у пачці), виробництва «Корпорація Артеріум», Україна (с. 162328);
- лікарський засіб порівняння «Детралекс» (Detralex®), таблетки, вкриті оболонкою, по 500 мг, (по 15 таблеток у блістері; по 4 блістера у пачці), виробництва «Серв'є» (Les Laboratoires Servier), Франція (с. 620747).

В ході дослідження було використано обладнання, яке наведено нижче у списку та мало документи щодо проходження державної метрологічної атестації (сертифікат / акт / свідоцтво):

- ваги лабораторні електронні АВТ 120-5DM;
- рН-метр Starter ST2100, фірми Ohaus;
- устаткування для розчинності – Напівавтоматична система для тестування розчинення «Pharma Test» тип РТ-DT70;
- вимірювальна система – Рідинний хроматограф Agilent 1290 с мас-селективним детектором Agilent 6530;

- мірний посуд класу точності А в необхідній кількості;
- устаткування для мікроскопії – модульний світлопольний мікроскоп дослідницького класу B-1000BF (Optika, Італія) із цифровою камерою Optikam HDMI Pro (Optika, Італія).

Порівняльні дослідження кінетики розчинення генеричних ЛЗ «Нормовен» та «Діофлан», а також референтного препарату «Детралекс» було проведено згідно із вимогами [29, 30, 31] у 3-х різних водних середовищах розчинення з рН 1,2, рН 4,5 та рН 6,8, із порівнянням профілів розчинення та розрахунком фактору подібності (f_2).

Кількісне визначення вмісту діосміна у реакційному середовищі та у досліджуваних лікарських формах при проведенні тесту розчинення було здійснено методом високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (LC-MS / MS). Ця методика використовує градієнтне елюювання для збільшення ступеня поділу компонентів субстанції з допоміжними речовинами, що містяться в препараті. Крім цього, в методиці використано мас-спектрометричні детектування визначених речовин, що драматично збільшило чутливість і селективність методики. Ще однією особливістю методики є використання хроматографічної колонки з розміром частинок менше 5 мкм, що дозволило поряд з чутливістю збільшити ефективність поділюваних піків. Все це дозволило визначати досить низькі концентрації досліджуваних речовин (приблизно 0.1 ppm – 1 ppm) без втрати прецизійності, правильності та відтворюваності.

Оскільки для вивчення структури можливих продуктів деградації необхідний високоселективний детектор, у якості детектуючої системи був застосований мас-селективний детектор Agilent 6530 Q-TOF. Цей детектор використовувався спільно з рідинним хроматографом Agilent 1290, обладнаним діодною матрицею, чотирьохканальним насосом для формування градієнта низького тиску, автоматичним дозатором проб і термостатом колонок. Для обробки отриманих результатів вимірювань використовували програмне забезпечення MassHunter B 07.00.

Розчинення *in vitro* досліджували в діапазоні рН 1 – 6.8 (рН 1.2, 4,5 та 6,8). Додаткові дослідження які можуть бути необхідними при значеннях рН, в яких АФІ має мінімальну розчинність не проводилися. Будь-які поверхневоактивні речовини при проведенні експерименту не використовувалися.

Використовували 12 одиниць лікарського засобу для кожного дослідження для проведення статистичної оцінки.

Звичайними умовами дослідження є:

Об'єм середовища:	900 мл
Швидкість обертання лопаті:	50 об/хв
Температура:	37±0,5 °C
Середовище розчинення:	Буферний розчин рН 1,2 Буферний розчин рН 4,5 Буферний розчин рН 6,8
Графік відбору проб:	5, 10, 15, 30 хв;

Для порівняння показників ступеню розчинення лікарських засобів було розраховано фактор подібності (f_2).

$$f_2 = 50 * \log \{ [1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_{(t)} - T_{(t)})^2]^{-0,5} * 100 \}, \quad (2.1)$$

де n — кількість точок контролю;

$R(t)$ – середнє значення кількості діючої речовини, що перейшла в розчин у кожній зазначеній точці контролю референтного лікарського засобу (у відсотках);

$T(t)$ – середнє значення кількості діючої речовини, що перейшла в розчин у кожній зазначеній точці контролю досліджуваного лікарського засобу (у відсотках).

Мікроскопічне дослідження таблеткового матриксу препаратів «Детралекс», «Нормовен» і «Діофлан» проведено із застосуванням стандартних методів мікроскопії у світлому полі. Попередньо відбирали по 10 одиниць

лікарської форми кожного із дослідних засобів й відділяли оболонку від тіла таблетки, після чого кожену таблетку розчинювали у 5 мл фосфатного буферу (pH=6,8). Отриману суспензію наносили на предметне мікроскопічне скло у кількості декількох крапель та накривали покривним склом.

Далі проводили мікроскопічне вивчення із застосуванням дослідницького модульного світлопольного мікроскопа B-1000BF (Optika, Італія) із цифровою камерою Optikam HDMI Pro (Optika, Італія). Кратність збільшення мікроскопу виставляли у межах $\times 400$ – $\times 1000$ у залежності від характеру мікропрепаратів та задач дослідження. Цифрову обробку фотознімків мікропрепаратів, а також виміри різноманітних елементів таблеткового матриксу дослідних препаратів проводили із застосуванням спеціалізованого програмного забезпечення розробки Optika (Італія) „Optika IsView” та „Optika Vision Lite”.

Для об'єктивізації отриманих даних на мікропрепаратах при збільшенні $\times 1000$ у полі зору мікроскопу проводили підрахунок гранул таблеткового матриксу тест-зразків, розподіляли їх у залежності від розміру й виражали у відсотках.

Усі отримані результати обробляли методами описової статистики та представляли як середнє арифметичне $\pm$ стандартна помилка середнього або медіана з верхнім та нижнім квантилями. Статистичний аналіз міжгрупових відмінностей проводили методом ANOVA з апостеріорним тестом Т'юкі або непараметричними методами за необхідності [32, 33]. У разі обліку результатів в альтернативній формі використовували кутове перетворення Фішера. Обчислення проводили за допомогою програм IBM SPSS Statistics v. 22 ("IBM Corp.", США) та MS Excel 2016 ("Microsoft Corp.", США). Відмінності показників вважали статистично значущими при рівні вірогідності $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА МЕТОДІВ ДОВЕДЕННЯ ЕКВІВАЛЕНТНОСТІ ПРЕПАРАТІВ ДІОСМІНУ IN VITRO

3.1. Дослідження еквівалентності препаратів діосміну за процедурою біовейвера

Результати досліджень з порівняльного вивчення профілів розчинення для препаратів «Діофлан» та «Детралекс» при рН 1,2 наведено на рисунку 3.1.

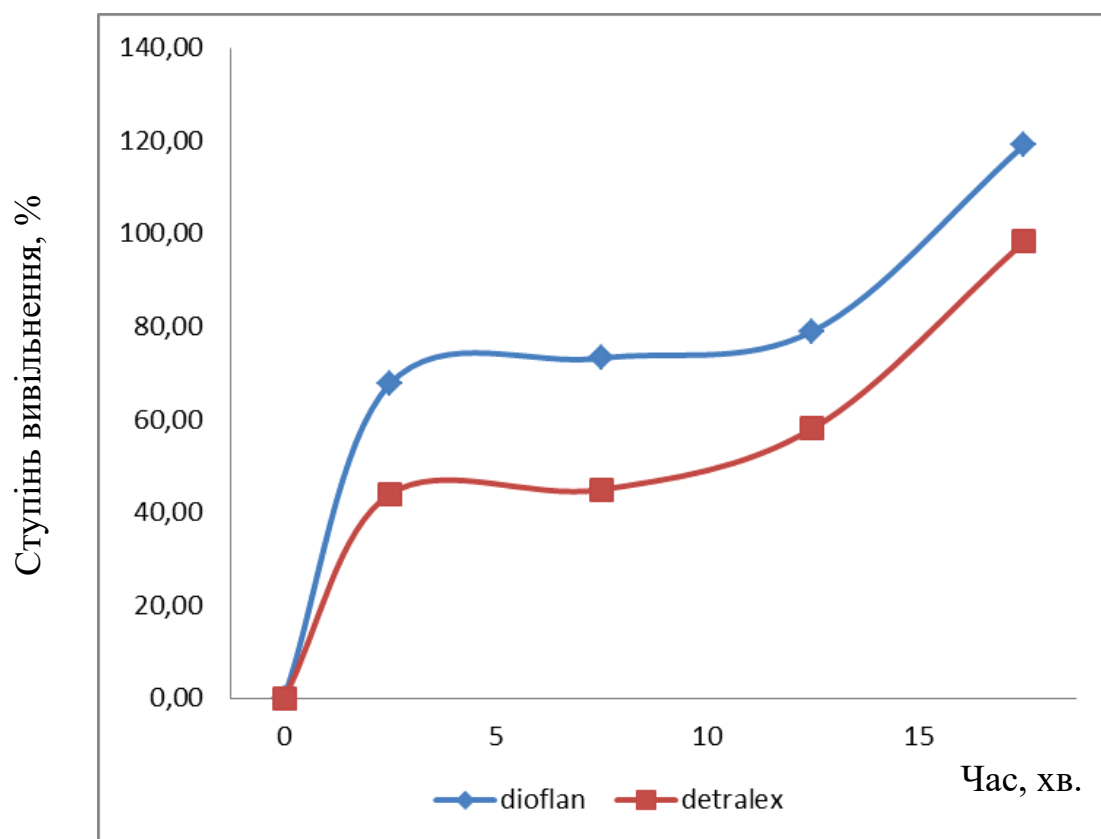


Рис. 3.1. Графік залежності вивільнення діосміну при рН 1,2 для препаратів «Діофлан» та «Детралекс»

Для порівняння показників ступеню розчинення лікарських засобів було розраховано фактор подібності f_2 , який наведено у таблиці 3.1.

Отриманий показник f_2 склав 168,7, що перевищує 50, а, отже, це означає, що профілі розчинення ЛЗ генерика «Діофлан» подібні профілю розчинення референтного ЛЗ «Детралекс» у середовищі при рН 1,2.

Таблиця 3.1

Розрахунок фактору подібності профілів розчинення препаратів

«Діофлан» та «Детралекс» при рН 1,2

Час, хв	Rt	Tt	Rt-Tt	(Rt-Tt) ²	$\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2$	n	1/n	f_2
5	43,88	67,62	-23,74	563,36	2236,06	4,000	0,2500	168,70
10	44,86	73,15	-28,29	800,41				
15	58,02	78,98	-20,96	439,15				
30	98,25	119,06	-20,81	433,14				

На рисунку 3.2. наведено дані досліджень з вивчення профілів розчинення для препаратів «Діофлан» та «Детралекс» при рН 4,5.

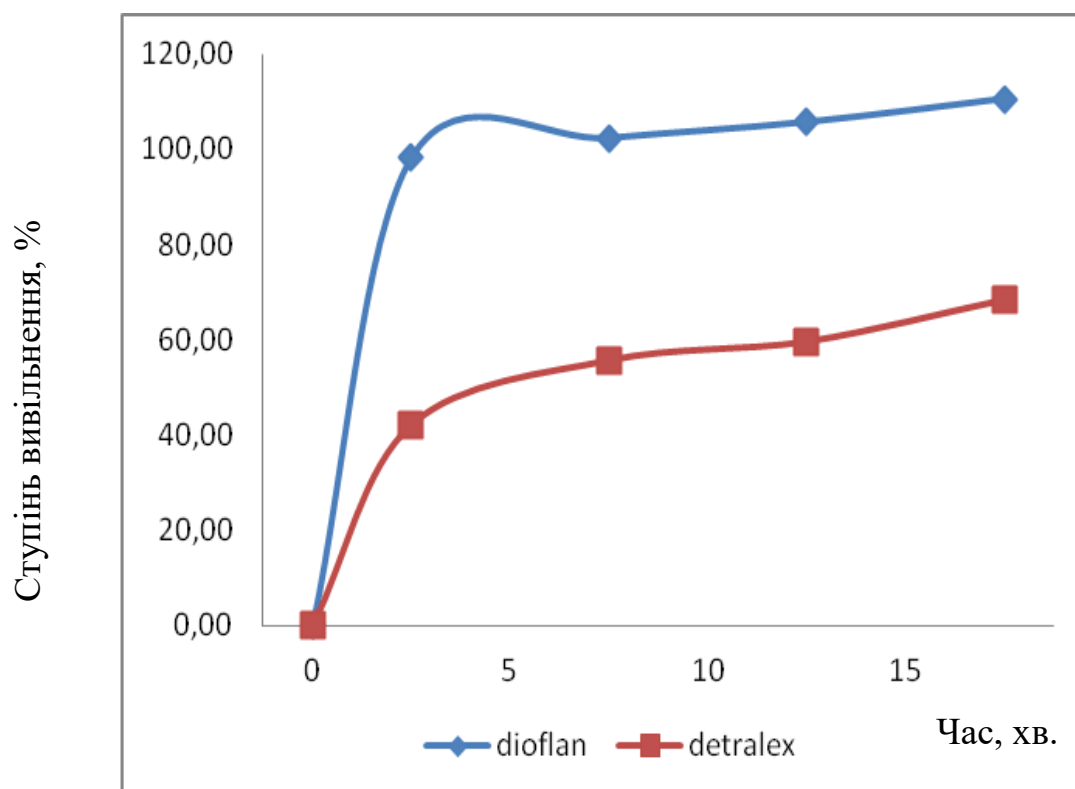


Рис. 3.2. Графік залежності вивільнення діосміну при рН 4,5 для препаратів «Діофлан» та «Детралекс»

Дані щодо розрахунку фактору f_2 для препаратів «Діофлан» та «Детралекс» наведено у таблиці 3.2. Отриманий показник f_2 склав 184,09, що означає подібність профілів розчинення досліджуваних ЛЗ при рН 4,5.

Таблиця 3.2

**Розрахунок фактору подібності профілів розчинення препаратів
«Діофлан» та «Детралекс» при рН 4,5**

Час, хв	Rt	Tt	Rt-Tt	(Rt-Tt) ²	$\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2$	n	1/n	f ₂
5	42,20	98,28	-56,08	3145,14	9232,78	4,000	0,2500	184,09
10	55,67	102,36	-46,69	2180,41				
15	59,63	105,71	-46,09	2123,83				
30	68,37	110,60	-42,23	1783,40				

У середовищі розчинення з рН 6,8 досліджувані препарати «Діофлан» та «Детралекс» показали наступні профілі розчинення (рис. 3.3).

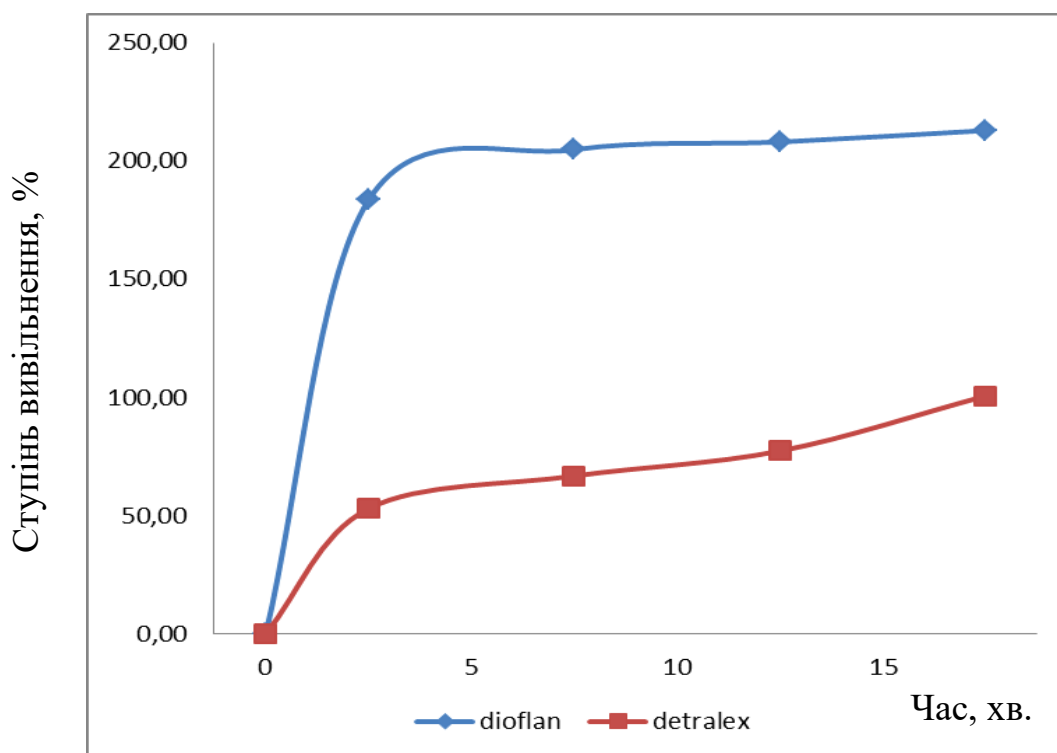


Рис. 3.3. Графік залежності вивільнення діосміну при рН 6,8 для препаратів «Діофлан» та «Детралекс»

При цьому розрахований показник f_2 склав 205,4 (табл. 3.3), що перевищує 50, а, отже, профілі розчинення препаратів «Діофлан» та «Детралекс» у середовищі при рН 6,8 є подібними.

Таблиця 3.3

Розрахунок фактору подібності профілів розчинення препаратів

«Діофлан» та «Детралекс» при рН 6,8

Час, хв	Rt	Tt	Rt-Tt	(Rt-Tt) ²		n	1/n	f_2
5	52,98	183,51	-130,53	17036,83	65776,68	4,000	0,2500	205,40
10	66,80	204,80	-138,00	19044,89				
15	77,35	208,07	-130,72	17088,89				
30	100,64	212,92	-112,28	12606,07				

При порівняльному вивченні профілів розчинення препаратів «Нормовен» та «Детралекс» у середовищах з різними значеннями рН було отримано нижченаведені результати (рис. 3.4-3.6, табл. 3.4-3.6).

Так, у середовищі з рН 1,2 було отримано профілі розчинення «Нормовену» та «Детралексу» представлені на рисунку 3.4.

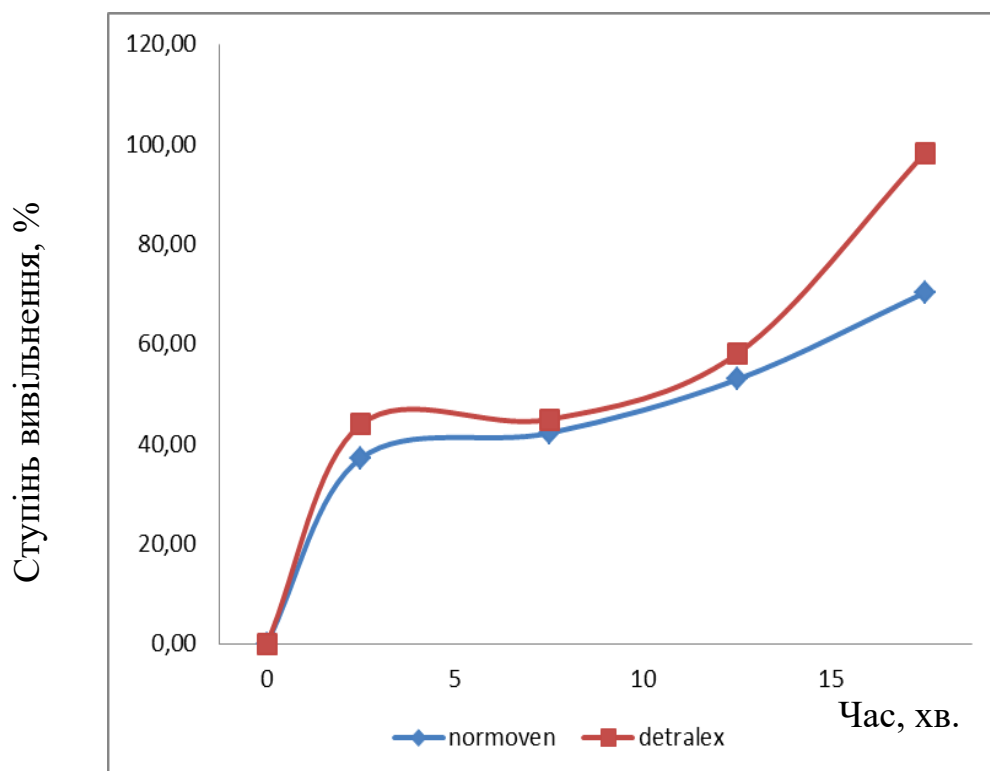


Рис. 3.4. Графік залежності вивільнення діосміну при рН 1,2 для препаратів «Нормовен» та «Детралекс»

При розрахунку фактору подібності f_2 було отримано значення 158,38 (табл. 3.4), що свідчить про подібність профілів розчинення досліджуваних ЛЗ при рН 1,2.

Таблиця 3.4

**Розрахунок фактору подібності профілів розчинення препаратів
«Нормовен» та «Детралекс» при рН 1,2**

Час, хв	Rt	Tt	Rt-Tt	(Rt-Tt) ²	$\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2$	n	1/n	f_2
5	43,88	37,11	6,77	45,85	861,31	4,000	0,2500	158,38
10	44,86	42,12	2,74	7,49				
15	58,02	52,88	5,14	26,47				
30	98,25	70,29	27,96	781,50				

На рисунку 3.5 наведено результати досліджень з вивчення профілів розчинення препаратів «Нормовен» та «Детралекс» при рН 4,5.

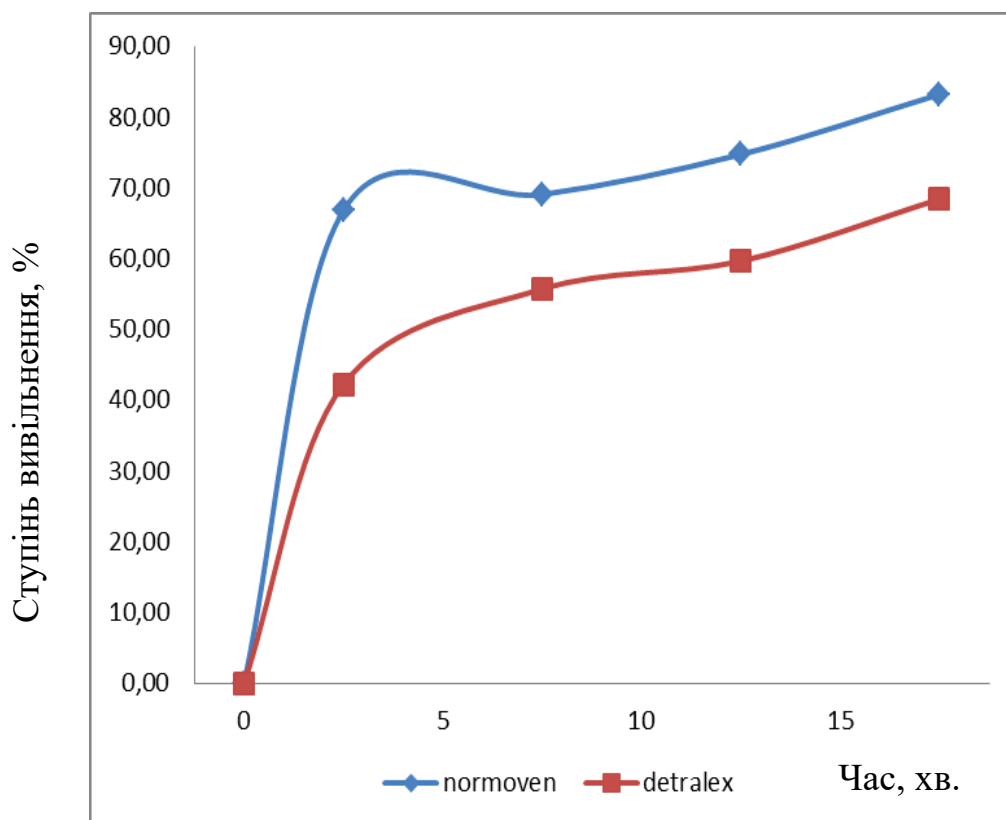


Рис. 3.5. Графік залежності вивільнення діосміну при рН 4,5 для препаратів «Нормовен» та «Детралекс»

При цьому показник f_2 , що було отримано в результаті розрахунків склав 162,24 (табл. 3.5), що дозволяє зробити висновок про подібність профілів розчинення препаратів «Нормовен» та «Детралекс» у середовищі з рН 4,5.

Таблиця 3.5

**Розрахунок фактору подібності профілів розчинення препаратів
«Нормовен» та «Детралекс» при рН 4,5**

Час, хв	Rt	Tt	Rt-Tt	(Rt-Tt) ²		n	1/n	f_2
5	42,20	66,81	-24,61	605,66	1230,71	4,000	0,2500	162,24
10	55,67	69,04	-13,37	178,76				
15	59,63	74,69	-15,07	226,99				
30	68,37	83,18	-14,81	219,31				

У середовищі розчинення з рН 6,8 досліджувані препарати «Нормовен» та «Детралекс» показали нижче наведені профілі розчинення (рис. 3.6).

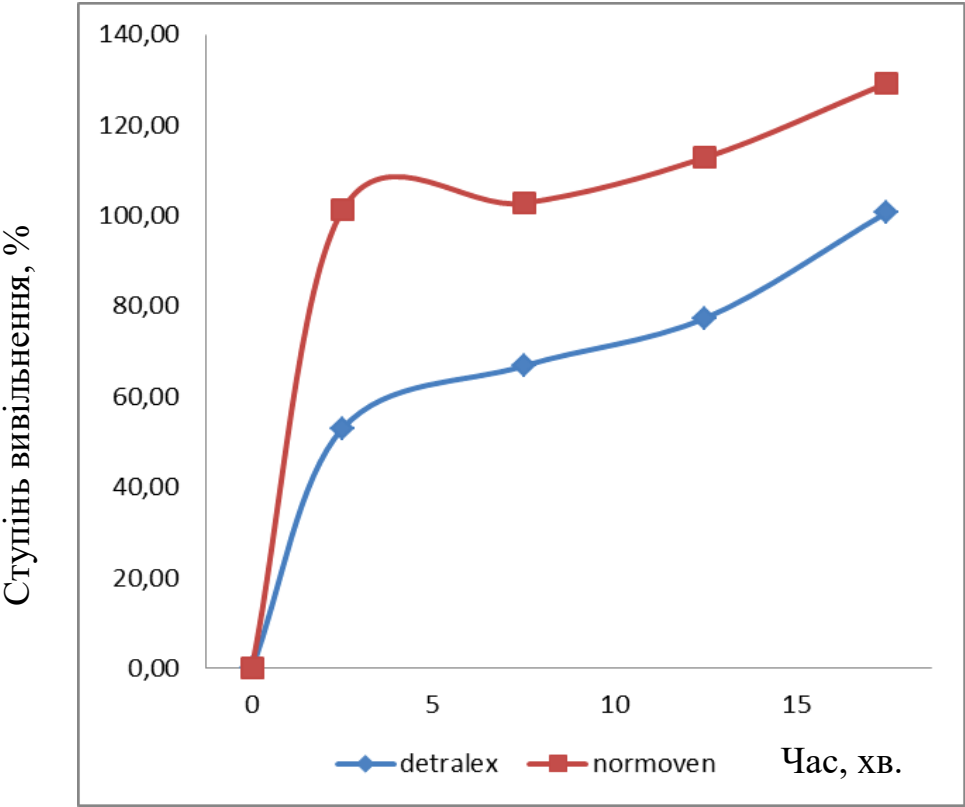


Рис. 3.6. Графік залежності вивільнення діосміну при рН 6,8 для препаратів «Нормовен» та «Детралекс» (Detralex®)

Дані щодо розрахунку фактору f_2 для препаратів «Нормовен» та «Детралекс» при рН 6,8 наведено у таблиці 3.6. Отриманий показник f_2 склав 178,84, що свідчить про подібність профілів розчинення.

Таблиця 3.6

**Розрахунок фактору подібності профілів розчинення препаратів
«Нормовен» та «Детралекс» при рН 6,8**

Час, хв	Rt	Tt	Rt-Tt	(Rt-Tt)2	$\sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2$	n	1/n	f_2
5	52,98	101,23	-48,25	2327,75	5694,25	4,00	0,25	178,84
10	66,80	102,75	-35,95	1292,18				
15	77,35	112,81	-35,46	1257,33				
30	100,64	129,23	-28,58	816,99				

Аналіз отриманих даних свідчить, що профілі розчинення генеричних ЛЗ «Нормовен» та «Діофлан» подібні профілю розчинення референтного препарату «Детралекс» при всіх значеннях рН.

Вищезазначені лікарські засоби мають у своєму складі одну й ту ж активну субстанцію у тієї ж кількості, та з близьким складом допоміжних речовин, однак значення ступеня вивільнення з оригінального і генеричних ЛЗ відрізняються на величину, що перевищує допустиму похибку вимірювань та дорівнює 3%. Виміряна ступінь подрібнення субстанції діосміну китайського виробництва, яка з високою ймовірністю, могла бути використана при виробництві генеричних препаратів, складає за результатами попередніх досліджень для частинок розміром понад 5 мкм більш 94%. Це значення характеризує менше подрібнення китайської субстанції, ніж ступінь подрібнення субстанції використовуваної фірмою «Серв'є» (Франція) для виробництва препарату "Детралекс". Однак ця різниця не може пояснити отриману відмінність виміряних значень вивільнення діосміну з генеричних і оригінального препаратів.

З усього видно, єдиною причиною отриманої відмінності ступеня вивільнення з оригінального і генеричних препаратів є відмінність профілів допоміжних речовин досліджуваних препаратів. Наявність в препаратах генериках таких потужних дезінтегрантів, як лаурилсульфат натрію, бетациклодекстрин, тальк, дозволяє отримувати ступінь вивільнення діосміну не меншу, а іноді і більшу, ніж для оригінального препарату при меншій мірі подрібнення субстанції. Однак, потрібно враховувати той факт, що наявність у складі препаратів генериків цих речовин робить їх менш безпечними для здоров'я пацієнта.

Коефіцієнти подібності f_2 розраховані для розчинення твердих дозованих лікарських форм досліджуваних препаратів, відповідно до Настанови 42-7.3:2020 [34] для всіх значень рН перевищують значення 100, що свідчить про швидке вивільнення діосміну з препаратів в концентраціях, що не перевищують його межу розчинення. Це підтверджує припущення,

зроблене на підставі вимірювань для різних рН значень межі розчинності діосміну, про термодинамічні обмеження розчинності діосміну в водних середовищах і практично повну відсутність дифузійних обмежень. Таким чином, для діосміну швидкість розчинення у водному середовищі в цьому випадку буде обумовлена лише ступенем його подрібнення, що пояснює високий ступінь вивільнення діосміну в препараті Детралекс при більш низькому вмісті дезінтегруючих добавок у порівнянні з препаратами генериками.

Загально відомо, що незмінений діосмін має обмежену розчинність у водному середовищі, завдяки чому й відноситься до IV класу речовин згідно БКС. Однак, використання нового підходу до дослідження кінетики вивільнення речовини, заснованого на використанні мас-спектрометричного методу вимірювань концентрації досліджуваної речовини із застосуванням високо чутливого детектору типу Q-TOF і використанні межі розчинності цієї речовини як граничної межі при розрахунках ступеня вивільнення, дозволило оцінити вивільнення діосміну у водних середовищах з рН 1,2, 4,5 і 6,8.

3.2. Порівняльне мікроскопічне дослідження препаратів діосміну

Для порівняльного дослідження ступеню мікронізації МОФФ, що міститься у препаратах «Детралекс», «Нормовен» та «Діофлан», було проведено мікроскопічне вивчення таблеткового матриксу даних засобів із застосуванням стандартних методів світлопольної мікроскопії. Таблетковий матрикс вивчали після спонтанного розпаду у водному середовищі при $pH=6,8$, що відповідає середовищу тонкого кишківника людини. В ході дослідження за допомогою спеціального програмного забезпечення проводили вимірювання гранул флавоноїдної фракції та розподіляли їх у залежності від розмірів у відсотковому вигляді. Виміри проводили при збільшенні $\times 1000$ у полі зору мікроскопу на 10 мікропрепаратах. Отримані результати наведено у таблиці 3.7.

Таблиця 3.7

Розподіл гранул очищеної флавоноїдної фракції таблеткового матриксу препаратів «Детралекс», «Нормовен» та «Діофлан» у залежності від розміру

Розмір гранул, мкм	Відсоткова частина, %		
	Детралекс	Діофлан	Нормовен
1–5	92,8 $\pm$ 1,0	12,9 $\pm$ 0,6*	10,0 $\pm$ 0,6*
5–10	7,2 $\pm$ 0,9	42,5 $\pm$ 0,8*	68,5 $\pm$ 1,2*
10–20	0	27,7 $\pm$ 0,5*	13,0 $\pm$ 0,6*
20–50	0	15,7 $\pm$ 0,5*	5,2 $\pm$ 0,5*
> 50	0	1,2 $\pm$ 0,2*	3,3 $\pm$ 0,5*

Примітка. * – відмінності вірогідні відносно препарату «Детралекс» ($p \leq 0,05$).

Аналіз мікропрепаратів таблеткового матриксу Детралекса показав, що він утворений мікронізованою флавоноїдною фракцією із переважним

розміром, що не перевищує 5 мкм (рис. 3.7). Розміри більшості гранул, що утворюють фон мікропрепаратів, знаходяться у межах 2 мкм (рис. 3.7-3.11). У мікропрепаратах зустрічаються гранули флавоноїдної фракції, розміри яких наближуються до 10 мкм, але у одиночних випадках (рис. 3.7, 3.8). При цьому дані елементи є складними конгломератами більш дрібних частинок флавоноїдів. Цілісних елементів, що є більше 10 мкм, у жодному з мікропрепаратів таблеткового матриксу Детралекса не спостерігалось (рис. 3.7-3.9, 3.11). Але у деяких випадках були присутні складні гранули більше 10 мкм, які не можна розглядати як окремі цілі частинки (рис. 3.7, 3.8).

Аналіз розподілу частинок матриксу у залежності від розміру показав наступну картину: фракція 1-5 мкм склала 92,8 %, 5-10 мкм – 7,2 %, при цьому гранул із розмірами 10-20 та 20-50 мкм не спостерігалось взагалі (рис. 3.7-3.13, табл. 3.7).

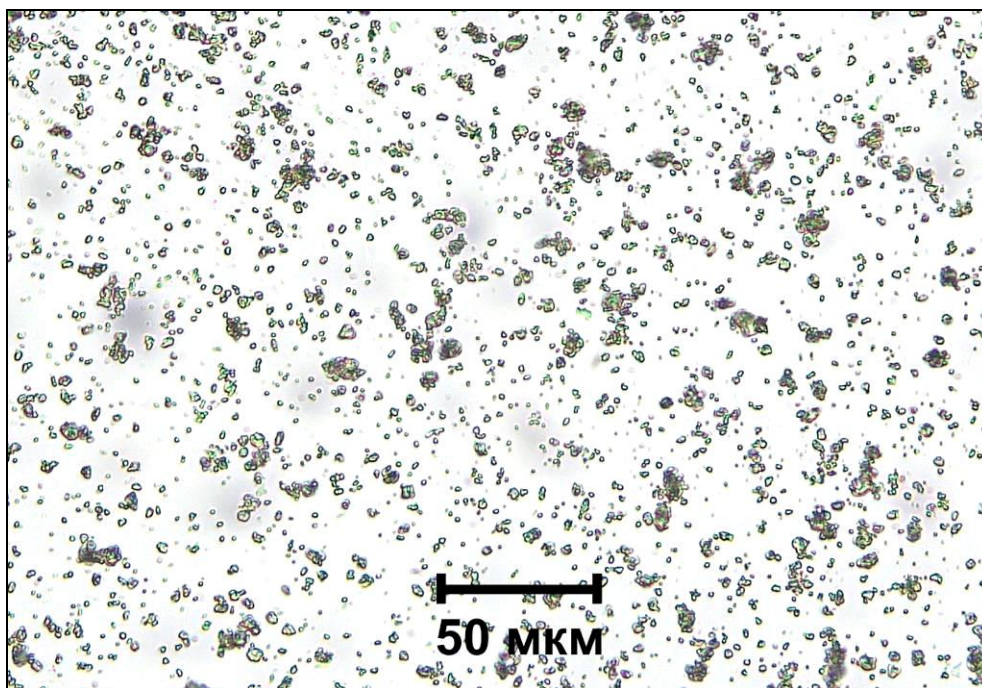


Рис. 3.7. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Детралекс». Велика кількість гранул із розмірами не більше 5 мкм. Одиночні складні частинки із розмірами до 10 мкм. Відсутність елементів більше 10 мкм. Зб. x400

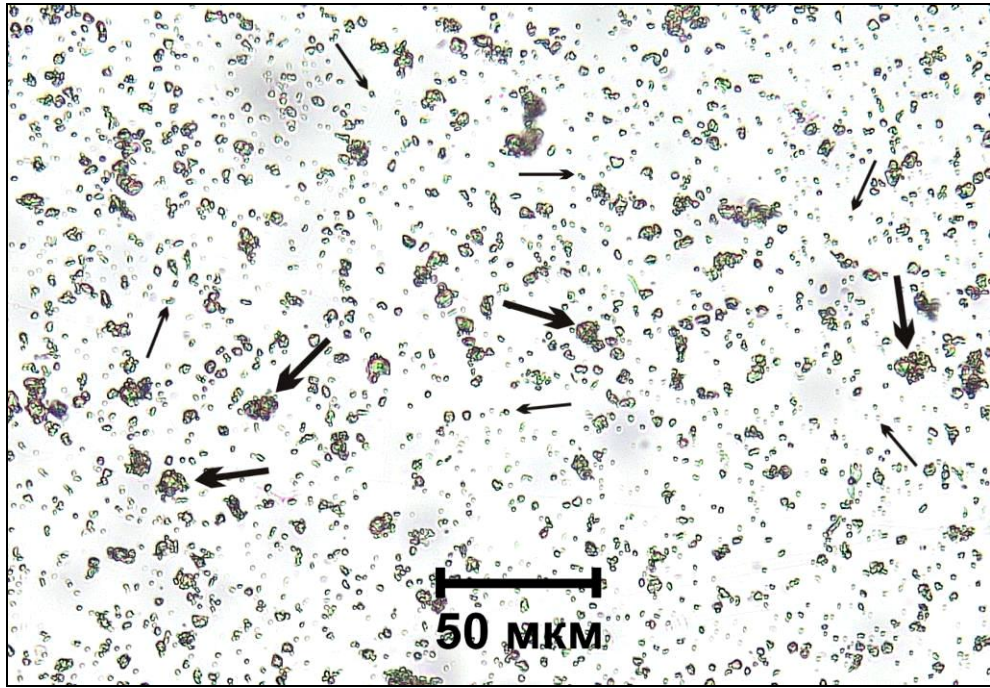


Рис. 3.8. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Детралекс». Гранули флавоноїдної фракції із розмірами 2 мкм, що утворюють фон на все поле зору (тонкі стрілки). Наявність елементів із розмірами близько 10 мкм із конгломератів більш дрібних частинок (товсті стрілки). Зб. x400

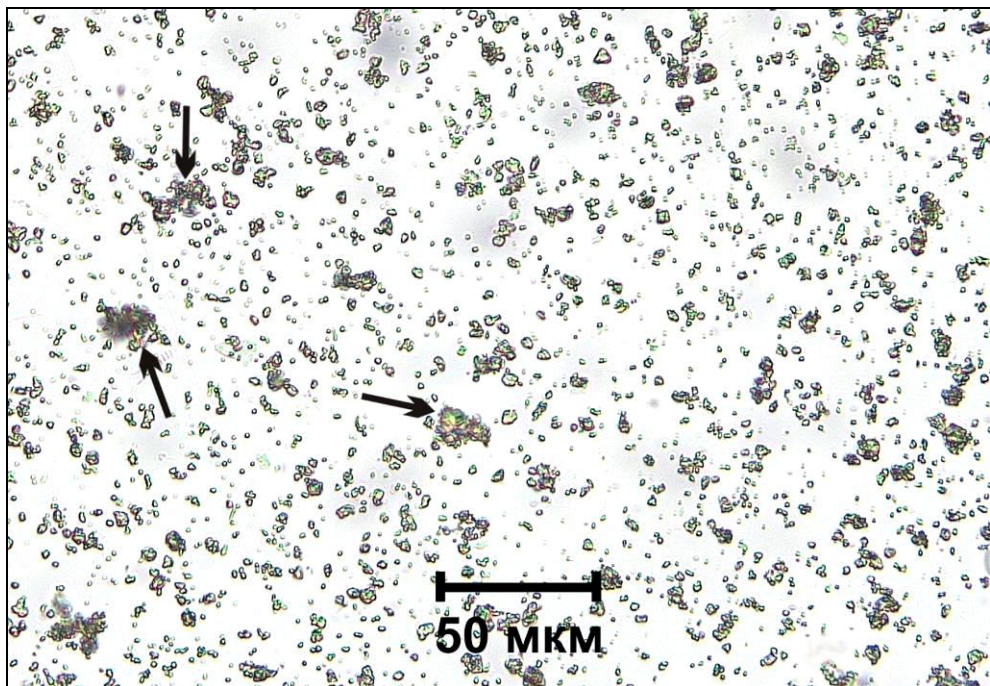


Рис. 3.9. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Детралекс». Складні елементи більше 10 мкм (стрілки). Гранули із розмірами 2 мкм на все поле зору. Зб. х400

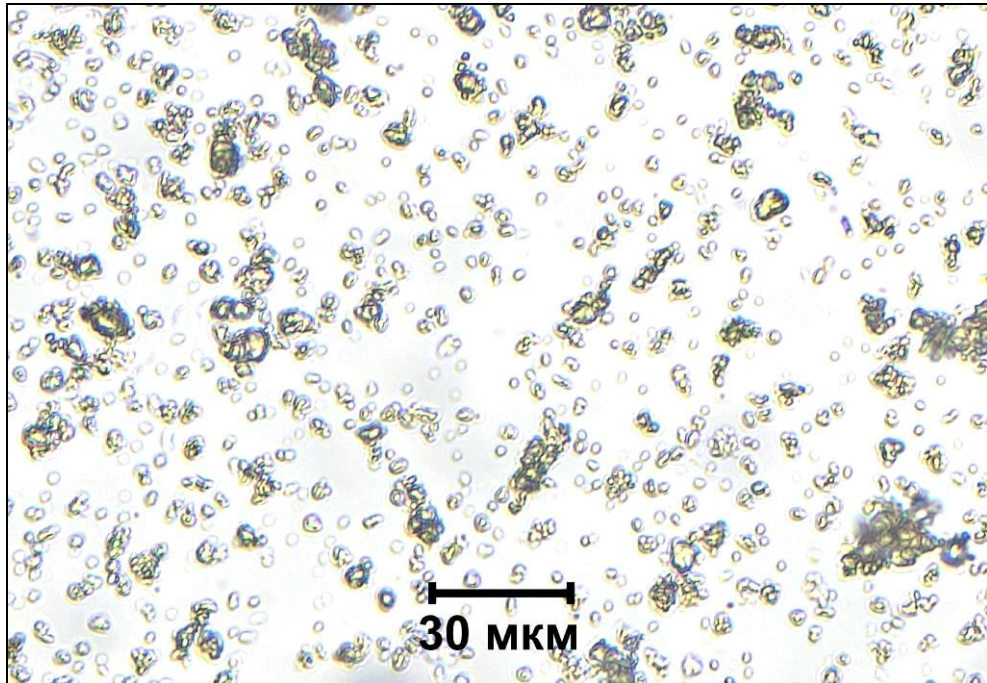


Рис. 3.10. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Детралекс». Велика кількість гранул очищеної флавоноїдної фракції із розмірами 2 мкм. Складні гранули із розмірами близько 20 мкм. Зб. х600

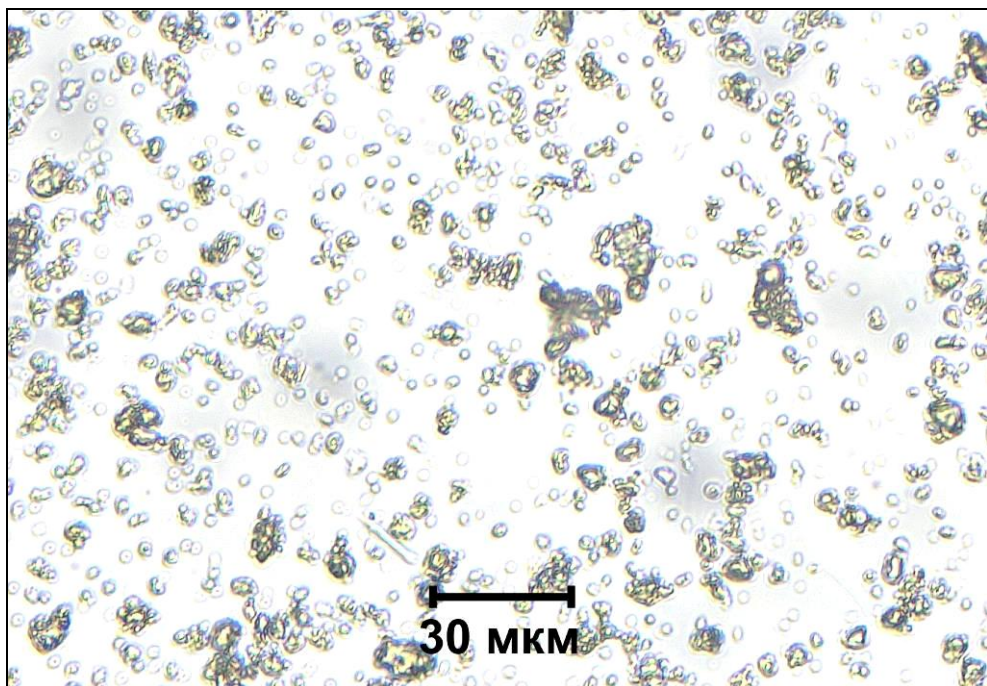


Рис. 3.11. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Детралекс». Дрібні частинки флавоноїдної фракції на все поле зору. Відсутність цілісних елементів більше 10 мкм. Зб. х600

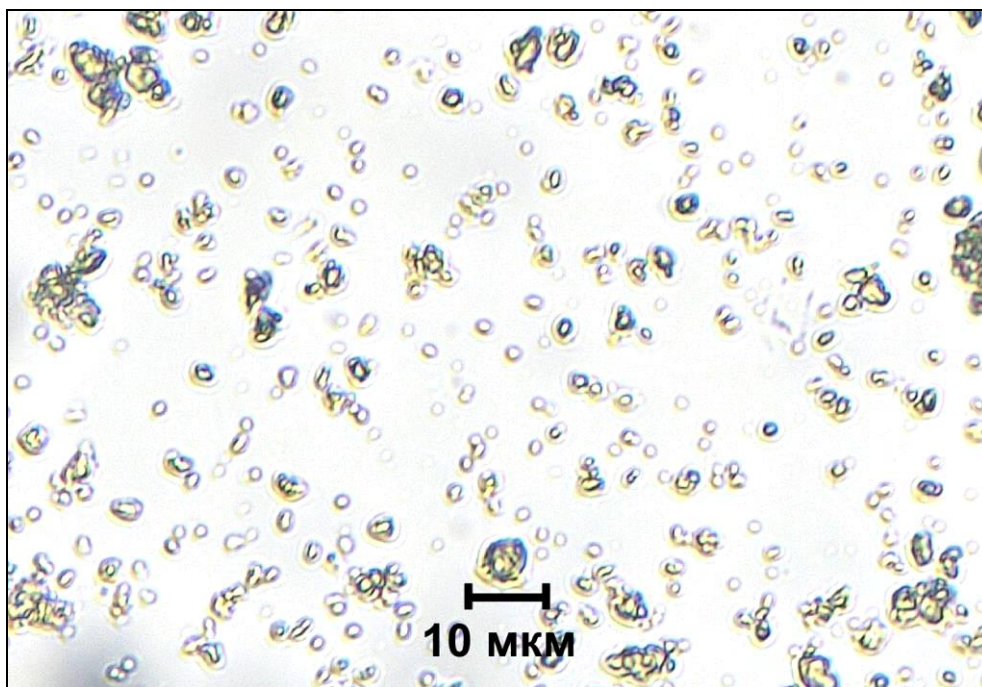


Рис. 3.12. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Детралекс». Гранули очищеної флавоноїдної фракції із розмірами не більше 2 мкм на все поле зору. Незначна кількість частинок 5-10 мкм. Зб. х1000

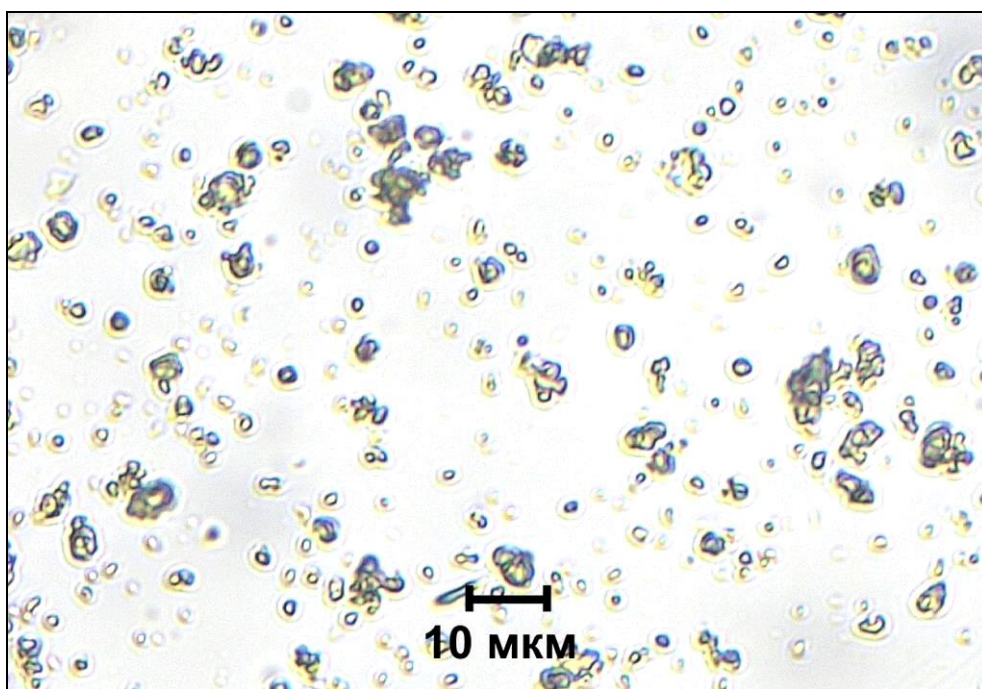


Рис. 3.13. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Детралекс». Переважна більшість частинок менше 2 мкм. Одиначні гранули із розмірами менше 10 мкм. Зб. x1000

Дещо інша картина спостерігається при аналізі мікропрепаратів таблеткового матриксу Діофлану. У більшості зразків спостерігаються окрім дрібної фракції флавоноїдів із розмірами до 5 мкм, велика кількість цілісних гранул у межах від 10 до 50 мкм, а також одиначні величезні гранули понад 50 мкм (рис. 3.14).

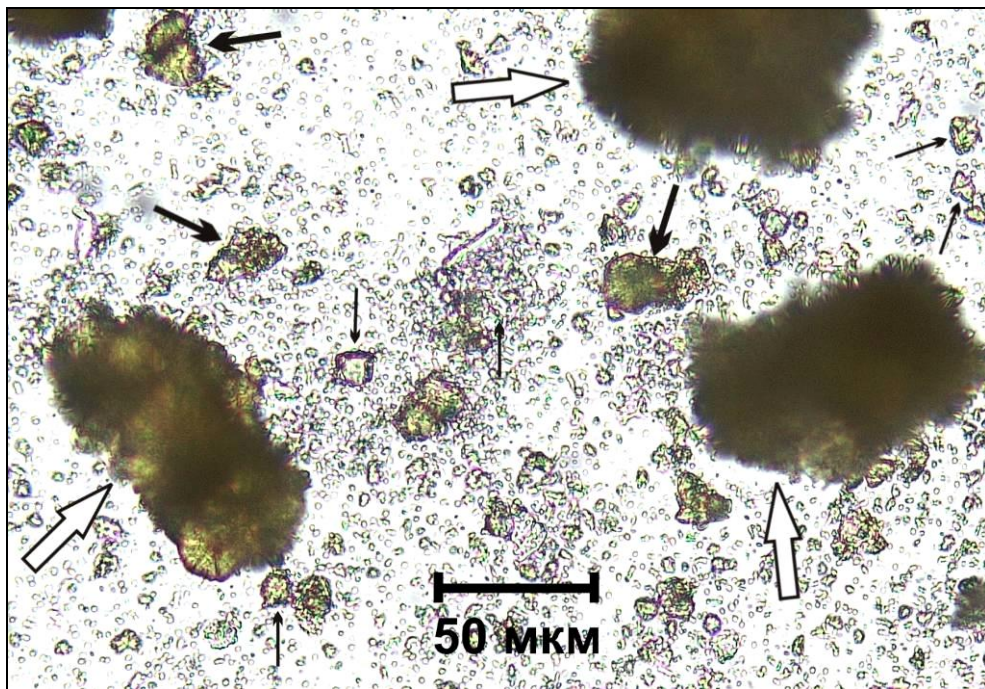


Рис. 3.14. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Діофлан». Дрібна фракція флавоноїдів до 5 мкм на все поле зору. Наявність цілісних гранул 10-20 мкм (тонкі чорні стрілки), 20-30 мкм (товсті чорні стрілки) та понад 50 мкм (білі стрілки). Зб. x400

На деяких мікропрепаратах переважна більшість флавоноїдної фракції має розміри, що знаходяться у межах до 20 мкм, при цьому кількість фракції менше 5 мкм зовсім незначна (рис. 3.15).

Описана картина підтверджується при вивченні мікропрепаратів Діофлана зі збільшенням 600 крат. Спостерігається велика кількість гранул флавоноїдів із розмірами у межах 10-20 мкм. Окрім того виявляються величезні частинки із розмірами близько 50 мкм та навіть більше (рис. 3.16, 3.17). На деяких мікропрепаратах спостерігається дрібна фракція із розмірами близько 5 мкм на все поле зору (рис. 3.18).

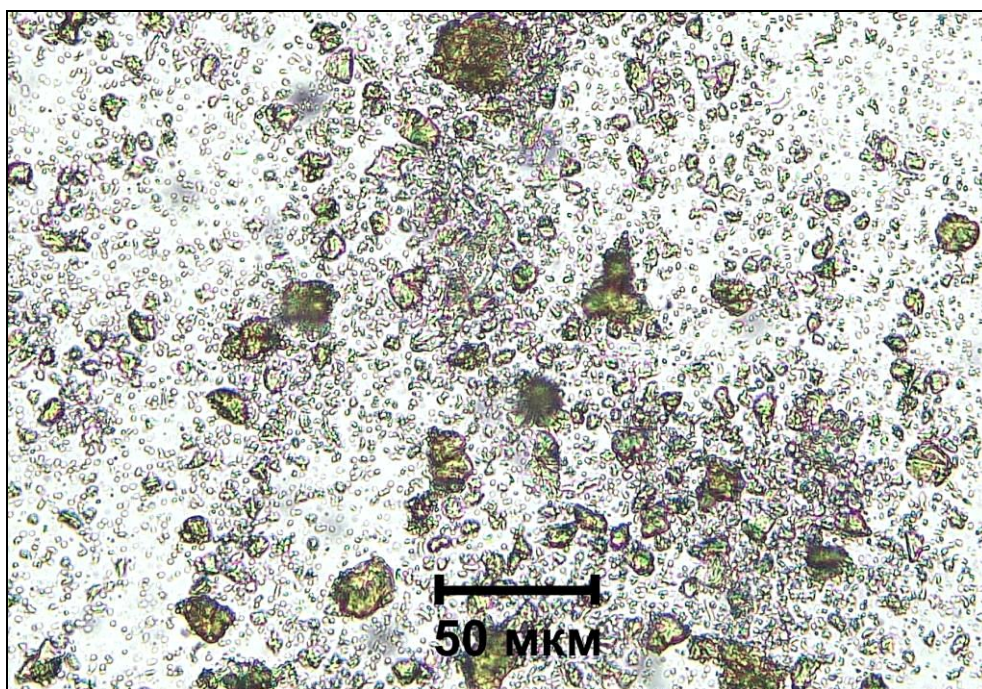


Рис. 3.15. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Діофлан». Більшість частинок із розмірами у межах 10-20 мкм. Зб. x400

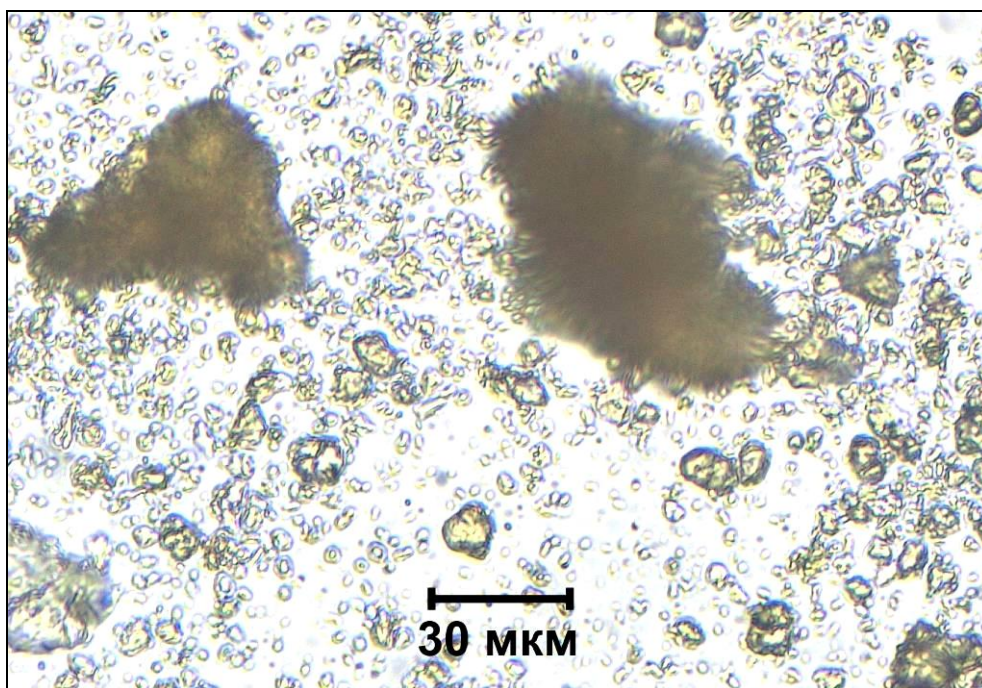


Рис. 3.16. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Діофлан». Дрібна фракція до 5 мкм на все поле зору. Велика кількість гранул 10-20 мкм. Одиночні гранули понад 30 мкм. Зб. х600

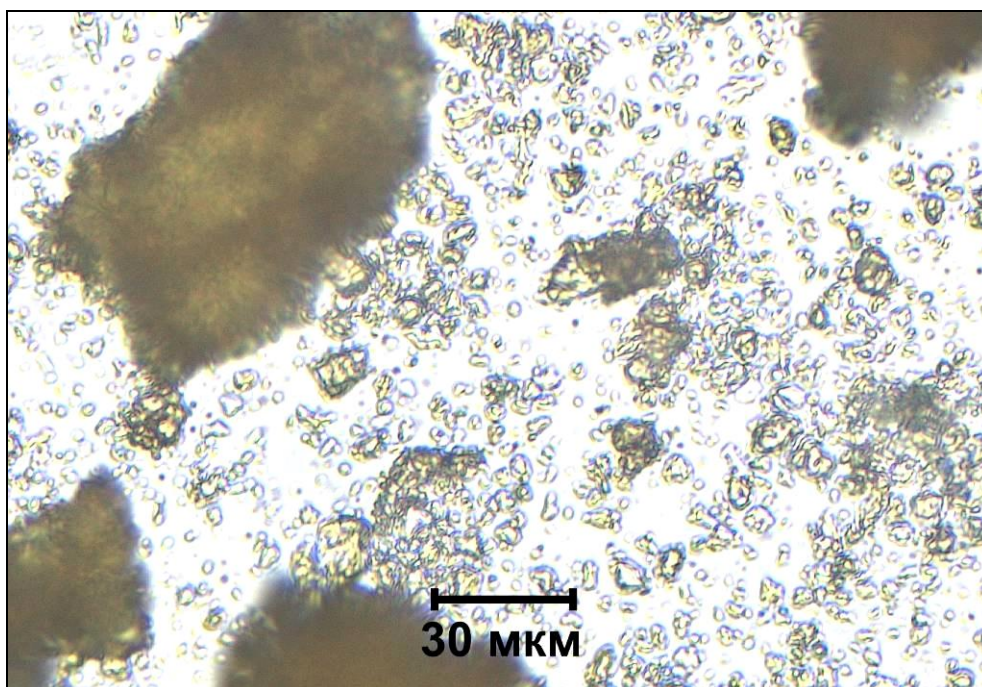


Рис. 3.17. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Діофлан». Переважна більшість гранул із розмірами 10-20 мкм. Наявність гігантських гранул із розмірами понад 50 мкм. Зб. х600

При вивченні мікропрепаратів Діофлана за умов максимального збільшення – 1000 крат, було виявлено, що найдрібніша фракція таблеткового матриксу складається переважно із частинок із розмірами понад 2 мкм, що є корінною відмінністю від Детралекса. При цьому більшість гранул мають розміри 5-10 мкм (рис. 3.17, 3.18).

При підрахунку розподілу частинок таблеткового матриксу у залежності від розміру було виявлено наступні результати: фракція 1-5 мкм склала 12,9 %, 5-10 мкм – 42,5 %, 10-20 мкм – 27,7 %, 20-50 мкм – 15,7 % та понад 50 мкм – 1,2 % (рис. 3.18, 3.19, табл. 3.7). Отримані результати статистично вірогідно відрізняються від результатів вивчення таблеткового матриксу препарату «Детралекс» та свідчать про різну ступінь та якість процесу мікронізації при виробництві даних засобів.

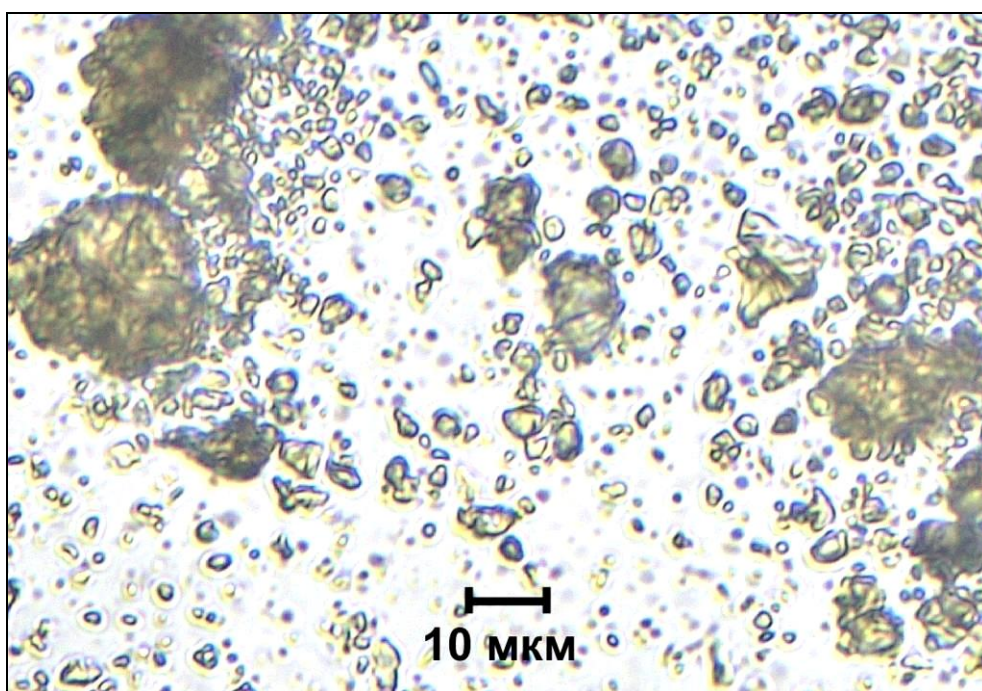


Рис. 3.18. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Діофлан». Скупчення частинок із розмірами 5-10 мкм. Гранули менше 2 мкм практично відсутні. Наявність цілісних гранул із розмірами понад 30 мкм. Зб. x1000

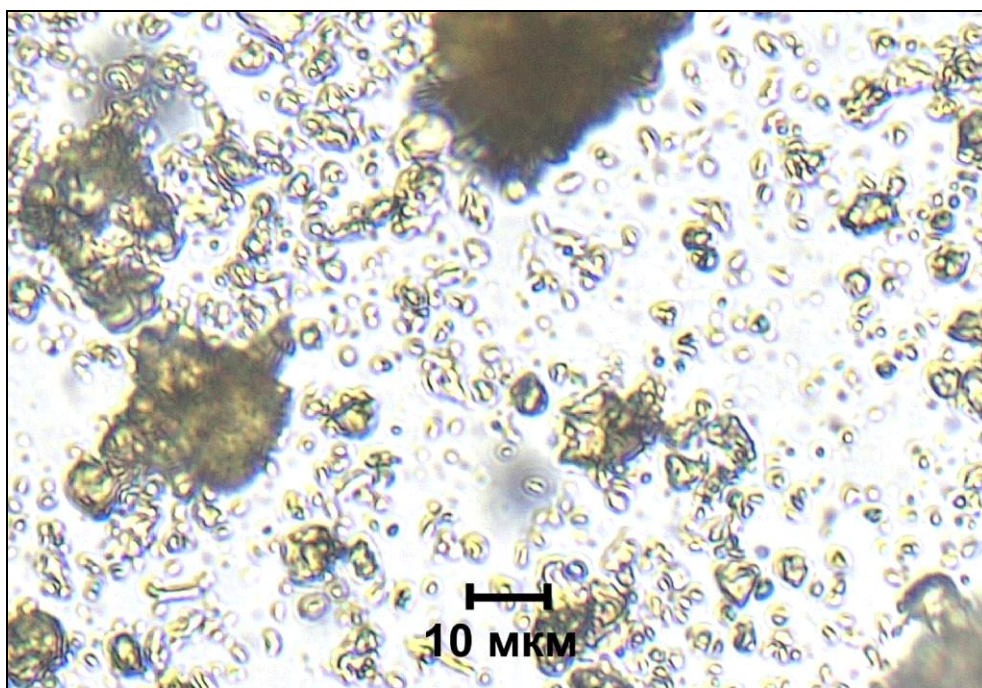


Рис. 3.19. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Діофлан». Переважна більшість гранул із розмірами 5-10 мкм. Невелика кількість частинок менше 2 мкм. Зб. x1000

При мікроскопічному вивченні таблеткового матриксу препарату «Нормовен» спостерігалась ситуація аналогічна тест-зразкам препарату «Діофлан». Так на мікропрепаратах при збільшенні x400 виявлялась велика кількість фракції флавоноїдів із розмірами 5-10 мкм при незначному вмісті фракції 2 мкм та наявністю гігантських гранул із розмірами понад 50 мкм (рис. 3.20, 3.21). Все це відрізняє структуру очищеної флавоноїдної фракції Детралекса та Нормовена.

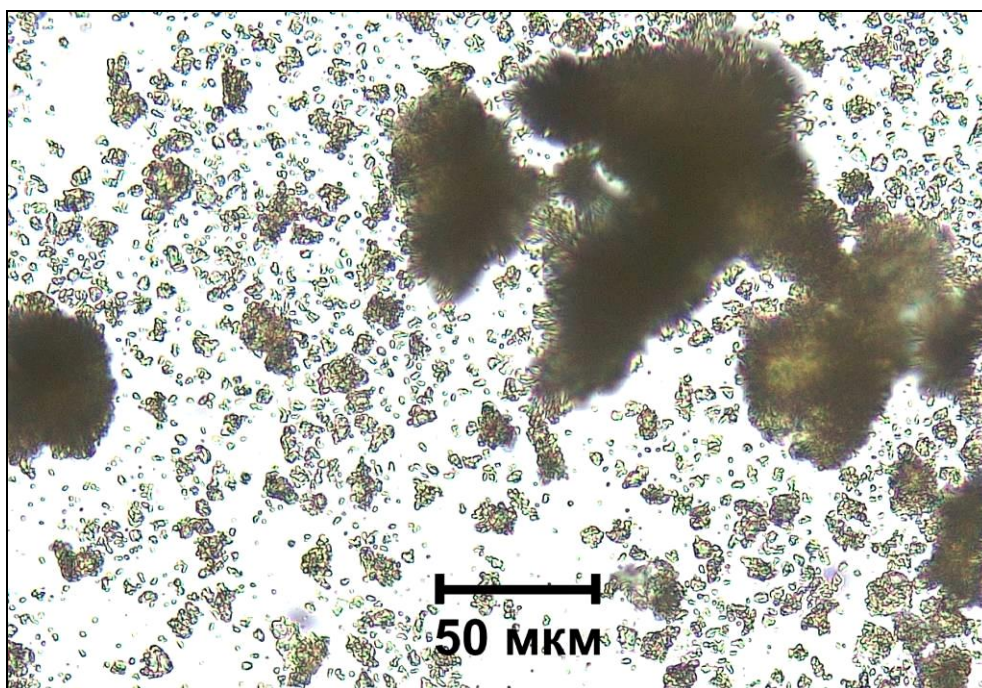


Рис. 3.20. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Нормовен». Частинки із розмірами 5-10 мкм на все поле зору. Практично повна відсутність гранул менше 2 мкм. Гігантські цілісні гранули більше 50 мкм. Зб. x400

Практично повна відсутність найдрібнішої фракції флавоноїдів – 2 мкм та менше також підтверджується при вивченні мікропрепаратів Нормовену за умов більшого збільшення – 600 крат. Переважна більшість частинок на цих мікропрепаратах мають розміри 5-10 мкм (рис. 3.21). При цьому зустрічаються більш великі гранули 10-20 мкм та 30 мкм й більше.

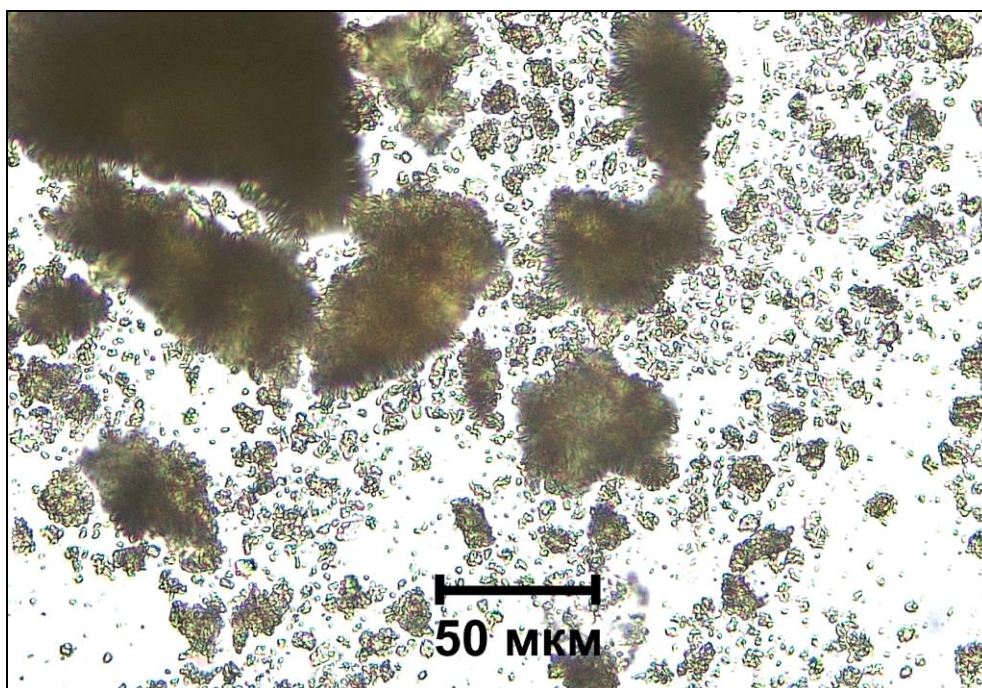


Рис. 3.21. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Нормовен». Велика кількість гранул 50 мкм і більше. Дрібна фракція переважно розміру 5-10 мкм. Зб. х400

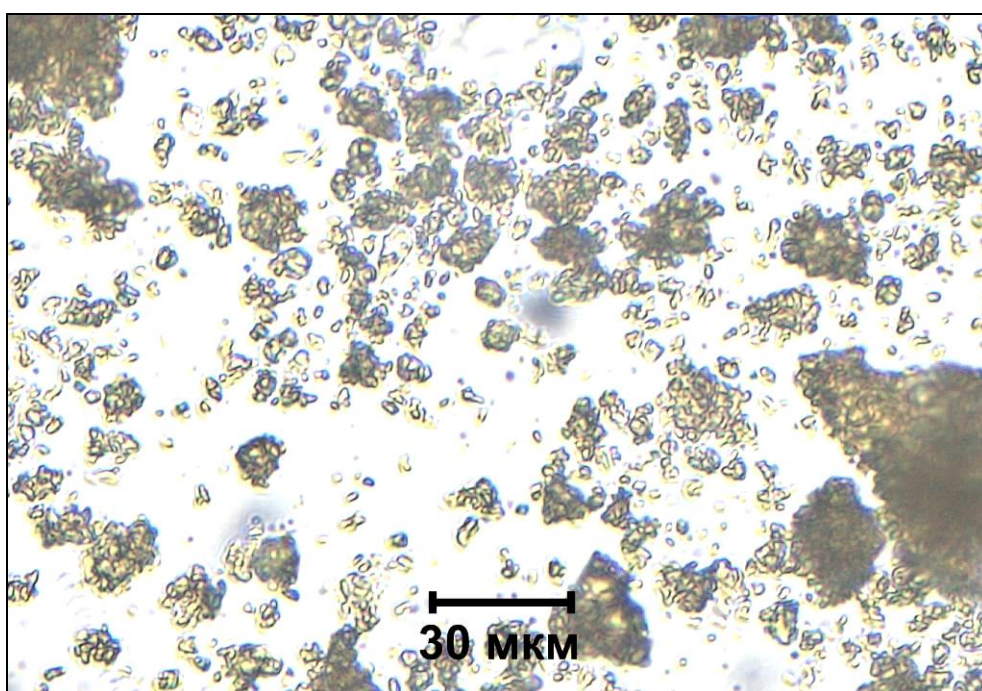


Рис. 3.22. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Нормовен». Велика кількість частинок 5-10 мкм. Наявність гранул із розмірами понад 30 мкм. Зб. х600

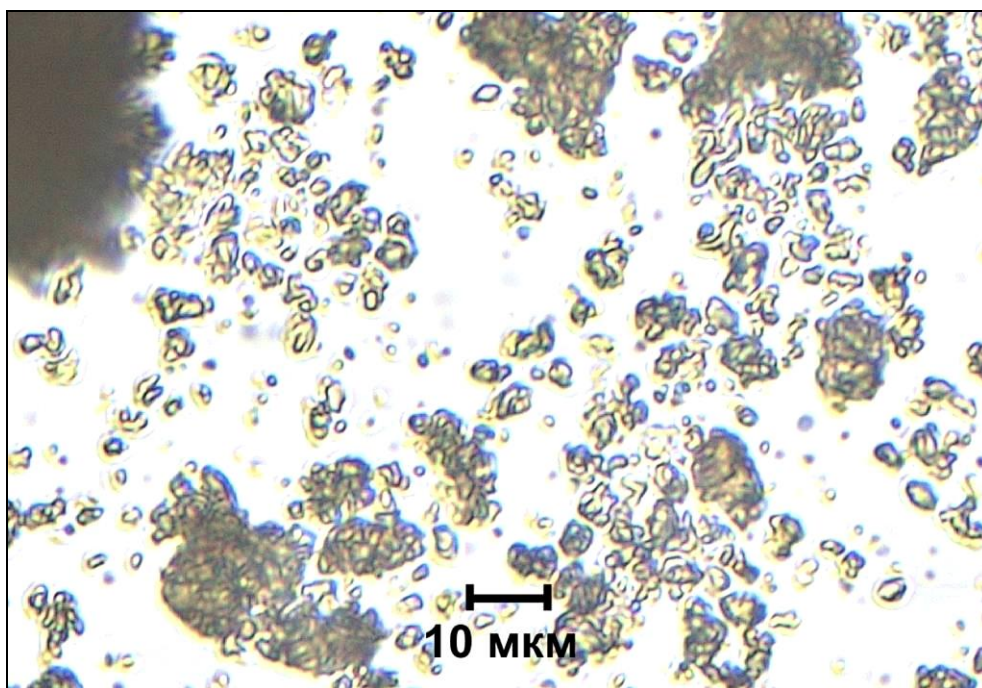


Рис. 3.23. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Нормовен». Переважна більшість гранул 5-10 мкм. Частинки із розмірами понад 10 мкм. Зб. x1000

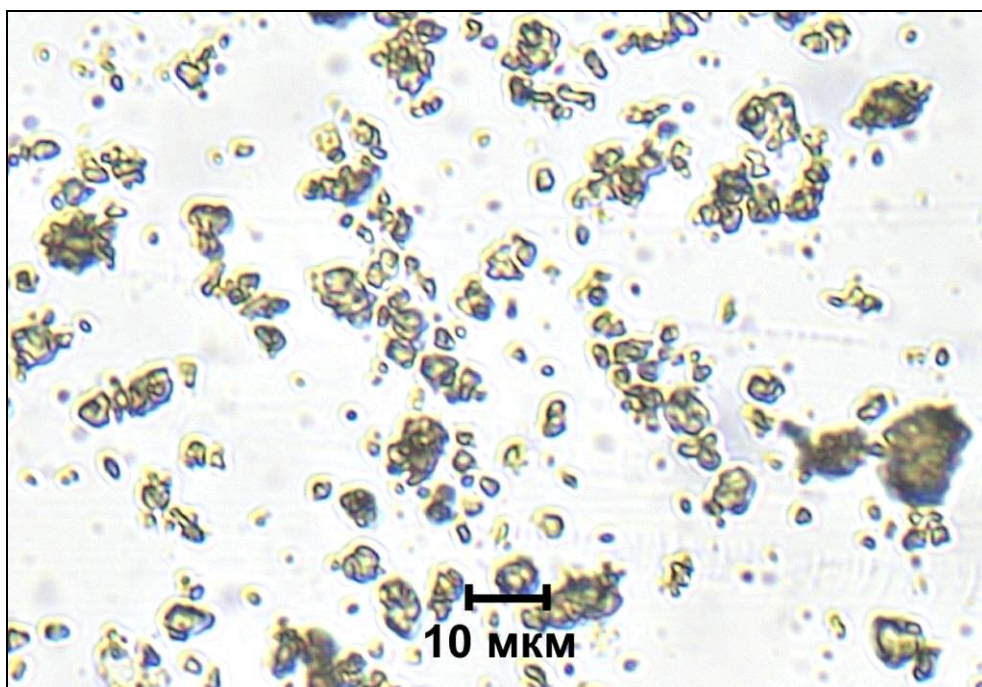


Рис. 3.24. Мікропрепарат таблеткового матриксу препарату «Нормовен». Переважна більшість гранул 5-10 мкм. Незначна кількість дрібної фракції флавоноїдів менше 5 мкм. Зб. x1000

Результати аналізу розподілу частинок матриксу Нормовену у залежності від розміру свідчать про наступне: фракція 1-5 мкм склала 10,0 %, 5-10 мкм – 68,5 %, 10-20 мкм – 13,0 %, 20-50 мкм – 5,2 % та понад 50 мкм – 3,3 % (рис. 3.22-3.24, табл. 3.7). Представлені результати свідчать про статистичні відмінності розмірів частинок очищеної флавоноїдної фракції таблеткового матриксу препаратів «Детралекс» та «Нормовен», що говорить про різну якість мікронізації даних засобів та незаперечні переваги Детралекса.

Таким чином, в результаті мікроскопічного вивчення таблеткового матриксу тест-зразків препаратів «Детралекс», «Діофлан» та «Нормовен» було визначено різний ступінь мікронізації МОФФ у складі даних засобів. Найвищий ступінь мікронізації, а, отже, й найдрібніший розмір частинок флавоноїдів, що склав переважно 2 мкм, було виявлено при аналізі таблеткового матриксу Детралекса.

Отримані результати свідчать про те, що належна й якісна мікронізація виконується тільки при виробництві препарату «Детралекс», а препарати «Нормовен» та «Діофлан» не є йому повністю еквівалентними з фармацевтичної точки зору і їх не можна розглядати як генерики Детралекса без додаткових досліджень з біоеквівалентності. Також неприпустимо екстраполювати на них дані щодо ефективності й безпеки, отримані при доклінічному й клінічному вивченні Детралекса.

Висновки до розділу 3.

1. Результати досліджень з розчинення препаратів «Детралекс», «Діофлан» та «Нормовен» свідчать про різний ступінь вивільнення діосміну з оригінального препарату та препаратів-копій, який відрізняється на величину, що перевищує допустиму похибку вимірювань та дорівнює 3%, незважаючи на схожість профілів розчинення даних засобів за коефіцієнтами подібності f_2 при всіх значеннях рН.

2. Основною причиною відмінностей у ступені вивільнення діосміну з оригінального препарату «Детралекс» та препаратів-копій є різниця у ступені мікронізації МОФФ та профілях допоміжних речовин. Високий ступінь вивільнення діосміну з «Детралексу» пояснюється лише високим ступенем його мікронізації, в той час, як у препаратів-копій це обумовлено високим вмістом дезінтегруючих добавок, таких як лаурилсульфат натрію, бетациклодекстрин й тальк, що безумовно негативно віддзеркалюється на профілі безпеки даних засобів.

3. З урахуванням протиріч у отриманих результатах досліджень щодо вивчення кінетики розчинення генеричних ЛЗ «Діофлан» та «Нормовен» у порівнянні з оригінальним препаратом «Детралекс», запропоновану модифікацію методу доведення еквівалентності *in vitro* згідно БКС для речовин IV класу не доцільно розглядіти як оптимальну та самодостатню методику, що потребує розробки та доручення альтернативних методів оцінки еквівалентності *in vitro*.

4. Результати проведених мікроскопічних досліджень дозволили заключити, що:

- таблетковий матрикс тест-зразків препаратів «Детралекс», «Діофлан» та «Нормовен» має різний ступінь мікронізації МОФФ у складі даних засобів; при цьому більшість частинок флавоноїдів Детралекса мала розмір до 5 мкм (92,8 %), Нормовена – 5-10 мкм (68,5 %), а Діофлана – 5-10 мкм (42,5 %) та 10-20 мкм (27,7 %);

- при мікроскопічному аналізі таблеткового матриксу препарату «Детралекс» було виявлено найвищий ступінь мікронізації МОФФ (розмір частинок флавоноїдів склав переважно 2 мкм), що свідчить про безумовні переваги даного засобу;
- різний ступінь мікронізації МОФФ у складі вивчених тест-зразків свідчить про те, що препарати «Нормовен» та «Діофлан» не є повністю фармацевтично еквівалентними оригінальному препарату «Детралекс» і їх не можна розглядати як генерики без додаткових досліджень з біоеквівалентності;
- результати проведених досліджень свідчать про неприпустимість екстраполявання даних щодо ефективності й безпеки, отриманих при доклінічному й клінічному вивченні Детралекса, на Діофлан та Нормовен.

5. Запропонована альтернативна методика оцінки еквівалентності *in vitro*, розроблена на основі мікроскопічного аналізу таблеткового матриксу лікарських форм, виявила свою ефективність і може застосовуватись як додатковий метод доведення еквівалентності для речовин IV класу за БКС у випадку отримання сумнівних результатів.

ВИСНОВКИ

1. Препарати IV класу за БКС є самими проблемними об'єктами для доведення еквівалентності, оскільки погано розчинюються у водному середовищі та погано всмоктуються у шлунково-кишковому тракті. Тому їх еквівалентність рекомендується вивчати лише за допомогою методів *in vivo*, які є більш витратними, ризиковими та тривалішими. Це обумовлює актуальність використання модифікованих підходів до проведення випробувань *in vitro* для оцінки еквівалентності препаратів цього класу або застосування додаткових альтернативних методів досліджень.

2. Препарати діосміну є типовими представниками IV класу за БКС, оскільки виявляють низьку розчинність та низький ступінь проникності. Застосування мікронізації флавоноїдної фракції у технології виробництва препаратів даної групи, дещо покращують характеристики їх проникності, що наближує їх до III класу речовин за БКС та збільшує можливості застосування методів *in vitro* для оцінки еквівалентності.

3. Результати досліджень з розчинення препаратів «Детралекс», «Діофлан» та «Нормовен» свідчать про різний ступінь вивільнення діосміну з оригінального препарату та препаратів-копій, незважаючи на схожість профілів розчинення даних засобів за коефіцієнтами подібності f_2 при всіх значеннях рН.

4. Основною причиною відмінностей у ступені вивільнення діосміну з оригінального та генеричних препаратів є різниця у ступені мікронізації та профілях допоміжних речовин. Високий ступінь вивільнення діосміну з оригінального ЛЗ «Детралексу» пояснюється лише високим ступенем його мікронізації, в той час, як у препаратів-копій це обумовлено високим вмістом дезінтегруючих добавок, таких як лаурилсульфат натрію, бетациклодекстрин й тальк.

5. З урахуванням протиріч у отриманих результатах запропоновану модифікацію методу доведення еквівалентності *in vitro* згідно БКС для

речовин IV класу, використану для оцінки еквівалентності препаратів діосміну, не доцільно розглядати як оптимальну та самодостатню методику, що потребує розробки та залучення альтернативних методів оцінки еквівалентності *in vitro*.

6. В результаті мікроскопічного вивчення таблеткового матриксу препаратів діосміну було визначено різний ступінь мікронізації очищеної флавоноїдної фракції у складі даних засобів. При цьому більшість частинок флавоноїдів «Детралексу» мала розмір до 5 мкм (92,8 %), «Нормовену» – 5-10 мкм (68,5 %), а «Діофлану» – 5-10 мкм (42,5 %) та 10-20 мкм (27,7 %). Найвищий ступінь мікронізації було виявлено при мікроскопічному аналізі препарату «Детралекс» (розмір частинок флавоноїдів склав переважно 2 мкм), що свідчить про безумовні переваги даного засобу.

7. Отримані результати свідчать про те, що препарати «Нормовен» та «Діофлан» не є повністю фармацевтично еквівалентними оригінальному препарату «Детралекс» і їх не можна розглядати як генерики без додаткових досліджень з оцінки еквівалентності. Також недоцільним є екстраполявання даних щодо ефективності й безпеки, отриманих при доклінічному й клінічному вивченні оригінального препарату «Детралекс», на препарат-копії «Діофлан» та «Нормовен».

8. Запропонована альтернативна методика оцінки еквівалентності *in vitro*, розроблена на основі мікроскопічного аналізу таблеткового матриксу лікарських форм, виявила свою ефективність і може застосовуватись як додатковий метод доведення еквівалентності для речовин IV класу за БКС у випадку отримання сумнівних результатів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Holl K. Master of Drug Regulatory Affairs. Ther. 2019. Vol. 74. P. 6-19.
2. Amidon G.L., Lennernas H., Shah V.P., Crison J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. The AAPS Journal. 2014 Vol. 16. P. 894-898.
3. Attari Z., Kalvakuntla S., Sreenivasa Reddy M., Deshpande M., Mallikarjuna R. C., Koteswara K.B. Formulation and characterisation of nanosuspensions of BCS class II and IV drugs by combinative method. Jorنال of Experimental Nanoscience. 2016. Vol 11. P 276-288.
4. Ghadi R., Dand N. BCS class IV drugs: Higly notorious candidates for formulation development. Journal of Controlled Release. 2017. Vol. 248. P. 71-95.
5. Use of multiresponse statistical techniques to optimize the separation of diosmin, hesperidin, diosmetin and hesperitin in different pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography with UV-DAD / S. Sammania, S. Clavijoc, L. Portugala et al. Talanta. 2017. Vol. 167. P. 695–702.
6. Гризодуб А.И. Стандартизированные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. Харьков: Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств». 2016. – 396 с
7. Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. U.S. Departament of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Washington, DC: U.S. Government Printing Office. 2015.

8. DIOSVEINT"" brand of DIOSMIN (CAS 520-27-4) Режим доступу: <https://www.fda.gov/ohrms/dockets/DOCKETS/95s0316/95s-0316-rpt0358-02-Submission-for-Diosmin-vol280.pdf>
9. Szymański M., Młynarek D., Szymański A., Matławska I. Simultaneous Determination of Diosmin and Hesperidin in Pharmaceuticals by RPLC using Ionic Liquids as Mobile Phase Modifiers. *Iran. J. Pharm. Res.* 2016. Vol. 15. P. 141–148.
10. Lewin G., Maciuk A., Moncomble A., Cornard J.-P. Enhancement of the Water Solubility of Flavone Glycosides by Disruption of Molecular Planarity of the Aglycone Moiety. *J. Nat. Prod.* 2013. V. 76. P. 8–12.
11. Diosmin Attenuates Methotrexate-Induced Hepatic, Renal, and Cardiac Injury: A Biochemical and Histopathological Study in Mice / M.M. Abdel-Daim, H.A. Khalifa, A.I. Abushouk et al. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. Режим доступу: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/3281670/>
12. Diosmin-induced senescence, apoptosis and autophagy in breast cancer cells of different p53 status and ERK activity / A. Lewinska, J. Adamczyk-Grochala, E. Kwasniewicz et al. *Toxicol. Lett.* 2017. Vol. 265. P. 117–130.
13. Diosmin reduces chronic constriction injury-induced neuropathic pain in mice / M. M. Bertozzi, A. C. Rossaneis, V. Fattori et al. *Chem. Biol. Interact.* 2017. Vol. 273. P. 180–189.
14. Головенко М.Я., Баула О.П., Борисюк І.Ю. Біофармацевтична класифікаційна система. 2010. 310 с.
15. Katsenis, K. M. Antiproliferative Activities of Citrus Flavonoids against Six. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2005. Vol. 3, P. 1–9.
16. Paysant J., Sansilvestri-Morel P., Bouskela E., Verbeuren T.J. Different flavonoids present in the micronized purified flavonoid fraction (Daflon 500 mg) contribute to its anti-hyperpermeability effect in the hamster cheek pouch microcirculation. *Int. Angiol.* 2008. Vol. 27. P. 81–85.
17. Micronization enhances the protective effect of purified flavonoid fraction against postischaemic microvascular injury in the hamster cheek pouch /

- F.Z. Cyrino, D.A Bottino, L. Lerond, E. Bouskela. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2004. Vol. 31. P. 159–162.
18. Lyseng-Williamson K.A., Perry C.M., Lyseng-Williamson K.A., Perry C.M. Micronised Purified Flavonoid Fraction. A Review of its Use in Chronic Venous Insufficiency, Venous Ulcers and Haemorrhoids. Drugs. 2003. V. 63. P. 71–100.
 19. Monography Diosmin – Monograph. Altern. Med. Rev. 2017. Vol. 9. P. 308–311.
 20. Toledo R.R., Rennó de Castro Santos M.E., Brandão- Schnaider T.R. Effect of Pycnogenol on the Healing of Venous Ulcers. An. Vascular surgery. 2017. Vol. 38. P. 212–219.
 21. Kumar S., Pandey A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. ScientificWorldJournal. 2013. Режим доступа: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/162750/>.
 22. Can Micronized Purified Flavonoid Fraction (MPFF) improve outcomes of lower extremity varicose vein endovenous treatment? First results from the decision study / V. Yu. Bogachev, O. V. Golovanova, A. N. Kuznetsov et al. Phlebology. 2013. Vol. 20. P. 181–184.
 23. Sabarimuthu S.Q., Ponnian S.M.P., John B. Diosmin prevents left ventricular hypertrophy, adenosine triphosphatases dysfunction and electrolyte imbalance in experimentally induced myocardial infarcted rats. Eur. J. Pharmacol. 2017. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28768146/>.
 24. Hasan H.F., Abdel-Rafei M.K., Galal S.M. Diosmin attenuates radiation-induced hepatic fibrosis by boosting PPAR- γ expression and hampering miR-17-5p-activated canonical Wnt- β -catenin signaling. Biochem. Cell Biol. 2017. Vol. 95. P. 400–414.
 25. Dholakiya S.L., Benzeroual K.E. Protective effect of diosmin on LPS-induced apoptosis in PC12 cells and inhibition of TNF- α expression. Toxicol In Vitro. 2011. Vol. 25. P. 1039–1044.

26. Patel K., Gadewar M., Tahilyani V., Patel D.K. A review on pharmacological and analytical aspects of diosmetin: a concise report. *Chin. J. Integr. Med.* 2013. Vol. 19. P. 792–800.
27. Державна Фармакопея України: в 3 т. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.
28. Manthey J.A., Guthrie N. Antiproliferative Activities of Citrus Flavonoids against Six. *J. Agric. Food Chem.* 2002. № 50. P. 5837–5843.
29. «Порядок проведення експертизи матеріалів на лікарські засоби, що подаються на державну реєстрацію (перереєстрацію), а також експертизи матеріалів про внесення змін до реєстраційних матеріалів протягом дії реєстраційного посвідчення» Наказ МОЗ України № 426 від 26.08.2005.
30. «Порядок проведення додаткових випробувань лікарських засобів при проведенні експертизи реєстраційних матеріалів» Наказ МОЗ України № 190 від 17.08.2007.
31. European Pharmacopoeia. 9th ed., 9.0. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2017. Electronic version.
32. Islam M. A., Al-Shiha A. Foundations of biostatistics. Singapore : Springer, 2018. 474 p.
33. Pagano M., Gauvreau K. Principles of biostatistics. Boca Raton : CRC Press, 2018. 584 p.
34. Лікарські засоби. Дослідження біоеквівалентності : Настанова СТ-Н МОЗУ 42-7.3:2020. К. : МОЗ України, 2020. 92 с.

Національний фармацевтичний університет

Факультет медико-фармацевтичних технологій
Кафедра клінічної фармакології та клінічної фармації
Ступінь вищої освіти другий магістерський
Спеціальність 226 Фармація, промислова фармація
Освітня програма Клінічні дослідження

ЗАТВЕРДЖУЮ
В.о. завідувачки
кафедри
клінічної
фармакології та
клінічної фармації

Тетяна САХАРОВА

«02» вересня 2022 року

ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ

Лілії АВЕРКОВОЇ-САВІНОЇ

1. Тема кваліфікаційної роботи: «Вивчення можливостей оцінки еквівалентності in vitro препаратів IV класу за біофармацевтичною класифікаційною системою»
керівник кваліфікаційної роботи: Сергій ШЕБЕКО, доктор фармацевтичних наук, доцент
затверджений наказом НФаУ від «01» листопада 2022 року №239
2. Строк подання здобувачем вищої освіти кваліфікаційної роботи: грудень 2022 р.
3. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: біоеквівалентність, in vitro, біофармацевтична класифікаційна система, IV клас, біовейвер, доведення еквівалентності in vitro препаратів діосміну.
4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити):
провести літературний огляд щодо проблеми вивчення біоеквівалентності препаратів IV класу згідно з БКС; проаналізувати можливість застосування альтернативних методів визначення біоеквівалентності in vitro на прикладі діосміну; здійснити модифікацію стандартного методу in vitro з доказу біоеквівалентності препаратів діосміну згідно з процедурою біовейвера; надати альтернативні методи in vitro доведення еквівалентності препаратів діосміну; проаналізувати практичні рекомендації щодо оптимізації методів вивчення біоеквівалентності in vitro для препаратів IV класу за БКС.
5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень):
таблиць 12, рисунків 25

6. Консультанти розділів кваліфікаційної роботи

Розділ	Ім'я, ПРІЗВИЩЕ, посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Розділ 1	Сергій ШЕБЕКО, доцент кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації	02.09.2022 р.	02.09.2022 р.
Розділ 2	Сергій ШЕБЕКО, доцент кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації	02.09.2022 р.	02.09.2022 р.
Розділ 3	Сергій ШЕБЕКО, доцент кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації	02.09.2022 р.	02.09.2022 р.

7. Дата видачі завдання: «02» вересня 2022 року.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів кваліфікаційної роботи	Примітка
1.	Визначення теми кваліфікаційної роботи, розробка плану роботи	вересень 2022 р.	виконано
2.	Проведення аналізу літературних джерел та підготовка літературного огляду	вересень - жовтень 2022р.	виконано
3.	Визначення методології проведення дослідження	жовтень 2022 р.	виконано
4.	Проведення досліджень та обробка отриманих результатів	жовтень - листопад 2022 р.	виконано
5.	Підготовка практичних рекомендацій	листопад - грудень 2022 р.	виконано
6.	Підготовка рукопису роботи	грудень 2022 р.	виконано
7.	Рецензування та затвердження роботи	грудень 2022 р.	виконано
8.	Подання роботи до захисту	січень 2023 р.	виконано
9.	Підготовка доповіді та презентації	січень 2023 р.	виконано

Здобувач вищої освіти

_____Лілія АВЕРКОВА-САВІНА

Керівник кваліфікаційної роботи

_____Сергій ШЕБЕКО

ВИТЯГ З НАКАЗУ № 239
по Національному фармацевтичному університету
від 01 листопада 2022 року

Затвердити тему, керівника та рецензента кваліфікаційної роботи здобувачу вищої освіти заочної форми навчання факультету медико-фармацевтичних технологій НФаУ 2023 року випуску:

№ з/п	Прізвище, ім'я по батькові здобувача вищої освіти	Тема кваліфікаційної роботи (українською мовою)	Тема кваліфікаційної роботи (англійською мовою)	Керівник кваліфікаційної роботи	Рецензент кваліфікаційної роботи
13.	Аверкова-Савіна Лілія Сергіївна	Вивчення можливостей оцінки еквівалентності in vitro препаратів IV класу за біофармацевтичною класифікаційною системою	Study of the possibilities of equivalence assessment in vitro of the class IV drugs according to the biopharmaceutical classification system	доц. Шебеко С.К.	доц. Должикова О.В.

ПІДСТАВА: службова записка завідувача кафедри про затвердження теми кваліфікаційної роботи, керівника та рецензента.

З оригіналом згідно:

Декан факультету медико-фармацевтичних технологій _____ О.І. Набока



ВИСНОВОК

**Комісії з академічної доброчесності про проведену
експертизу щодо академічного плагіату у
кваліфікаційній роботі здобувача вищої освіти
№ 110807 від «26» грудня 2022 р.**

Проаналізувавши випускну кваліфікаційну роботу за магістерським рівнем здобувача вищої освіти заочної форми навчання Аверкової-Савіної Лілії Сергіївни, 2 курсу, ____ групи, спеціальності 226 Фармація, промислова фармація, на тему: «Вивчення можливостей оцінки еквівалентності in vitro препаратів IV класу за біофармацевтичною класифікаційною системою / Study of the possibilities of equivalence assessment in vitro of the class IV drugs according to the biopharmaceutical classification system», Комісія з академічної доброчесності дійшла висновку, що робота, представлена до Екзаменаційної комісії для захисту, виконана самостійно і не містить елементів академічного плагіату (копії).

**Голова комісії,
професор
ВЛАДИМИРОВА**



Інна

1%

25%

ВІДГУК

наукового керівника на кваліфікаційну роботу другого (магістерського) ступеня вищої освіти спеціальності 226 Фармація, промислова фармація

Лілії АВЕРКОВОЇ-САВІНОЇ

на тему: «Вивчення можливостей оцінки еквівалентності in vitro препаратів IV класу за біофармацевтичною класифікаційною системою».

Актуальність теми. Найбільш складним для оцінки еквівалентності є IV клас ліків за БКС, бо препарати цього класу погано розчиняються у водному середовищі та погано свмоктуються. Препарати IV класу рекомендується вивчати лише за допомогою методів in vivo, що потребують фінансових та часових витрат. Методи in vitro дозволяють пришвидшити процес отримання результатів та зменшити витрати, тому важливо дослідити їх можливості.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість. У роботі охарактеризовано проблему вивчення біоеквівалентності препаратів IV класу за БКС. Здобувачкою запропоновано підхід, що дозволяє проводити дослідження доказу еквівалентності препаратів IV класу за БКС, а також оцінена можливість підвищення якості генеричних препаратів на фармацевтичному ринку України.

Оцінка роботи. Здобувачка здійснила аналіз наукових джерел за темою роботи та дослідила можливості модифікації стандартного методу in vitro за доказом біоеквівалентності препаратів діосміну згідно з процедурою біоєвейвера. Дослідження проведене на високому методологічному рівні.

Загальний висновок та рекомендації про допуск до захисту. Кваліфікаційна робота виконана здобувачкою самостійно, за обсягом та змістом відповідає вимогам «Положення про порядок підготовки та захисту випускних кваліфікаційних робіт у Національному фармацевтичному університеті» та може бути допущена до захисту.

Науковий керівник

Сергій ШЕБЕКО

«05» грудня 2022 р.

РЕЦЕНЗІЯ

на кваліфікаційну роботу другого (магістерського) ступеня вищої освіти спеціальності 226 Фармація, промислова фармація

Лілії АВЕРКОВОЇ-САВІНОЇ

на тему: «Вивчення можливостей оцінки еквівалентності *in vitro* препаратів IV класу за біофармацевтичною класифікаційною системою».

Актуальність теми. Враховуючи те, що фармацевтичний ринок України є переважно генеричним, важливим є забезпечення належної якості препаратів-генериків. Найбільш проблемною групою у доведенні еквівалентності є препарати IV класу за БКС, що обумовлено їх низькою розчинністю та проникністю при всмоктуванні. Тому актуальним питанням є удосконалення існуючих та пошук нових методів оцінки еквівалентності препаратів даної групи.

Теоретичний рівень роботи. Кваліфікаційна робота виконана на високому теоретичному рівні, чітко структурована, супроводжується графічним матеріалом, оформлена відповідно до вимог. Автор продемонстрував глибоке розуміння досліджуваної проблематики і наукове мислення, використав методи науково-теоретичного пізнання.

Пропозиції автора з теми дослідження. Автором було проведено аналіз можливих модифікацій існуючих методів доказу біоеквівалентності *in vitro* для речовин IV класу за БКС на прикладі препаратів діосміну згідно з процедурою біокейвера та з використанням альтернативних методів.

Практична цінність висновків, рекомендацій та їх обґрунтованість. Отримані результати можуть бути використані у практичній діяльності для підвищення якості генеричних лікарських засобів.

Недоліки роботи. У кваліфікаційній роботі виявлені деякі орфографічні та стилістичні помилки, що не знижує загальне позитивне враження та науково-практичну цінність роботи.

Загальний висновок і оцінка роботи. Кваліфікаційна робота за обсягом та змістом відповідає чинним вимогам та може бути рекомендована до захисту.

Рецензент _____

доц. Олена ДОЛЖИКОВА

«13» грудня 2022 р.

МОЗ України
Національний фармацевтичний університет

ВИТЯГ З ПРОТОКОЛУ №6

Засідання кафедри _____ клінічної фармакології та клінічної фармації _____

Національний фармацевтичний університет

м. Харків

«20» грудня 2022 р.

СЛУХАЛИ: Про представлення до захисту в Екзаменаційній комісії
випускної кваліфікаційної роботи на тему: **«Вивчення можливостей оцінки
еквівалентності in vitro препаратів IV класу за біофармацевтичною класифікаційною
системою» / «Study of the possibilities of equivalence assessment in vitro of the class IV
drugs according to the biopharmaceutical classification system»**

здобувача вищої освіти 2 курсу, спеціальності – 226 Фармація, промислова фармація,
освітньої програми – Клінічні дослідження, заочної форми навчання, НФаУ 2023 року
випуску

Аверкова-Савіна Лілія Сергіївна

прізвище, ім'я та по батькові

Керівник: доцент закладу вищої освіти кафедри клінічної
фармакології та клінічної фармації, д.фарм.н.,
доцент Шебеко С.К.

Рецензент: доцент закладу вищої освіти кафедри
клінічної лабораторної діагностики, д.фарм.н.,
доцент Должикова О.В.

В обговоренні кваліфікаційної роботи брали участь:

В.о. зав. кафедри, професор Т.С. Сахарова; професор В.А. Мороз;
доцент С.К. Шебеко; доцент О.О. Андрєєва; доцент Н.П. Безугла;
доцент В.В. Пропіснова; доцент С.В. Місюрьова; доцент І.А. Отрішко;
доцент О.О. Тарасенко; асистент К.М. Ткаченко; асистент С.М. Зімін;
асистент Т.С. Жулай; асистент Н.В. Давішня; асистент Т.Ю. Колодезна;
асистент К.В. Ветрова; асистент Ю.В. Тимченко

ПОСТАНОВИЛИ: Рекомендувати до захисту в ЕК кваліфікаційну роботу здобувача вищої
освіти

Аверкова-Савіна Лілія Сергіївна

прізвище, ім'я та по батькові

На тему: **«Вивчення можливостей оцінки еквівалентності in vitro препаратів IV класу
за біофармацевтичною класифікаційною системою» / «Study of the possibilities of
equivalence assessment in vitro of the class IV drugs according to the biopharmaceutical
classification system»**

В.о. завідувача кафедри

(підпис)

Тетяна САХАРОВА

Секретар

(підпис)

Катерина ТКАЧЕНКО

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**ПОДАННЯ
ГОЛОВІ ЕКЗАМЕНАЦІЙНОЇ КОМІСІЇ
ЩОДО ЗАХИСТУ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ**

Направляється здобувач вищої освіти Лілія АВЕРКОВА-САВІНА до захисту кваліфікаційної роботи за галуззю знань 22 Охорона здоров'я спеціальністю 226 Фармація, промислова фармація освітньою програмою Клінічні дослідження на тему: «Вивчення можливостей оцінки еквівалентності in vitro препаратів IV класу за біофармацевтичною класифікаційною системою».

Кваліфікаційна робота і рецензія додаються.

Декан факультету _____ / Ольга НАБОКА/

Висновок керівника кваліфікаційної роботи

Здобувач вищої освіти Лілія АВЕРКОВА-САВІНА виконала весь обсяг робіт. Кваліфікаційна робота може бути рекомендована до подачі в Екзаменаційну комісію НФаУ для подальшого її захисту.

Керівник кваліфікаційної роботи

Сергій ШЕБЕКО

«05» грудня 2022 р.

Висновок кафедри про кваліфікаційну роботу

Кваліфікаційну роботу розглянуто. Здобувач вищої освіти Лілія АВЕРКОВА-САВІНА допускається до захисту даної кваліфікаційної роботи в Екзаменаційній комісії.

В.о. завідувачки кафедри
клінічної фармакології
та клінічної фармації

Тетяна САХАРОВА

«20» грудня 2022 року

Кваліфікаційну роботу захищено
у Екзаменаційній комісії

« ____ » _____ 2023 р.

З оцінкою _____

Голова Екзаменаційної комісії,
доктор медичних наук, професор

_____ /Наталія БЕЗДІТКО/