

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Іванюк Олена Ігорівна

УДК 615.014.2:615.454.1:618.1

ДИСЕРТАЦІЯ

**Розробка складу та технології гелю вагінального з ресвератролом та
кислотою гіалуроновою**

226 – Фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

О. І. Іванюк

(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник Ярних Тетяна Григорівна, докторка фармацевтичних наук,
професорка, завідувачка кафедри технології ліків НФаУ.

Харків – 2020

АНОТАЦІЯ

Іванюк О. І. Розробка складу та технології гелю вагінального з ресвератролом та кислотою гіалуроновою. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 – Фармація. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2020.

Однією з найбільш актуальних проблем сучасної гінекології є попередження й усунення специфічних симптомів (свербіж, печіння, сухість у піхві, диспареунія на тлі гіпоестрогенії), що виникають у жінок у період менопаузи. Найбільш ефективним методом лікування залишається менопаузальна замісна терапія з використанням лікарських засобів, що містять статеві гормони. Проте здебільшого жінки через «гормонофобію» або наявності факторів ризику та протипоказань до статевих стероїдів більш прихильні до використання негормональних засобів корекції менопаузального синдрому (фітоестрогенів, зволожувальних засобів, лубрикантів).

В Україні майже відсутні препарати вітчизняного виробництва зазначеної дії, а більша частина асортименту представлена ліками іноземного виробництва та дієтичними добавками. Все це актуалізує науковий пошук і розробку нових ефективних і безпечних ЛЗ із використанням природних сполук, дія яких спрямована на попередження або лікування наслідків гіпоестрогенових станів різної етіології.

У *першому розділі* охарактеризовано сучасний стан проблеми фармакокорекції урогенітальних симптомів, які розвиваються у жінок на тлі менопаузального естрогенодефіциту. Показано медико-соціальну значущість досліджуваної проблеми: через прогресуюче старіння населення, як в Україні, так і у світі, хвороби і стани, обумовлені віковими фізіологічними та/або

патологічними особливостями жінок літнього віку, набувають дедалі більшого поширення. Тому, враховуючи специфічну для нашої країни гендерну асиметрію у бік переважання жінок серед літніх вікових категорій, а також середньостатистичні вікові межі настання менопаузи, забезпечення ефективними, безпечними та економічно доступними препаратами відповідної спрямованості дії для підтримання належної якості життя жінок, також і працездатного віку, набуває важливого значення для усього суспільства. Наведено причинно-наслідковий зв'язок між віковим дефіцитом гормонів естрогенового ряду і «ранніми» проявами клімактеричного синдрому: вазомоторних розладів, урогенітальних симптомів, розладів сну та психоемоційних порушень. Охарактеризовано патогенетичні механізми та застосовувані нині підходи до фармакокорекції так званого генітоуринарного синдрому в менопаузі. Показано, що дефіцит естрогенів впливає на тканини як статевої, так і сечової системи, що обумовлює розвиток двох груп симптомів – вульвовагінальних та цистоуретральних. При цьому серед усіх структур урогенітального тракту найбільш виражено атрофічні процеси перебігають у піхві. Гіпоестроген-індуковане порушення процесів проліферації епітелію у піхві призводить до зміни нормального складу вагінального біотопу, зсуву фізіологічного рН у бік олуження та вагінальної сухості. Базисні методи лікування цих розладів засновані на системній або локальній замісній естрогенотерапії. Втім, як і системне, так і локальне застосування естрогенових гормонів має певні обмеження, які, передусім, стосуються ризику розвитку або прогресування естрогенозалежних новоутворень, що найчастіше діагностують у жінок саме старшої вікової групи. Тому альтернативою естрогеновмісним препаратам є вагінальні зволожувальні засоби тривалої дії, до яких належить гіалуронова кислота, а також засоби рослинного походження з естрогеноподібною активністю – фітоестрогени. Наведено порівняльну характеристику груп речовин рослинного походження, зокрема таких, як ізофлавоноїди, лігнани, куместани, флавони та стильбени, та окремих їх представників, які, за літературними даними, володіють

естрогеноподібними властивостями. Визначено, що перспективним фітоестрогеном, з погляду створення на його основі засобів локальної фармакокорекції уrogenітальних розладів, є ресвератрол, що обґрунтовано його здатністю впливати на усі основні типи естрогенових рецепторів, а також низьким потенціалом до абсорбування з тканин піхви у системний кровотік. Розглянуто біофармацевтичні аспекти розробки вагінальних лікарських форм, з яких ключовим є необхідність забезпечення доброї мукоадгезії лікарського засобу. У зв'язку з цим визначено, що оптимальною лікарською формою для розроблюваного лікарського препарату є гель, оскільки наявність у його складі гелеутворювачів та їхні характерні консистентні властивості є передумовою до мукоадгезії. Наведено описані у літературі методи дослідження мукоадгезивних властивостей лікарських форм.

У *другому розділі* визначено загальну концепцію досліджень із розробки складу і технології гелю вагінального з ресвератролом та кислотою гіалуроною. Наведено властивості об'єктів дослідження – АФІ та сучасних допоміжних речовин, використаних при розробці лікарського препарату у формі вагінального гелю. Наведено комплекс методів дослідження, їх характеристику, що дозволило обрати раціональний склад вагінального гелю та дослідити його показники якості згідно з вимогами ДФУ.

У *третьому розділі* вивчено структуру і тенденції розвитку українського ринку лікарських засобів для профілактики та лікування гіпоестрогенових станів у жінок. Установлено, що на сьогодні фармацевтичний ринок поповнюється препаратами місцевої дії, у складі яких популярності набувають АФІ рослинного походження, а також зволожувальні агенти, наприклад, кислота гіалуронова. За результатами проведеного аналізу визначено необхідність та доцільність розробки вітчизняних лікарських форм, що забезпечить їх доступність широкому колу пацієнток до лікування та профілактики уrogenітальних проявів при менопаузі.

Досліджено фізико-хімічні властивості АФІ, а саме: розчинність, мікроелементний склад, термостабільність, кристалографічні характеристики,

та обрано раціональні розчинники: для екстракту ресвератролу – пропіленгліколь, для кислоти гіалуронової – вода очищена.

Розроблено склад зразків гелів з різними гелеутворювачами: Aristoflex AVC, Sepimax Zen, Sepinov EMT 10, гідроксіетилцелюлоза, Карбопол Ultrez 21 та Methocel, і вивчено їх органолептичні властивості, рівень pH, встановлено реологічні параметри. За результатами досліджень обрано раціональний гелеутворювач Aristoflex AVC у концентрації 1,5%, що забезпечує стабільну коагуляційну структуру із псевдопластичним типом плинності та обумовлює добрі споживчі та біофармацевтичні властивості препарату.

Ступінь біoadгезії визначає можливість утримання АФІ гелю на поверхні ураженого органа за допомогою міжфазних сил упродовж тривалого часу. Тому було обґрунтовано вибір мукоадгезиву та його концентрації у складі гелю. Досліджено вплив натрію альгінату, метилцелюлози, Methocel та OraRez® W-100L16 на показники швидкості розподілу зразків гелю, діаметр плям під дією механічних сил, стійкість до розмивання, ступінь адгезії і текстурні характеристики – зворотну екструзію та намазуваність. Установлено, що максимальні біоадгезивні характеристики має зразок гелю вагінального з натрію альгінатом 1,5%.

Для обґрунтування вибору концентрації пропіленгліколю у складі гелю проведено дослідження вивільнення ресвератролу методом рівноважного діалізу зі зразків із вмістом ПГ 10 та 15%. Установлено, що 15% ПГ сприяє максимальному вивільненню активної речовини – екстракту ресвератролу. Окрім того, дослідний зразок із вмістом ПГ 15% мав найкращу стійкість до висихання.

Проведено дослідження із вибору антимікробного консерванту у складі гелю, в результаті яких обрано косгард у концентрації 0,5%, що сприятиме стабільності розробленого препарату у процесі його зберігання.

На основі проведення комплексу досліджень розроблено склад гелю вагінального, що містить ресвератрол, кислоту гіалуронову, аристофлекс AVC, пропіленгліколь, натрію альгінат, косгард та воду очищену, під умовною

назвою «Вагітрол».

У четвертому розділі наведено технологію отримання вагінального гелю у промислових умовах та визначено критичні параметри й умови технологічного процесу, що дозволить отримати готову продукцію належної якості згідно з вимогами НД.

Розроблено методики кількісного та якісного визначення ресвератролу та кислоти гіалуронової у складі гелю методом ВЕРХ. Методом газової хроматографії зі полум'яно-іонізаційним детектором встановлено вміст і кількість ПГ у препараті. Проведено валідацію розробленої методики визначення ресвератролу методом ВЕРХ та встановлено її специфічність, лінійність, прецизійність (збіжність) та правильність.

Розроблено специфікацію нагель «Вагітрол», яка включає ідентифікацію ресвератролу, кислоти гіалуронової, пропіленгліколю, їх кількісне визначення, а також мікробіологічну чистоту, однорідність, рівень рН та масу вмісту упаковки.

На підставі проведених досліджень доведено стабільність розробленого препарату при двох температурних режимах зберігання за всіма показниками якості й установлено термін його придатності – 2 роки.

У п'ятому розділі представлено результати скринінгових досліджень зразків гелю вагінального із вмістом ресвератролу 0,5, 1, 2, 3% щодо їх впливу на рН вагінального секрету оварієктомованих самок щурів, на вазомоторні реакції, на вміст статевих гормонів у сироватці крові, локомоторну активність за тестами «піднесений хрестоподібний лабіринт», «відкрите поле» та «екстраполяційне вивільнення». Як препарат порівняння досліджувалигель «Гінодек».

У доклінічних фармакологічних дослідженнях доведено, що застосування гелю відновлює вагінальний секрет до фізіологічного стану, підвищує функціональну активність епітеліальних клітин, сприяє нормалізації вмісту естрадіолу та прогестерону, помірно впливає на функціональний стан

центральної нервової системи. Результати досліджень дозволили встановити, що оптимальний вміст ресвератролу в складі гелю становить 0,5%.

Крім того, встановлено нетоксичність та відповідність мікробіологічної чистоти препарату «Вагітрол» вимогам ДФУ протягом 2 років зберігання.

Розроблено проекти МКЯ і технологічного промислового регламенту на виробництво препарату «Вагітрол» і апробовано їх в умовах ПАТ «Хімфармзавод «Червона зірка».

За результатами проведених досліджень отримано патент України на корисну модель № u 201905153 від 26.12.2019 р.

Результати дисертаційних досліджень упроваджено у навчальний процес низки закладів вищої освіти фармацевтичного (медичного) профілю України.

Ключові слова: гіпоестрогеновий стан у жінок, ресвератрол, кислота гіалуронова, гелеутворювачі, гідрофільні неводні розчинники, консерванти, гель вагінальний, склад, технологія, стабільність.

Список публікацій здобувачки

Статті (Scopus / web of science)

1. Yarnykh T. G., Ivaniuk O. I., Kovalevska I. V., Kukhtenko H. P., Kutsenko S. A. Rheology-based substantiation of a gel-former choice for vaginal gel. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018. Vol. 10, № 11. P. 2825-2828. *(Особистий внесок: планування та проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів експерименту, підготовка статті).*

Статті у фахових виданнях

2. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G., Kovalevska I. V. Determination of the bioadhesion indicators of vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid. *EUREKA: Health Sciences*. 2019. Vol. 2. P. 33-39. *(Особистий внесок: планування та виконання експерименту, узагальненні результатів та підготовка статті).*

3. Ivaniuk O. I., Strilets O. P., Yarnykh T. G. Choice of the preservative in the composition of vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid for treatment of

urogenital symptoms in the climax period. *Annals of Mechnikov Institute*. 2019. № 3. P. 70-74. *(Особистий внесок: участь у плануванні та виконанні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті)*.

4. Іванюк О. І., Ярних Т. Г., Євтушенко О. М. Огляд ринку препаратів для профілактики та лікування урогенітальних симптомів у пре- та постменопаузальному періоді. *Соціальна фармація в охороні здоров'я*. 2019. Т. 5, № 4. С. 66-78. *(Особистий внесок: участь у плануванні та виконанні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті)*.

5. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G., Hrudko V. O., Kovalevska I. V. Determination of vaginal gel composition on the basis of biopharmaceutical and rheological researches. *Annals of Mechnikov Institute*. 2018. № 4. P. 43-47. *(Особистий внесок: планування та виконання експерименту, узагальнення результатів та підготовка статті)*.

6. Зайченко Г. В., Горчакова Н. О., Стрига О. А., Яковлева Н. Ю., Рубан О. І. Аспекти фармакодинаміки та клінічної фармакології гіалуронової кислоти. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип. 1 (135). С. 33-42. *(Особистий внесок: участь в узагальненні результатів та підготовці статті)*.

7. Зайченко Г. В., Горчакова Н. О., Стрига О. А., Рубан О. І. Фармакологічне обґрунтування розробки нових лікарських препаратів на основі ресвератролу. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип. 4 (1). С. 21-30. *(Особистий внесок: участь в узагальненні результатів та підготовці статті)*.

8. Yarnykh T. G., Ivaniuk O. I. Study of the hyaluronic acid solubility for development of the vaginal gel composition. *Укр. біофармац. журн*. 2017. № 6 (53). P. 19-23. *(Особистий внесок: планування та виконання експерименту, узагальнення результатів та підготовка статті)*.

Патенти:

9. Іванюк О. І., Ярних Т. Г., Стрига О. А., Зайченко Г. В., Ковалевська І. В. Фармацевтична композиція для корекції гіпоестрогенових станів у жінок у

формі гелю вагінального : пат. 139105 Україна. №u 201905153; заявл. 15.05.2019; опубл. 26.12.2019, Бюл. № 24. 4 с. (*Особистий внесок: участь у патентному пошуку, плануванні та виконанні експериментальних досліджень, узагальнення результатів, оформлення заявки на патент на корисну модель*).

Тези доповідей конференцій:

10. Рубан Е. И. Ярных Т. Г. Гиалуроновая кислота и её роль в организме человека. *Перспективы развития биологии, медицины и фармации* : материалы IV Междунар. науч. конф. молодых ученых и студентов, г. Шымкент, 9-10 дек. 2016 г. Шымкент, 2016. С. 28-29.

11. Рубан О. І., Ярних Т. Г. Вивчення розчинності кислоти гіалуронової з метою визначення шляху її введення до складу гелю вагінального. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології* : зб. наук. пр. Харків : НФаУ, 2017. Вип. 2. : Сучасні аспекти створення екстемпоральних алопатичних, гомеопатичних і косметичних лікарських засобів : матеріали I Міжнар. наук.-практ. конф., 3–4 берез. Харків, 2017 р. С. 172-174.

12. Ruban O. I., Yarnykh T. G. Study of the rheological properties of the vaginal gel with hyaluronic acid. *Topical issues of new drugs development* : Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student, April 20, 2017. Kharkiv : Publishing Office NUPh, 2017. Vol. 1. P. 282.

13. Іванюк О. І., Ярних Т. Г. Вивчення розчинності ресвератролу для вибору технології введення до складу гелю вагінального. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії* : матеріали III Міжнар. наук.–практ. інтернет-конф., м. Харків, 14-15 листоп. 2017 р. Харків : НФаУ, 2017. С 94.

14. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G. The research of extrication resveratrol by an equilibrium dialysis in the composition of the vaginal gel. *Topical issues of new drugs development* : abstracts of XXV international scientific and practical conference of young scientists and student, April 18-20, 2018. Kharkiv : NUPh, 2018. P. 139-140.

15. Іванюк О. І., Ярних Т. Г. Обґрунтування вмісту пропіленгліколю у складі гелю вагінального. *Proceedings of the 3rd Internstional scientific congress of scientists of Europe*. Premier Publishing s.r.o. Vienna, 2019. P. 1067-1069.

16. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G. The choice of mucoadhesive in the composition of vaginal gel. *Topical issues of new medicines development : Abstracts of XXVI International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student*, Kharkiv, April 10-12, 2019. Kharkiv : NUPh, 2019. P. 113.

17. Іванюк О. І., Ярних Т. Г., Стрілець О. П. Вивчення антимікробної активності консервантів у складі гелю вагінального. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії* : матеріали IV Міжнар. наук.–практ. інтернет-конф., м. Харків, 14-15 листоп. 2019 р. Харків: НФаУ. 2019. С. 97-98.

18. Стрига О. А., Зайченко Г. В., Іванюк О. І. Оцінка фармакологічної дії нових вагінальних гелів з ресвератролом та гіалуроновою кислотою за впливом на масу тіла оваріоектомованих щурів. *Planta+. Досягнення та перспективи* : матеріали Міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. пам'яті д-ра хім. наук, проф. Ніни Павлівни Масютіної (до 95-річчя від дня народж.), м. Київ, 20-21 лют. 2020 р. Київ : ПАЛИВОДА А.В., 2020. С. 231-232.

19. Іванюк О. І., Ханін В. А., Ярних Т. Г. Визначення кількісного вмісту ресвератролу в гелі методом ВЕРХ. *Сучасні аспекти створення екстемпоральних алопатичних, гомеопатичних та косметичних лікарських засобів* : матеріали Міжнар. наук.-практ. дистанційної конф. м. Харків, 20 бер. 2020 р. Харків : НФаУ, 2020. С. 80-81.

Інформаційні листи:

20. Ярних Т. Г., Іванюк О. І. Розробка технології вагінального гелю з ресвератролом та кислотою гіалуроновою : інформ. лист № 255-2019. Київ, 2019. 4 с. (Протокол ПК «Фармація» № 106 від 26.03.2019 р.).

ANNOTATION

Ivanyuk O. I. Development of the composition and technology of vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid. – Qualifying scientific work on the rights of a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 226 – Pharmacy – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2020.

One of the most pressing problems of modern gynecology is the prevention and elimination of specific symptoms (itching, burning, dryness in the vagina, dyspareunia against the background of hypoestrogenism) occurring in menopausal women. The most effective method of treatment is menopausal replacement therapy with medicinal products containing sex hormones. However, most women due to "hormonal phobia" or in the presence of risk factors and contraindications to sex steroids are more inclined to use non-hormonal means of menopausal syndrome correction (phytoestrogens, moisturizers, lubricants).

In Ukraine, medicines of domestic production of this action are almost absent, and most of the range is represented by foreign medicines and dietary supplements. All this actualizes the scientific search and development of new effective and safe medicinal products using natural compounds, which action is aimed at preventing or treating the effects of hypoestrogenic conditions of various etiologies.

The first chapter describes the current state of the problem of pharmaceutical correction of urogenital symptoms that develop in women against the background of menopausal estrogen deficiency. The medical and social significance of the researched problem has been shown: due to the progressive aging of the population, both in Ukraine and globally, diseases and conditions caused by age physiological and/or pathological features of the elderly population are becoming more widespread. Thus, given the country-specific gender asymmetry towards the

predominance of women among the elderly, as well as the average age of menopause, providing the population with effective, safe, and affordable medicines of the corresponding action to maintain a proper quality of life of women, including those of able-bodied age, is important for society as a whole. The causal relationship of age-related estrogen hormones deficiency and the "early" manifestations of menopausal syndrome: vasomotor disorders, urogenital symptoms, sleep disorders, and psychoemotional disorders has been demonstrated. The pathogenetic mechanisms and currently used approaches to pharmaceutical correction of the so-called genitourinary syndrome in menopause have been characterized. It has been shown that estrogen deficiency affects tissues of both the genital and urinary systems, which causes the development of two groups of symptoms – vulvovaginal and cystourethral, while among all the structures of the urogenital tract atrophic processes occur mostly in the vagina. Hypoestrogen-induced disruption of epithelial proliferation processes in the vagina leads to changes in the normal composition of the vaginal habitat, a shift in physiological pH towards alkalization, and vaginal dryness. Basic methods of treatment of these disorders are based on systemic or local estrogen replacement therapy. However, both systemic and topical application of estrogen hormones have certain limitations, which primarily relate to the risk of developing or progressing estrogen-dependent tumors, which are most often diagnosed in older women. Therefore, an alternative to estrogen-containing medicines are prolonged-action vaginal moisturizers, which include hyaluronic acid, as well as herbal remedies with estrogen-like activity – phytoestrogens. The comparative characteristics of groups of plant-origin substances, in particular, isoflavonoids, lignans, coumestans, flavones, and stilbenes, and their separate representatives, which according to the literature possess estrogen-like properties, are given. It has been determined that resveratrol is a promising phytoestrogen from the point of view of creating local preparations for pharmaceutical correction of urogenital disorders based on it, which is justified by its ability to affect all major types of estrogen receptors, as well as the low potential for absorption from vaginal tissues into the systemic bloodstream. The biopharmaceutical aspects of the

development of vaginal dosage forms have been reviewed, of which the key one is the need to ensure good mucoadhesion of the medicinal product. In this regard, it was determined that the optimal dosage form for the developed medicinal product is gel, because the presence of gel-formers in the composition of gels and their characteristic consistency properties are a prerequisite for mucoadhesion. The methods of research of mucoadhesive properties of dosage forms described in the literature are given.

In the second chapter the general concept of researches on the development of composition and technology of vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid has been defined. The properties of the objects of research – API and modern excipients used in the development of the drug in the form of a vaginal gel have been provided. A set of research methods and their characteristics are given, which have allowed choosing the rational composition of the vaginal gel and investigating its quality parameters according to the requirements of the SPU.

In the third chapter the structure and development trends of the Ukrainian market of drugs for the prevention and treatment of hypoestrogenic conditions in women have been studied. It has been established that today the pharmaceutical market is replenished with topical drugs, in which APIs of plant origin, as well as moisturizing agents such as hyaluronic acid, are gaining popularity. The results of the analysis indicate the need and feasibility of developing domestic dosage forms that will ensure their availability to a wide range of patients for the treatment and prevention of urogenital manifestations during menopause.

Physicochemical properties of APIs, such as solubility, microelement composition, thermostability, crystallographic characteristics have been studied, and rational solvents were chosen: for resveratrol extract – propylene glycol, for hyaluronic acid – purified water.

The composition of gel samples with different gelling agents – Aristoflex AVC, Sepimax Zen, Sepinov EMT 10, hydroxyethylcellulose, Carbopol Ultrez 21, and Methocel was developed and their organoleptic properties, pH level, rheological parameters were established. According to the research results, the rational gel-

former Aristoflex AVC was selected in a concentration of 1.5%, which provides a stable coagulation structure with a pseudoplastic type of flow and causes good consumer and biopharmaceutical properties of the drug.

The degree of bioadhesion determines the possibility of retaining the API of the gel on the surface of the affected organ with the help of interfacial forces for a long time. Therefore, the choice of a mucoadhesive agent and its concentration in the gel has been substantiated. The effect of sodium alginate, methylcellulose, Methocel, and OraRez[®] W-100L16 was studied on the indicators of the speed of distribution of gel samples, the diameter of the spots under the action of mechanical forces, resistance to dilution, the degree of adhesion, and textural characteristics – reverse extrusion and spreadability. It has been found that the sample of vaginal gel with sodium alginate in the amount of 1.5% has the maximum bioadhesive characteristics.

To substantiate the choice of propylene glycol concentration in the gel, a study of resveratrol release by equilibrium dialysis from samples with PG content of 10 and 15% has been performed. It has been found that 15% of PG promotes the maximum release of the active substance – resveratrol extract. In addition, the test sample with PG content of 15% had the best resistance to drying.

Studies on the choice of antimicrobial preservative in the gel were performed, as a result of which Cosgard at a concentration of 0.5% was selected, which will contribute to the stability of the developed gel during its storage.

Based on a set of studies, the composition of vaginal gel under the conditional name "Vagitrol" containing resveratrol, hyaluronic acid, aristoflex AVC, propylene glycol, sodium alginate, Cosgard, and purified water has been developed.

In the fourth chapter the technology of obtaining vaginal gel in industrial conditions is given and the critical parameters and conditions of the technological process are determined, which will allow obtaining finished products of appropriate quality according to the requirements of RD.

Methods for quantitative and qualitative determination of resveratrol and hyaluronic acid in the gel by HPLC have been developed. Using the method of gas

chromatography with a flame-ionization detector the content and amount of PG in the drug has been determined. Validation of the developed method of resveratrol identification by HPLC has been carried out and its specificity, linearity, precision (convergence) and accuracy have been established.

A specification of Vagitrol gel has been developed, which includes the identification of resveratrol, hyaluronic acid, propylene glycol, their assay, microbiological purity, homogeneity, pH level, and weight of the contents of the package.

Based on the conducted researches the stability of the developed drug at two storage temperatures for all quality parameters has been proven, and 2 years shelf life of the medicine has been established.

The fifth chapter provides the results of screening studies of the vaginal gel samples with resveratrol content of 0.5%, 1%, 2%, 3% in terms of their effect on the pH of vaginal secretions of ovariectomized female rats, vasomotor reactions, the content of sex hormones in the serum, locomotor activity using tests "Elevated cruciform labyrinth", "open field" and "extrapolation release". Gynodek gel was studied as a comparison drug.

Preclinical pharmacological studies have demonstrated that the use of the gel restores vaginal secretions to a physiological state, increases the functional activity of epithelial cells, helps to normalize the content of estradiol and progesterone, has a moderate effect on the functional state of the central nervous system. The results of the research have allowed establishing the optimal content of resveratrol in the gel as 0.5%.

Besides, non-toxicity and compliance of the microbiological purity of the drug Vagitrol with requirements of SPU during 2 years of storage has been established.

Projects of QCM and technological industrial regulations for the production of the drug "Vagitrol" have been developed and tested under the conditions of JSC "Chemical and Pharmaceutical Plant "Chervona Zirka".

According to the results of the research, a patent of Ukraine for utility model

No. u 201905153 dated 26.12.2019 was obtained.

The results of dissertation research have been introduced into the educational process of a number of Ukrainian higher education institutions of pharmaceutical (medical) profile.

Keywords: hypoestrogenic state in women, resveratrol, hyaluronic acid, gelling agents, hydrophilic non-aqueous solvents, preservatives, vaginal gel, composition, technology, stability.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	20
ВСТУП	22
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ ПЕРСПЕКТИВИ СТВОРЕННЯ ВАГІНАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ ФІТОЕСТРОГЕНІВ (Огляд літератури)	30
1.1 Медико-соціальні та клінічні аспекти вікового естрогенодефіциту у жінок	30
1.2 Генітоуринарний синдром у менопаузі: механізми патогенезу та підходи до фармакотерапевтичної корекції	37
1.3 Можливості застосування фітоестрогенів з метою корекції генітоуринарного синдрому в менопаузі	45
1.4 Біофармацевтичні аспекти розробки та дослідження вагінальних лікарських форм	51
Висновки до розділу 1	59
РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАГАЛЬНОЇ КОНЦЕПЦІЇ ТА МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	61
2.1 Особливості фармацевтичної розробки м'яких лікарських форм для застосування в гінекології	61
2.2 Об'єкти дослідження	62
2.3 Методи дослідження	67
2.3.1 Органолептичні дослідження	68
2.3.2 Фізико-хімічні методи дослідження	68
2.3.3 Біофармацевтичні методи дослідження	81
2.3.4 Фармакологічні та мікробіологічні методи дослідження	83
Висновки до розділу 2	86
РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА СКЛАДУ І ТЕХНОЛОГІЇ ГЕЛЮ	

	18
ВАГІНАЛЬНОГО	87
3.1 Огляд ринку препаратів для профілактики та лікування урогенітальних симптомів у пре- та постменопаузальному періоді	87
3.2 Дослідження з розробки складу гелю з ресвератролом та кислотою гіалуроновою	99
3.2.1 Елементний аналіз екстракту ресвератролу	99
3.2.2 Фізико-хімічні дослідження активних фармацевтичних інгредієнтів	102
3.2.3 Визначення розчинності кислоти гіалуронової	108
3.3 Дослідження з вибору гелеутворювача у складі препарату	113
3.4 Обґрунтування вмісту пропіленгліколю та аристофлексу в складі гелю	120
3.5 Дослідження з вибору біoadгезиву в складі гелю вагінального	127
3.6 Вибір консерванта в складі гелю	136
Висновки до розділу 3	141
РОЗДІЛ 4 ТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПРОЦЕС ОТРИМАННЯ ГЕЛЮ ВАГІНАЛЬНОГО. РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ	145
4.1 Технологічний процес виготовлення гелю під умовною назвою «Вагітрол»	145
4.2 Розробка методик ідентифікації та кількісного визначення діючих речовин	149
4.3 Вивчення стабільності гелю «Вагітрол» у процесі зберігання	165
Висновки до розділу 4	171
РОЗДІЛ 5 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	173

	19
5.1 Фармакологічний скринінг з вибору концентрації екстракту ресвератролу в складі гелю вагінального	173
5.2 Вплив зразків гелів із ресвератролом та гіалуроновою кислотою на мікробіоценоз вагінального секрету оварієктомованих самок щурів	180
5.3 Вплив вагінального гелю з ресвератролом на функціональний стан центральної нервової системи оварієктомованих самок щурів	182
5.4 Вивчення токсичності препарату	183
5.5 Дослідження мікробіологічної чистоти гелю «Вагітрол»	184
Висновки до розділу 5	186
ВИСНОВКИ	188
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	190
ДОДАТКИ	210

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ER	–	estrogen receptors (естрогенові рецептори);
NAMS	–	North American Menopause Society (Північно-Американська спільнота фахівців з менопаузи);
QbD	–	Quality by Design;
АЛТ	–	аланінамінотрансфераза;
АСТ	–	аспартатамінотрансфераза;
АФІ	–	активний фармацевтичний інгредієнт;
ВЕРХ	–	високоєфективна газова хроматографія;
ВЕРХ	–	високоєфективна рідинна хроматографія;
ВООЗ	–	Всесвітня організація охорони здоров'я;
ГЕЦ	–	гідроксіетилцелюлоза;
ГК	–	гіалуронова кислота;
ГУСМ	–	генітоуринарний синдром у менопаузі;
ДФУ	–	Державна фармакопея України;
E ₁	–	естрон;
E ₂	–	естрадіол;
E ₃	–	естріол;
ЖСГ	–	жіночі статеві гормони;
ЗГТ	–	замісна гормональна терапія;
ІК	–	інтактний контроль;
КП	–	контрольна патологія;
ЛЗ	–	лікарський засіб;
ЛФ	–	лікарська форма;
МКЯ	–	методи контролю якості;
НД	–	нормативна документація;
ОП	–	остеопороз;
ОС	–	оваректомовані самки;
ПАТ	–	Публічне акціонерне товариство;

ПГ	– пропіленгліколь;
ПЕО	– поліетиленоксид;
СЗ	– стандартний зразок;
УФ	– ультрафіолет;
ФР	– фармацевтична розробка;
ФСЗ	– фармацевтичний стандартний зразок;
ХФЗ	– хіміко – фармацевтичний завод.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Протягом 30-35 років репродуктивного періоду життя організм жінки функціонує в умовах циклічної дії різних концентрацій жіночих статевих гормонів, які впливають на різні органи і тканини, беруть участь в обмінних процесах. При віковому «вимиканні» функції яєчників у 60–80% жінок у перименопаузальному або постменопаузальному періодах, під час лактації можуть спостерігатися різні клінічні прояви естрогендефіцитного стану, так звані клімактеричні розлади, що виявляються проявлятися вазомоторними симптомами, емоційною лабільністю, пітливістю, порушенням сну, зниженням мінеральної щільності кісткової тканини. Крім того, можуть спостерігатися прояви урогенітальної атрофії: сухість, свербіж та запалення слизових оболонок статевих органів, біль під час сечовипускання. Відсутність лікування цих порушень може призвести до приєднання інфекційних захворювань та значного зниження якості життя жінки.

Сучасні клінічні рекомендації щодо лікування менопаузальних розладів спрямовані в основному на замісну терапію естрогенами або естрогенами у комбінації з гестагенами. Зазвичай препарати для менопаузальної гормонотерапії випускають у пероральних і топікальних лікарських формах.

Однак застосування таких препаратів має низку недоліків у вигляді системних побічних ефектів. Естрогеновмісні препарати при тривалому застосуванні можуть викликати гіперплазію ендометрія і навіть розвиток злоякісних новоутворень. Тривала гормональна терапія також асоціюється з підвищенням ризику розвитку ішемічної хвороби серця, інсультів, інфарктів, тромбозів, а також пухлини молочної залози. Існує багато протипоказань щодо застосування замісної гормональної терапії, а саме: маткові кровотечі невизначеної етіології, пухлини, тромбоемболічні ускладнення в анамнезі, гострі печінкові захворювання.

Альтернативним підходом є застосування фітоестрогенів для лікування вищенаведених розладів, які виявляють м'яку естрогеноподібну дію та не мають негативного впливу на організм жінки.

Враховуючи, що найбільш дискомфортними симптомами у період менопаузи є свербіж, печіння, сухість у піхві, диспареунія на тлі гіпоестрогенії, для місцевого вагінального застосування доцільно використовувати фітоестрогени у комбінації з гіалуроновою кислотою. Оптимальною лікарською формою для фармакологічної корекції менопаузальних урогенітальних розладів вважають вагінальні лікарські засоби, виготовлені на гелевій основі, що надає лікарській формі біoadгезивних та зволожувальних властивостей і має локалізовану дію.

Як результат вищенаведеного, є актуальним питання створення вітчизняного лікарського засобу природного походження з ресвератролом та кислотою гіалуроновою, який дозволить здійснювати ефективну фармакокорекцію урогенітальних розладів у період естрогенодефіциту.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт НФаУ «Розробка складу, технології та біофармацевтичні дослідження лікарських засобів на основі природної та синтетичної сировини» (№ 0114U000945).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційного дослідження є розробка складу, технології виробництва, методів контролю якості гелю вагінального з ресвератролом та кислотою гіалуроновою для лікування гіпоестрогенових станів у жінок.

Реалізація поставленої мети вимагала вирішення таких науково-практичних завдань:

– здійснити аналіз та узагальнити дані інформаційних джерел щодо етіопатогенетичних аспектів клімактеричних розділів, напрямків їх фармакокорекції, вимог та рекомендацій до розробки, виробництва та застосування вагінальних засобів у формі гелів;

- проаналізувати номенклатуру фармацевтичного ринку України щодо лікарських препаратів для профілактики та лікування гіпоестрогенових станів;
- провести фізико-хімічні і технологічні дослідження ресвератролу та кислоти гіалуронової;
- на підставі фармакотехнологічних, фізико-хімічних та біофармацевтичних досліджень розробити оптимальний склад комбінованого лікарського засобу у формі гелю вагінального;
- розробити раціональну технологію виробництва гелю з ресвератролом та кислотою гіалуроною;
- провести фізико-хімічні та біофармацевтичні дослідження запропонованого препарату;
- розробити методики аналізу гелю, встановити термін та умови його зберігання;
- проаналізувати та узагальнити дані біологічних досліджень розробленого препарату;
- розробити технологічний регламент та проєкт МКЯ на гель вагінальний та апробувати запропоновану технологію у промислових умовах.

Об’єкти дослідження. Діючі речовини: ресвератрол, кислота гіалуронова; допоміжні речовини: гелеутворювачі, гідрофільні неводні розчинники, консерванти та ін.; гелеві основи, модельні зразки гелів, гель комбінованого складу під умовною назвою «Вагітрол».

Предмет дослідження. Експериментальне обґрунтування складу, технології, методик контролю якості гелю вагінального з ресвератролом та кислотою гіалуроною; дослідження його структурно-механічних, фізико-хімічних властивостей; установлення умов зберігання і терміну придатності; дослідження фармакологічної активності та безпечності; розробка технологічного регламенту та проєкту МКЯ.

Методи дослідження. Для вирішення науково-практичних завдань були застосовані сучасні *фізико-хімічні* (високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), високоефективна газова хроматографія (ВЕГХ), спектрофотометрія в

УФ та видимих ділянках, потенціометричне визначення рН, дериватографічний метод), структурно-механічні (реовіскозиметрія, текстурний аналіз), *біофармацевтичні* (метод діалізу крізь напівпроникну мембрану, метод тензіометрії), *біологічні* (визначення мікробіологічної чистоти, специфічної активності та безпечності на моделях *in vivo* та *in vitro*), *математичні* (статистична обробка результатів згідно з вимогами ДФУ, за допомогою програм Statistica (StatSoft, USA) та Excel (Microsoft, USA)) методи дослідження.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше на основі фізико-хімічних, мікробіологічних, фармакотехнологічних та фармакологічних досліджень було науково обґрунтовано та експериментально опрацьовано склад і технологію виробництва комбінованого гелю вагінального з ресвератролом та кислотою гіалуроновою для лікування та профілактики гіпоестрогенових станів у жінок (патент України на корисну модель «Фармацевтична композиція для корекції гіпоестрогенових станів у жінок у формі гелю вагінального» № u 201905153 від 26.12.2019 р.). Обґрунтовано вид та кількість мукоадгезивного компонента у складі гелю та визначено його вплив на текстурні властивості розробленого препарату.

Уперше із застосуванням сучасних методів досліджень встановлено фізико-хімічні, структурно-механічні властивості розробленого лікарського засобу, запропоновано методи якісного та кількісного визначення діючих речовин у складі гелю. Розроблено раціональну технологію препарату під умовною назвою «Вагітрол», обрано оптимальні умови і термін його зберігання – протягом 27 місяців.

Доклінічними дослідженнями доведено специфічну фармакологічну ефективність та безпечність розробленого препарату.

Практичне значення отриманих результатів. На підставі проведених досліджень розроблено та запропоновано оригінальний лікарський засіб у формі гелю вагінального з ресвератролом та кислотою гіалуроновою під

умовною назвою «Вагітрол» для профілактики та лікування гіпоестрогенових станів у жінок.

Розроблено проекти МКЯ і технологічного промислового регламенту на виробництво гелю. Технологія апробована в умовах виробництва ПАТ ХФЗ «Червона зірка» (м. Харків) (акт апробації від 05.02.2020 р.). Розроблено інформаційний лист № 255-2019 «Розробка технології вагінального гелю з ресвератролом та кислотою гіалуроновою».

Фрагменти роботи упроваджено в освітньо-науковий процес низки ЗВО України, а саме: кафедри аптечної технології ліків Національного фармацевтичного університету (акт впровадження від 08.09.2020 р.), кафедри загальної фармації та безпеки ліків ІПКСФ НФаУ (акт впровадження від 03.09.2020р.), кафедри технології ліків і біофармації Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (акт впровадження від 26.02.2020 р.), кафедри технології ліків Запорізького державного медичного університету (акт впровадження від 05.10.2020 р.), кафедри аптечної та промислової технології ліків Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (акт впровадження від 05.11.2020 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною завершеною науковою роботою. Здобувачем особисто проведено аналіз та узагальнення світових і вітчизняних літературних даних із проблеми етіопатогенетичних аспектів клімактеричних розладів, їх лікування, розробки вагінальних лікарських засобів, стану вітчизняного фармацевтичного ринку препаратів зазначеного напрямку дії.

Здобувачем разом із науковим керівником визначено мету та обґрунтовано загальну методологію досліджень. Теоретично обґрунтовано та розроблено склад і технологію отримання гелю вагінального, проведено планування усіх експериментальних робіт; обрано аналітичне та технологічне обладнання, необхідне для вирішення завдань, а також проведено експериментальні дослідження за темою дисертації. За допомогою фізико-хімічних, структурно-механічних та біофармацевтичних досліджень

обґрунтовано вибір АФІ та допоміжних речовин, розроблено технологію гелю, визначено його показники якості, розроблено та валідовано методики ідентифікації та кількісного визначення ресвератролу та кислоти гіалуронової, встановлено стабільність препарату в процесі зберігання.

Усі наукові та практичні результати, положення, висновки та рекомендації, що викладені в дисертації, отримано автором самостійно.

Методики визначення якісного та кількісного вмісту діючих речовин у препараті розроблено на базі НДЛ НФаУ під керівництвом к. хім. н. В. О. Ханіна, мікробіологічні дослідження проведено на кафедрі біотехнології НФаУ під керівництвом д. фарм. н., проф. О. П. Стрілець, біофармацевтичні дослідження гелю – на кафедрі фармацевтичної хімії під керівництвом к. фарм. н., доц. В. О. Грудько, текстурні дослідження – на кафедрі технології ліків та соціальної фармації Литовського університету наук про здоров'я під керівництвом проф. Ю. Бернатонієне, фармакологічні дослідження – на кафедрі фармакології НМУ імені О. О. Богомольця під керівництвом д. мед. наук, проф. Г. В. Зайченко.

У всіх наукових працях, що були опубліковані у фахових наукових виданнях у співавторстві з Т. Г. Ярних, І. В. Ковалевською, Г. П. Кухтенко, С. А. Куценко, А. В. Зайченко, В. А. Грудько, О. М. Євтушенко, О. П. Стрілець, В. А. Ханіним, Н. О. Горчаковою, О. А., Н. Ю. Яковлевою. О. А. Стригою, здобувачем виконано планування та проведення експериментальних досліджень, розроблено методики контролю якості готової лікарської форми та сировини, проведено аналіз, систематизацію та узагальнення одержаних результатів, а також підготовлено матеріали до друку.

Співавторами наукових праць дисертанта захищені такі дисертації:

Ярних Т. Г. «Создание составов, разработка технологии лекарственных препаратов прополиса и их исследование», Харків, 1992; Ковалевська І. В. «Теоретичне та експериментальне обґрунтування створення твердих дисперсій при розробці комплексних препаратів для лікування цукрового діабету II

типу», Харків, 2020; Євтушенко О. М. «Управління галузевими ризиками на етапах реалізацій та споживання лікарських засобів», Харків, 2011; Куценко С. А. «Наукове обґрунтування складу та технології препаратів для комплексної терапії варикозної хвороби вен», Харків, 2015; Грудько В. О. «Синтез, фізико-хімічні властивості і біологічна активність похідних 6-Р-бензтіазоліл-2 амідів маленової кислоти», Харків, 1990; Ханін В. А. «Похідні імідазоліну як інгібітори кислих середовищ», Харків, 1994; Зайченко Г. В. «Фармакологічне обґрунтування створення нового коректора репродуктивних функцій на основі глюкозаміну гідрохлориду», Одеса, 2010; Кухтенко Г. П. «Розробка складу та технології крему з метилпреднізолону ацепонатом», Харків, 2013; Стрілець О. П. «Наукове і експериментальне обґрунтування складу і технології комбінованих таблетованих лікарських форм антигіпертензивної дії», Харків, 2013; Яковлева Н. Ю. «Роль факторов ангиогенеза и протеолитического фермента в прогнозировании развития преэклампсии», Санкт-Петербург, 2018; Горчакова Н. О. «Фармакологические аспекты комплексообразования кардиотропных средств с катионами биометаллов», Київ, 1986.

Визначення мети, шляхів її реалізації, обговорення результатів отриманих даних проведено разом із науковим керівником.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на: IV Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (Шимкент, 2016 р.); I Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні аспекти створення екстемпоральних алопатичних, гомеопатичних і косметичних лікарських засобів» (Харків, 2017 р.); XXIV International scientific and practical conference of young scientists and student «Topical issues of new drugs development» (Харків, 2017 р.); XXV International scientific and practical conference of young scientists and student «Topical issues of new drugs development» (Харків, 2018 р.); III Internstional scientific congress of scientists of Europe «Premier Publishing s.r.o» (Відень, 2019); XXVI International scientific and practical conference of young scientists

and student «Topical issues of new medicines development» (Харків, 2019 р.); Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (Харків, 2019 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій пам'яті доктора хімічних наук, професора Ніни Павлівни Масютіної (до 95-річчя від дня народження) «Planta+. Досягнення та перспективи» (Київ, 2020 р.); Міжнародній науково-практичній дистанційній конференції «Сучасні аспекти створення екстемпоральних алопатичних, гомеопатичних та косметичних лікарських засобів» (Харків, 2020 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 20 наукових праць, а саме: 8 статей у наукових фахових виданнях (2 – у закордонних виданнях, з них 1 індексується наукометричною базою даних SCOPUS), 1 патент на корисну модель, 10 тез доповідей та 1 інформаційний лист.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 225 сторінках і складається зі вступу, огляду літератури, експериментальної частини (розділи 2–5), загальних висновків, списку використаних джерел і додатків. Обсяг основного тексту складає 168 сторінок. Робота містить 54 рисунків та 42 таблиці. Список джерел інформації налічує 187 найменувань, з них 88 кирилицею, 99 латиницею.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ ПЕРСПЕКТИВИ СТВОРЕННЯ ВАГІНАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ ФІТОЕСТРОГЕНІВ (огляд літератури)

1.1 Медико-соціальні та клінічні аспекти вікового естрогенодефіциту у жінок

Чи не найголовнішим глобальним трендом, що впливає на системи охорони здоров'я практично усіх країн світу, змушуючи їх до адаптації та переналаштування, є старіння населення. Стрімке зростання тривалості життя і зиження смертності поряд зі зниженням народжуваності обумовлює збільшення частки людей літнього та похилого віку, що, зі свого боку, змінює епідеміологічну картину та показники захворюваності як у локальному, так і у всесвітньому масштабі. Сьогодні все більшого поширення набувають хвороби і стани, пов'язані з віковими фізіологічними та/або патологічними особливостями людей цієї популяції.

В Україні характерною рисою старіння населення наразі є помітна гендерна асиметрія: майже дві третини осіб, які досягли віку 60 років, – це літні жінки [1]. Тому особливого медико-соціального значення набувають стратегії, спрямовані на збереження здоров'я та забезпечення відповідної якості життя жінок старшої вікової групи.

До суто «жіночих» фізіологічних особливостей у літньому віці та водночас чинників ризику, які провокують розвиток багатьох хвороб, належать менопауза та дефіцит статевих гормонів [2]. Так, за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), у більшості країн світу тривалість життя жінок після 50 років складає 27 – 32 роки, а отже, приблизно третину свого життя жінка знаходиться у стані постменопаузи, який супроводжується дефіцитом жіночих статевих гормонів (ЖСГ) [3].

Клінічно менопаузою, або клімаксом, у жінок вважають припинення менструальних циклів унаслідок вичерпності запасу фолікулів яєчників («природна» менопауза) або їх хірургічного видалення («індукована» або «хірургічна» менопауза). В країнах Європи середній вік природної менопаузи коливається у межах 50,1–52,8 роки, у північноамериканському регіоні – 50,5–51,4 роки, у південнолатиноамериканському регіоні – 43,8–53,0 роки, в азіатських країнах – 42,1–49,5 років [4]. В Україні середній вік настання природної менопаузи становить 48,7 років. У віці до 40 років виділяють передчасну недостатність яєчників, 40–45 років – ранню менопаузу, 46–54 роки – своєчасну менопаузу і від 55 років – пізню менопаузу [5].

Як правило, менопаузальний вік є віком найбільшої соціальної активності жінки, в якому вона з максимальною користю може віддавати суспільству накопичений життєвий і творчий досвід. Але саме у цьому віковому періоді у жіночому організмі відбуваються зміни, що негативно впливають на якість життя. На фоні зниженого продукування ЖСГ і зміни їх співвідношення з'являються вазомоторні симптоми, порушення сну, ендокринно-обмінні та нервово-психічні порушення. Пізніше приєднуються урогенітальні та сексуальні розлади, зміни зовнішності, стану шкіри, остеопороз (ОП) та серцево-судинні захворювання [6,- 10].

У пострепродуктивному періоді життя жінки виділяють певні умовні стадії: 1) менопаузальний перехід – від початку зниження функції яєчників до менопаузи; 2) перименопауза – період, який включає менопаузальний перехід та 1–2 роки після останньої менструації; 3) менопауза – вік останньої менструації; 4) постменопаузальний – від менопаузи до майже повного зникнення функції яєчників [11].

Найсуттєвішим маркером наближення менопаузи є виражене зниження сироваткових рівнів естрогенів, що синтезуються головним чином фолікулярним апаратом яєчників. Серед основних ендогенних естрогенів – естрону (E_1), естрадіолу (E_2) та естріолу (E_3) – найбільш біологічно активним та найдефіцитнішим у період менопаузи є естрадіол.

Естрадіол відповідає в організмі за більш ніж 400 функцій, впливаючи на органи-мішені – матку, піхву, молочні залози. У жінок репродуктивного віку естрадіол є важливим для циклічних змін у тканинах статевих органів, стимулює перебіг першої фази менструального циклу та процес овуляції, активує ріст і проліферацію ендометрія для імплантації зародка. Разом із прогестероном E_2 забезпечує необхідний стан фетоплацентарного комплексу, обміну речовин для збереження та нормального перебігу вагітності, розвитку плоду. Гормон визначає психоемоційні особливості жінки, впливає на формування деяких ділянок мозку, статеву поведінку. Метаболічні ефекти естрадіолу включають загальну анаболічну дію (затримку азоту, натрію, води в організмі, кальцію і фосфору у кістковій тканині, збільшення концентрації глікогену, глюкози, креатиніну, заліза та міді у м'язах), участь у регуляції водно-сольового обміну, антиатеросклеротичний ефект (зниження вмісту холестерину, тригліцеридів, ліпопротеїдів низької щільності у печінці та крові). Крім того, E_2 впливає на функцію надниркових, щитоподібної залози, епіфіза, регулює прийом їжі, витрати енергії, функцію жирової тканини [12].

Отже, вплив дефіциту естрогенів виявляється не лише на рівні статевих органів, які є первинною мішенню цієї групи гормонів, але й усіх систем жіночого організму. Існує думка, що еволюційна причина такого системного впливу пов'язана з іншим гіпоестрогеновим станом – лактацією. При лактації вироблення гормонів естрогенового ряду пригнічується лактотропним гормоном пролактином, що результує у фізіологічних ефектах, подібних до тих, які мають місце при настанні менопаузи. Однак, якщо при лактації зміни у роботі різних систем та органів у відповідь на естрогенодефіцит носять адаптивний характер, то у період менопаузи вони можуть набувати характеру мальадаптації (табл. 1.1) [13].

**Фізіологічні зміни, що виникають у жіночому організмі у відповідь на
дефіцит естрогенів – лактація vs менопауза**

Наслідки естрогенового дефіциту	Адаптивні зміни при лактації	Мальадаптація при менопаузі
Підвищення артеріального тиску	Підтримання необхідного капілярного кровотоку в молочних залозах	Розвиток артеріальної гіпертензії, кардіоваскулярних захворювань
Підвищення ензиматичної активності ліпопротеїніпази	Підвищення ліпідів у крові та, як результат, у материнському молоці для його енергетичного збагачення	Розвиток атеросклерозу, кардіоваскулярних захворювань
Резорбція кальцію з кісткової тканини	Вивільнення кальцію з кісток для продукування материнського молока	Демінералізація кісток, остеопороз, переломи кісток
Зміни у терморегуляції	Підтримання температури тіла новонародженого за рахунок додаткового виділення тепла організмом матері	Гарячі припливи, нічна пітливість

Клінічні прояви менопаузального дефіциту ЖСГ дістали назву клімактеричного синдрому, в якому можна виділити чотири групи найхарактерніших ранніх симптомів – вазомоторні розлади, порушення сну, психоемоційні та урогенітальні порушення [14]. До більш пізніх наслідків дисбалансу статевих гормонів у літніх жінок відносять порушення жирового обміну з розвитком ожиріння та/або атеросклерозу, метаболічного синдрому, цукрового діабету, постменопаузальний остеопороз, артеріальну гіпертензію, ішемічну хворобу серця, хворобу Альцгеймера тощо [15].

Вазомоторні розлади вражають 60–85 % жінок у менопаузальному переході та можуть тривати 1–5 років, а у 10 % жінок – 7–10 років після настання менопаузи [16], хоча частота, тривалість і тяжкість вазомоторних розладів характеризуються широкою індивідуальною варіабельністю. Ці

симптоми маніфестують як спонтанні припливи жару до верхньої половини тулуба і голови, що тривають від кількох секунд до 30 хв і характеризуються підвищенням температури шкіри, розширенням периферичних судин, транзиторною тахікардією та пітливістю. Механізми, що викликають вазомоторні симптоми, остаточно не з'ясовані. Найвірогідніше, їх виникнення зумовлено конфліктом у гіпоталамо-гіпофізарній системі. Гіпоестрогенія сприяє збільшенню гіпоталамічного вивільнення норадреналіну та серотоніну, які, зі свого боку, знижують «задану величину» терморегуляторного центру і таким чином запускають надмірний викид тепла. Далі вмикаються механізми охолодження та потовиділення, які можуть супроводжуватись ознобом, а тіло покривається «гусячою шкірою» [17, 18].

На порушення сну страждають 16–42 % жінок у період менопаузального переходу, 39–47 % жінок у перименопаузі та 35–60 % жінок у постменопаузі [19]. Типові розлади включають сонливість, погане засипання, часті спонтанні пробудження уночі та/або раннє ранкове пробудження. До однієї з причин розладів сну у пери- та постменопаузі відносять вазомоторні симптоми [20]. З іншого боку, менопаузальні проблеми зі сном можуть бути безпосередньо зумовлені естрогеновим дефіцитом. По-перше, з рівнем естрогенів пов'язаний метаболізм нейромедіаторів норадреналіну, серотоніну та ацетилхоліну, які впливають на режим сну. Доведено, що замісна естрогенна терапія зменшує затримку засипання, кількість спонтанних пробуджень і збільшує загальну тривалість сну. По-друге, естрогени мають регулювальний вплив на температуру тіла. Було показано, що у ссавців естрогени відіграють певну роль у зниженні природної температури тіла уночі. При нестачі естрогенових гормонів у плазмі крові зниження температури відстрочується у часі, також зміщується вгору глибина падіння нічної температури тіла [20].

Надзвичайна лабільність вищої нервової системи є ще однією особливістю клімактеричного синдрому, що виявляється збільшеною дратівливістю, неадекватними реакціями на звичайні побутові подразники, зниженням настрою, депресією, зниженням уваги, пам'яті тощо. Окремі

психопатологічні симптоми у жінок 45–50 років виявляються: дратівливістю – 92 %, втомлюваністю – 88 %, зниженням настрою – 88 %, порушенням пам'яті – 64 %, істеричними нападами – 42 %. Крім того, у 16–30 % жінок у перименопаузі відмічаються ті або інші емоційно-афективні порушення: різні форми депресії, тривожні та панічні розлади, фобії, нав'язливі стани [21].

Менопаузальну психопатологічну симптоматику також можна вважати наслідком естрогенового дефіциту. Дисбаланс ЖСГ може розглядатися як безпосередня причина психоемоційних розладів, так і тригер, що порушує гіпоталамічну нейромедіаторну рівновагу, передусім норадреналіну та серотоніну [22]. На користь підтвердження ролі дефіциту естрогенів у розвитку психоемоційних порушень свідчать порівняльні дослідження щодо депресивних проявів у жіночих групах з хірургічною менопаузою та природною перименопаузою. За одержаними результатами, жінки, в яких були хірургічно видалені яєчники, мали статистично значуще більші депресивні і тривожні показники. При цьому замісна естрогенова терапія сприяла зменшенню вираженості цих симптомів в обох групах [23]. Суттєвий негативний вплив на настрій і загальний психологічний стан жінок, очевидно, мають й інші прояви клімактеричного синдрому: вазомоторні симптоми, розлади сну, а також урогенітальні порушення.

Сечостатеві симптоми відзначаються у 10 % жінок у перименопаузі, у 55–60 років їх частота сягає 50 %, а після 75 років практично всі жінки страждають від тих чи інших урогенітальних розладів [24]. Слід зазначити, що досить часто жінки не звертаються за медичною допомогою та не отримують будь-якого лікування, вважаючи урогенітальні симптоми природними проявами старіння. Так, результати міжнародного опитування жінок віком 55–65 років щодо вагінальної атрофії показали, що лише 30 % респонденток, які страждали на вагінальний дискомфорт, були готові говорити про ці симптоми лікарю-гінекологу [25]. Однак, на відміну від вазомоторних симптомів, урогенітальна симптоматика без лікування не покращується з часом, а лише прогресує, призводячи до функціональних і анатомічних змін [26, 27].

Сечостатева система є надзвичайно чутливою до естрогенів, тому коливання їх рівня, що виникає під час менопаузального переходу, та його стійке зниження після менопаузи спричиняють певні тканинні зміни з характерною патологічною симптоматикою. У клінічній картині клімактеричних урогенітальних розладів виділяють симптоми, пов'язані з атрофією піхви (вульвовагінальна атрофія), і розлади сечовипускання (цистоуретральна атрофія).

Негативні явища у сечостатевій сфері й асоційована з ними сексуальна дисфункція можуть бути важливими психологічними факторами розвитку депресивних станів, що, зі свого боку, призводить до порушення сну у жінок під час та після менопаузи [28, 29]. Крім того, урогенітальні симптоми можуть безпосередньо погіршувати сон у клімактеричний період. Так, за даними опитування, проведеному у жінок із симптомами постменопаузальної вагінальної атрофії, урогенітальні розлади не лише негативно впливають на задоволення під час статевого акту (у 59 % респонденток), але й спричиняють порушення нічного сну (24 %) та знижують загальне відчуття вдовolenості життям (23 %) [30].

Отже, найхарактерніші прояви клімактеричного синдрому не тільки мають спільний етіологічний фактор їх виникнення – дефіцит гормонів естрогенового ряду, але й можуть взаємообумовлювати маніфестацію або загострення один одного (рис. 1.1). Враховуючи вкрай негативний вплив усіх цих симптомів на психологічний стан жінок старшої вікової групи, їх самооцінку, сімейні відносини, працездатність, проблема надання належної терапевтичної та профілактичної допомоги літнім пацієнткам має не лише важливе медичне, але й соціальне значення.

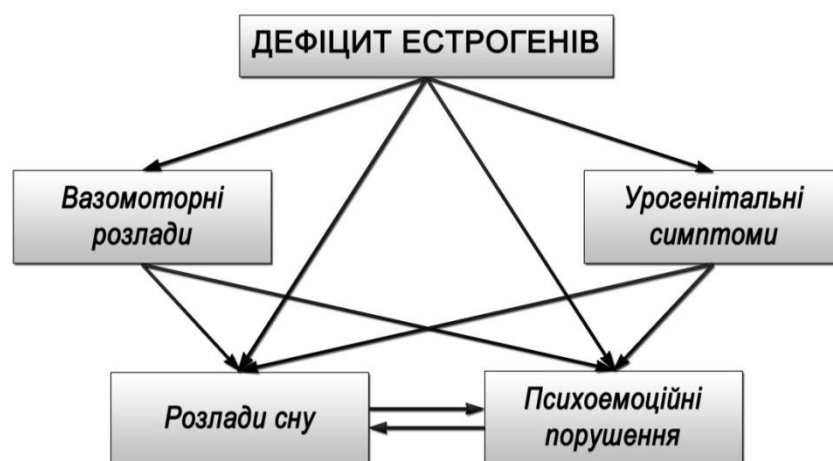


Рис. 1.1 Причинно-наслідковий взаємозв'язок дефіциту естрогенів та основних симптомів клімактеричного синдрому

1.2 Генітоуринарний синдром у менопаузі: механізми патогенезу та підходи до фармакотерапевтичної корекції

Згідно із сучасними уявленнями генітоуринарний синдром у менопаузі (ГУСМ) – це симптомокомплекс вторинних ускладнень, пов'язаних із розвитком атрофічних і дистрофічних процесів у естрогенозалежних тканинах і структурах нижньої третини урогенітального тракту (нижній третині сечоводів, сечовому міхурі, уретрі, піхві), а також у зв'язковому апараті малого таза та м'язах тазового дна. Цей термін був колегіально узгоджений у 2013–2014 рр. такими фаховими спільнотами, як Міжнародна асоціація фахівців із вивчення сексуального здоров'я жінок (ISSWSH) та Північноамериканська спільнота фахівців з менопаузи (NAMS), на заміну донедавна застосовуваним термінам «вульвовагінальна атрофія» й «атрофічний вагініт», які були визнані недостатніми для позначення усієї сукупності проявів гіпоестрогенії у структурах сечостатевої системи [31 – 33].

Відомо, що фізіологічний вплив естрогенів на чутливі до них органи і тканини реалізується через їх взаємодію з естрогеновими рецепторами (estrogen receptors – ER), що являють собою макромолекулярні білки. ER функціонують як ліганд-активовані транскрипційні фактори, основними з яких

є ядерні рецептори альфа (ER- α) і бета (ER- β). Ці рецептори ідентифіковані не лише у клітинах жіночих статевих органів, а й у тканинах сечової системи, мозку, серця, артерій, кісткової тканини, шкіри, слизової оболонки рота, гортані, очей та ін. [34]. Втім первинними мішенями для дії естрогенів, а отже, мішенями, які першочергово уражає естрогеновий дефіцит, є тканини сечостатевої системи.

Зв'язок репродуктивної та сечової систем, зокрема щодо естрогенної залежності, обумовлений їх спільним джерелом ембріонального походження: піхва, уретра, сечовий міхур і нижня третина сечоводів розвиваються з уrogenітального синуса. Це пояснює наявність у всіх цих тканинах рецепторів до естрогенів, прогестерону та андрогенів. Тому естрогенодефіцитні процеси старіння уrogenітального тракту виявляються у двох напрямках, а саме: розвиток вульвовагінальної атрофії та розвиток цистоуретральної атрофії з явищами порушення контролю сечовипускання або без нього. Вульвовагінальні і цистоуретральні симптоми та їх можливі ускладнення при ГУСМ узагальнено у табл. 1.2 [35].

До клінічних проявів ГУСМ також відносять і характерні порушення у сексуальній сфері жінок, що виникають на тлі вульвовагінальної атрофії: втрату статевого потягу, відсутність статевого збудження, недостатність рубрикації, диспареунію, дисоргазмію, кровотечу або кров'янисті виділення під час статевого акту [36].

Єдине ембріональне походження структур сечової та статевої систем зумовлює спільність патогенетичних механізмів, які мають місце на тлі менопаузальної гіпоестрогенії. Тим не менше, найбільш виражено серед усіх структур уrogenітального тракту атрофічні процеси перебігають у піхві.

Це співвідноситься з тим фактом, що піхва являє собою орган жіночого організму з найвищою щільністю рецепторів естрогену на одиницю площі поверхні. Відомо, що у клітинах вагінальної стінки виявлені обидва типи ядерних рецепторів естрогену, проте якщо ER- α наявні і в репродуктивному, і

в постменопаузальному періоді, то ER- β повністю відсутні або мають низьку експресію у жінок у постменопаузі.

Таблиця 1.2

**Вульвовагінальні і цистоуретральні симптоми та їх можливі ускладнення
при генітоуринарному синдромі у менопаузі**

Симптоми	Можливі ускладнення
Вульвовагінальні симптоми	
– вагінальний та/або тазовий біль – вагінальна сухість – відчуття печіння, подразнення та свербіж у піхві – зниження тургору та еластичності статевих губ та вагінального каналу – біль у надлобковій ділянці – виділення з піхви (лейкорей) – дрібні крововиливи (екхімози) та/або плямисті геморагії (петехії) на слизовій оболонці піхви – почервоніння слизової оболонки піхви – стоншення/блідість вагінального епітелію – витончення/випадання лобкового волосся – зменшення вагінальної складчастості – підвищена травмованість слизової оболонки піхви	– атрофія статевих губ – атрофія та ураження вульви – атрофія бартолінових залоз – олужнення вагінального середовища (рН 5–7) – зменшення піхвової та цервікальної секреції – пролапс тазових органів – випадіння зводу піхви – вагінальний стеноз та укорочення піхви
Цистоуретральні симптоми	
– збільшення частоти сечовипускання – невідкладні (ургентні) позиви до сечовипускання – підтікання сечі після сечовипускання (дриблінг) – переривання нічного сну один чи більше разів за ніч через необхідність здійснення акту сечовипускання (ноктурія) – стресове нетримання сечі – болісне і часте сечовипускання – гематурія – хронічні інфекції сечостатевого тракту	– ішемія сечоміхурного трикутника (трикутника Льюто) – меатальний стеноз (звуження) уретри – грижа сечового міхура – випадіння прямої кишки – уретральний пролапс – атрофія сечовипускного каналу – випадіння матки – уретральні поліпи або карункули

Стінки піхви, уретри та сечового міхура складаються з гладкої мускулатури, сполучної тканини та слизової оболонки. Вагінальна слизова

оболонка утворена чотирма шарами епітеліальних клітин: базальним, парабазальним (або мітотично-активним), проміжним глікогеновмісним і поверхневим. Рецептори естрогену розташовуються здебільшого у базальному і парабазальному шарах і практично відсутні у проміжному і поверхневому шарах слизової оболонки піхви. Дефіцит естрогенів блокує мітотичну активність базального і парабазального шарів, а отже, проліферацію епітелію вагінальної стінки. Процес ексфоціації (злушення) віджилих поверхневих клітин триває з тією ж інтенсивністю, але їх відтворення знижується, що призводить до неухильного зменшення кількості шарів та стоншення вагінального епітелію. Поступово інтенсивність ексфоціації вагінальних епітеліальних клітин знижується, що, відповідно, викликає зменшення вивільнення цими клітинами глікогену, який є живильним середовищем для лактобацил – основного компонента вагінального біотопу. Лактобактерії завдяки продукуванню ними молочної кислоти беруть участь у підтриманні оптимального значення рН вагінального середовища у межах 3,5–4,5 (рис. 1.2), що, зі свого боку, запобігає виникненню інфекційних захворювань у піхві та подальшому розвитку висхідної урологічної інфекції. В умовах гіпоестрогенії у піхві порушується мікробіотична рівновага: відбувається часткова або повна елімінація лактобацил, рН вагінального середовища зміщується у бік олужнення (5,5–6,8) і починає переважати грамнегативна фекальна мікрофлора та інші патогенні й умовно-патогенні мікроорганізми [37 – 40].

Естрогенний дефіцит супроводжується зниженням кровообігу в органах малого таза, що призводить до ішемії тканин сечостатевої системи. Зменшується діаметр артерій піхви, знижується кількість дрібних судин і стоншуються їх стінки, що веде до зменшення транссудації. Подібні зміни спостерігаються у венах і венозних сплетеннях піхви, розташованих субепітеліально. Активним дилататором, що впливає на стан судинних сплетінь, вважається вазоактивний інтерстиціальний поліпептид, синтез якого у стінці піхви є також естрогенозалежним [41].

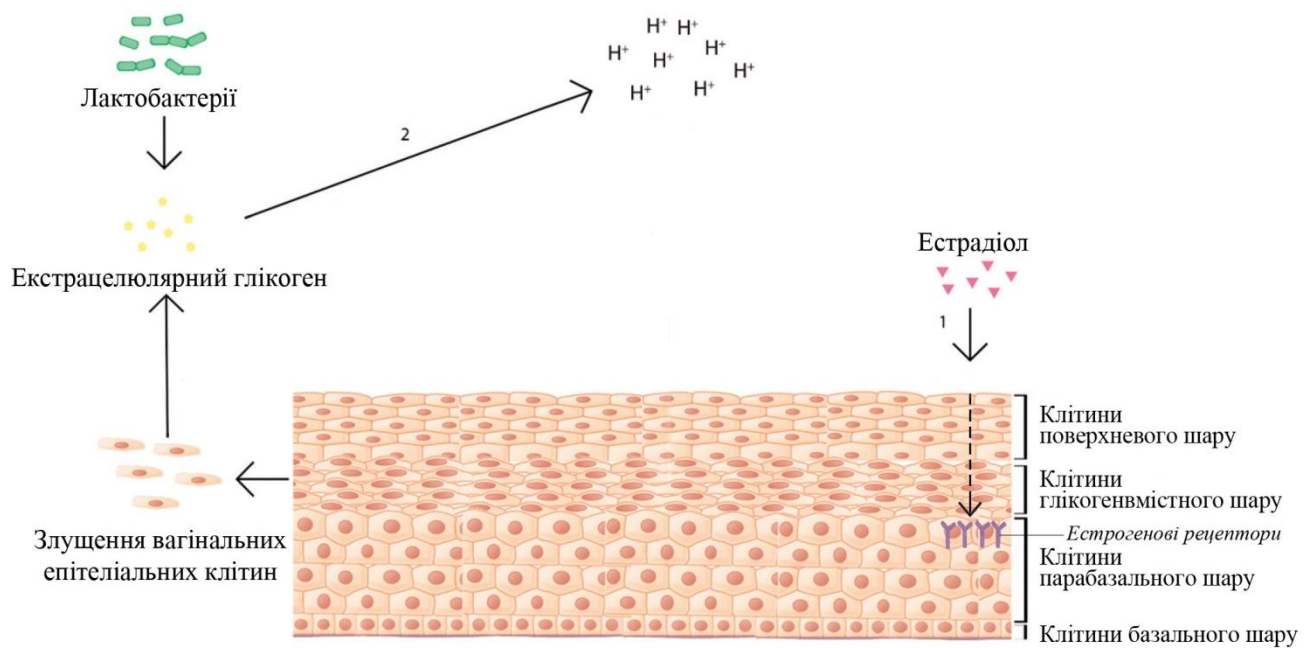


Рис. 1.2 Механізм фізіологічної регуляції рН вагінального середовища: 1 – естрогенопосередкована проліферація вагінального епітелію; 2 – розщеплення лактобактеріями глікогену, що вивільнився зі злущених епітеліальних клітин, з утворенням молочної кислоти

На фоні ішемії тканин уrogenітального тракту відбувається розрощення сполучної тканини, що характеризується деструктуризацією (гіалінізацією) колагенових волокон і фрагментацією еластичних волокон. Зміна структури колагену спричиняє втрату еластичності тазових структур та порушення функції сфінктерів сечового міхура, що провокує стресове нетримання сечі, а зменшення еластичності та розтяжності стінки піхви у поєднанні з вагінальною сухістю призводить до диспареунії [42].

У зв'язку з тим, що тонус гладкої мускулатури вагінальної стінки, як і уретри, забезпечується естрогеночутливими норадренергічними нейронами, нестача естрогенів може призводити до розвитку атонії вагінальних стінок та їх опущення (пролапс), а зниження сенсорного порогу в ділянці трикутника Льюто у відповідь на розтягнення сечового міхура та погіршення показників тиску у сечовипускальному каналі провокує ургентні позиви.

Головною метою лікування ГУСМ є полегшення його симптомів. Беручи до уваги патогенез ГУСМ, стандартом його фармакотерапевтичної

корекції на сьогоднішній день є системне або локальне гормональне лікування естрогенами. Усі види естрогенозамісної терапії, як системної, так і локальної, виявляють ефекти у таргетних зонах незалежно від форми прийому: досить швидко покращується індекс дозрівання і товщина слизової оболонки піхви, знижується рН вагінального середовища і зменшуються симптоми вагінальної атрофії [43]. Однак застосування системних препаратів (таблеток, трансдермальних пластирів) накладає низку обмежень, зокрема викликає необхідність проведення додаткових діагностичних обстежень і процедур для профілактики ендометріальної неоплазії або гормонозалежного раку грудної залози. Тому до системної терапії вдаються, коли симптоми ГУСМ не єдині прояви клімактеричного синдрому і необхідно усунути припливи, а також у перспективі запобігти втраті кісткової тканини. Якщо симптоми ГУСМ є основними або чомусь системні ефекти від використання естрогенів небажані, перевагу віддають локальним естрогеновим препаратам.

Локальні естрогени включають 17β -естрадіол, естрадіол ацетат, естрадіол гемігідрат, кон'юговані естрогени та естріол у вигляді вагінальних кремів, супозиторіїв, таблеток. Серед природних естрогенів саме естріол (E_3) характеризується найкоротшим періодом напіввиведення і найменшою біологічною активністю, маючи при цьому високу селективність до естрогенних рецепторів уретри, сечового міхура і піхви при порівняно незначному зв'язуванні з естрогенними рецепторами в інших тканинах [44]. Втім, хоча локальна естрогенна терапія, як правило, вважається безпечною для більшості жінок із симптомами вагінальної атрофії при ГУСМ, вона має низку протипоказань. Інтравагінальне застосування препаратів естрогенового ряду протипоказане при недіагностованих вагінальних або маткових кровотечах, а також у пацієнток з естрогенозалежною неоплазією (наприклад, з раком молочної залози або ендометрію), оскільки естрогени характеризуються доброю перкутальною проникною здатністю: так, при застосуванні вагінальних лікарських форм ЖСГ сироватковий рівень естрогенів у середньому збільшується майже втричі порівняно з їх початковим рівнем до

проведення терапії (від 11 до 30 пг/мл відповідно) [45]. Крім того, при локальній естрогенозамісній терапії можливі такі побічні явища, як місцеві реакції у вигляді подразнення або свербіжу, зміни характеру виділень з піхви, вагінальні кровомазання, болісні відчуття у грудях та парестезії. Слід також враховувати, що існує проблема негативного ставлення жінок до гормональних лікарських засобів.

Для локальної негормональної терапії вульвовагінальних проявів ГУСМ зазвичай застосовують вагінальні лубриканти (на водній, силіконовій або олійній основах) та місцевозволожувальні засоби. Згідно з рекомендаціями NAMS першочергове лікування жінок з вульвовагінальними симптомами ГУСМ передбачає використання під час статевого акту негормональних лубрикантів у поєднанні з регулярним застосуванням вагінальних зволожувальних засобів тривалої дії [46].

Дія вагінальних лубрикантів полягає у зменшенні подразнення атрофованого епітелію, що пов'язано з тертям під час статевого акту. З погляду зручності застосування найкращими є лубриканти на водній основі, які, на відміну від силіконових чи олійних засобів, не залишають слідів на білизні. Крім того, наразі недостатньо даних щодо безпечності лубрикантів на олійній основі, зокрема стосовно їх впливу на рухливість сперматозоїдів та захисні властивості презервативів. Також є інформація, що застосування таких засобів підвищує ризик розвитку бактеріального вагінозу та вагінального кандидозу [47].

Вагінальні зволожувальні засоби тривалої дії, крім власне зволоження слизової піхви та усунення вагінальної сухості, сприяють зниженню рН вагінального середовища до рівнів репродуктивного стану, хоча вони і не поліпшують дозрівання клітин вагінального епітелію. Так, повідомлялося, що ефективність зволожувальних засобів на основі гіалуронової кислоти (ГК) у полегшенні вульвовагінальних симптомів є порівнянною з препаратами естрогенів для вагінального застосування і може розглядатися як альтернатива локальної естрогенозамісної терапії [48, 49]. ГК є одним із компонентів

міжклітинного матриксу сполучної тканини. Відмінною властивістю цього глікозаміноглікану є здатність зв'язувати дуже великі кількості води, що сприяє підтриманню пружності та зволоженню епітеліальних тканин шкіри та слизових оболонок. ГК відіграє провідну роль у забезпеченні цілості тканин, полегшує міграцію імунокомпетентних клітин при запаленні, пригнічує міграцію вірусів і бактерій, виявляє антиоксидантну дію, стимулює процеси репарації та відновлення тканин [50]. Крім того, ГК відіграє велику роль у процесі ранозагоювання, оскільки на стадії репарації відзначається підвищення її концентрації в пошкоджених тканинах, що приводить до активації проліферації епітеліальних клітин. Також ГК підсилює фагоцитарні властивості клітин, що дозволяє збільшити ступінь очищення рани від некротичних елементів.

Окремо слід відзначити високі захисні властивості ГК. Надлишок ГК, що перевищує пропускну здатність епідермісу, залишається на поверхні шкіри або слизової, утворюючи в'язкий захисний шар із кислотними властивостями, який створює несприятливі умови для життєдіяльності патогенних бактерій. Молекулярна маса ГК кислоти варіює в широких межах залежно від джерела отримання. ГК, що виявлена в природних об'єктах, має масу від 5000 до 20000000 Да. Середня молекулярна маса в синовіальній рідині людини складає 140000 Да [51 – 53]. Молекула ГК виявляє різні властивості залежно від довжини полісахаридного ланцюга. Існує три види ГК: низько-, середньо- і високомолекулярна. Кислота з коротким полісахаридним ланцюгом має протизапальну дію, її застосування поширено при лікуванні різних пошкоджень шкірного покриву: ранові процеси, трофічні виразки, висипи [54, 55]. Саме цей вид ГК найчастіше використовується в косметологічних засобах для зовнішнього застосування, оскільки може глибоко проникати в шкіру, не втрачаючи своїх властивостей. Проникаючи в глибокі шари епідермісу, ГК може виявляти функції активного транспорту і бути переносником різних активних інгредієнтів. Середньомолекулярна ГК застосовується при лікуванні артритів і різних захворювань суглобових тканин, оскільки запобігає міграції і

розмноженню клітин. Високомолекулярна ГК здатна утримувати велику кількість молекул води, стимулює клітинні процеси в шкірі, виявляючи репаративну та зволожувальну дію, вона гірше проникає в шкіру, її вводять шляхом ін'єкцій та електрофорезу. Розчини ГК мають особливі реологічні властивості, що дозволяють полімеру бути в'язкопружним гелем при високих концентраціях [56].

Сукупність усіх цих властивостей робить ГК одним із найперспективнішим компонентів для включення до складу засобів локальної терапії симптомів ГУСМ.

Ще одним напрямом у сфері пошуку нових лікарських препаратів для ефективної та безпечної локальної терапії ГУСМ стало дослідження фітоестрогенів – засобів рослинного походження, які виявляють естрогеноподібну активність [57 – 59].

1.3 Можливості застосування фітоестрогенів з метою корекції генітоуринарного синдрому в менопаузі

Термін «фітоестрогени» використовується для позначення групи нестероїдних поліфенольних сполук рослинного походження або продуктів їх *in vivo* метаболізму, які здатні імітувати чи модулювати фізіологічну дію ендогенних естрогенів. Естрогеноподібна активність фітоестрогенів обумовлена структурною схожістю їхніх молекул з ендогенним 17 β -естрадіолом, за рахунок чого вони можуть зв'язуватися з ER. Враховуючи численні ефекти естрогенів, зокрема щодо жіночого організму, багато дослідників наразі розглядають фітоестрогени як найперспективніші активні інгредієнти для створення нових ефективних та безпечних засобів терапії та профілактики багатьох естроген-опосередкованих захворювань та патологічних станів.

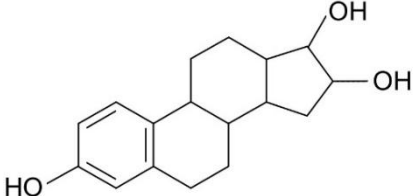
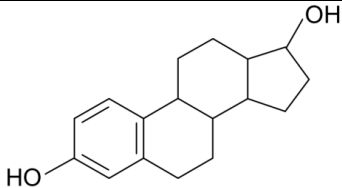
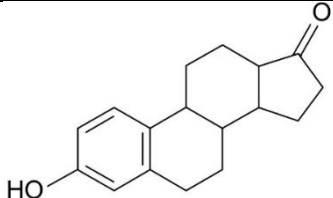
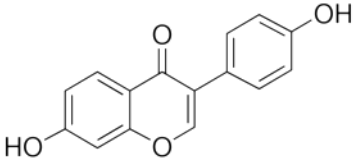
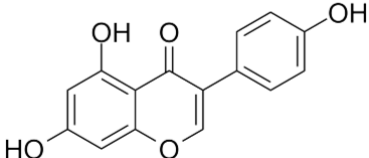
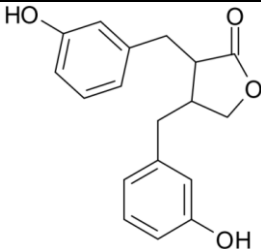
Виділяють три основних класи рослинних метаболітів, які можуть бути віднесені до фітоестрогенів: ізофлавоони, лігнани та куместани. Також до

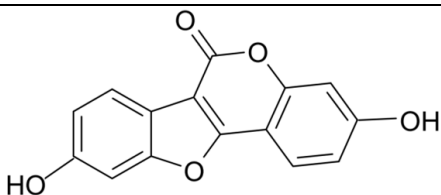
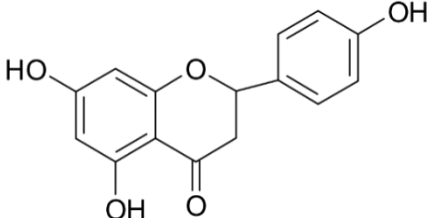
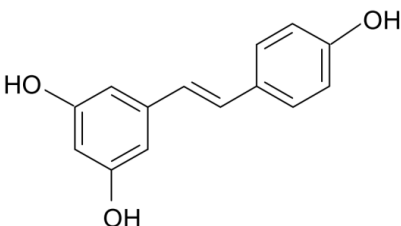
нестероїдних естрогеноподібних речовин природного походження відносять деякі флавоноїди та стилбени (табл. 1.3). Вважається, що своєю спорідненістю до зв'язування (афінністю) з ER фітоестрогени зобов'язані деяким особливостям їхньої молекулярної будови: планарною структурою кілець, наявністю двох ароматичних циклів, розділених двома проміжними атомами карбону, та певною відстанню між гідрофобними та водневими зв'язками. Хоча більшість фітоестрогенів характеризуються набагато слабкішою, ніж ендogenous естрогени, спорідненістю до ER, вони здатні виявляти суттєві естрогенні або антиестрогенні ефекти у тканинах та органах репродуктивної системи [60]. Характер дії фітоестрогенів визначається не тільки їх здатністю бути відповідним «ключем» до «замка-рецептора», але й здатністю «ключа» «відкривати замок», стимулюючи в клітині специфічний синтез. В останньому випадку фітоестрогени виявляють естрогенні властивості. За відсутності такої можливості фітоестрогени можуть виступати як антиестрогенні агенти.

Найбільш вивченими фітоестрогенами є ізофлавоноїди, основними з яких є даїдзєїн та геністеїн. Відомо, що ізофлавоноїди виявляють проестрогенний або антиестрогенний ефект залежно від рецепторної характеристики тканини та рівня насиченості організму ендogenous естрогенами. Так, афінність геністеїну до ER- α становить лише 5 % від афінності естрадіолу, а зв'язування геністеїну з ER- β – 36 %, що наближується до такого в естрон. Поряд з тим, на відміну від естрону, ізофлавоноїди не здатні перетворюватися на естрадіол або 16 α -гідроксіестрон, тому вони є безпечними з погляду гормоностимульованої гіперплазії тканин, зокрема неопластичних.

Обговорюється навіть протективний ефект фітоестрогенів щодо естрогензалежної, зокрема злоякісної, клітинної проліферації тканин ендометрію та грудної залози [61].

Хімічна структура та природні джерела речовин з естрогенною активністю – ендогенних жіночих статевих гормонів та фітоестрогенів

Клас речовин	Основні представники	Структурна формула	Джерела надходження
1	2	3	4
Жіночі статеві гормони	Естріол		Фолікулярний апарат яєчників
	Естрадіол		
	Естрон		
Ізофлавони	Дайдзеїн		Соя, червона конюшина, циміцифуга
	Геністеїн		
Лігнани	Ентеролігнан		Насіння льону та кунжуту, поверхневий шар зернових, овочі та фрукти

1	2	3	4
Куместани	Куместрол		Сосні боби, люцерна
Флаволи	Апігенін		Петрушка, фенхель, ромашка
Стильбени	Ресвератрол		Шкірка винограду, червоне вино, лушпиння арахісу та фісташки

Більш слабке, у порівнянні з ендogenousними гормонами, зв'язування ізофлавонів не заважає їм конкурувати з естрадіолом за рецептори і таким чином знижувати його ефекти при надмірній естрогенній насиченості. В умовах естрогенного дефіциту ізофлаволи виявляють гормоноподібну активність, не перешкоджаючи зв'язуванню з рецепторами незначних кількостей ендogenousного естрадіолу. Тобто фітоестрогени діють як селективні модулятори ER, забезпечуючи, залежно від естрогенної насиченості, слабкий антиестрогенний або естрогенний вплив.

У багатьох наукових працях було продемонстровано, що системне застосування фітоестрогенів сприяє зменшенню інтенсивності менопаузальних розладів, таких, як приливи, кардіопатії, остеопороз, проатерогенні зміни ліпідного профілю крові [62], доведено їх позитивний вплив на регуляцію артеріального тиску, функцію ендотелію, когнітивні характеристики [63], стан шкіри [64], хоча за ефективністю вони і поступаються ендogenousним ЖСГ. На основі природних фітоестрогенів створено низку алопатичних, гомеопатичних та дієтичних добавок (Мастодинон,

Клімадинон, Циклодинон, Іноклім, Клімаксан, Ременс, Естровел, Фемікапс, Онагрис та ін.).

За останні декілька десятиліть були проведені дослідження з оцінки ефективності фітоестрогенів у полегшенні урогенітальних симптомів у перита постменопаузі. Так, у низці рандомізованих клінічних випробувань було оцінено вплив інтравагінального застосування ізофлавонів на симптоми менопаузальної вагінальної атрофії. В одному з експериментів дію вагінальних супозиторіїв геністеїну порівнювали з гіалуноровою кислотою в аналогічній лікарській формі. Жінки, які страждали на вагінальну атрофію, застосовували досліджувані препарати протягом 15 днів поспіль. Після 12 тижнів від початку випробувань встановлено поліпшення показників стану піхви порівняно з їх вихідним рівнем в обох групах, але геністеїн виявився більш ефективним, ніж ГК. В іншому дослідженні було продемонстровано, що за ефективністю полегшення симптомів сухості у піхві та диспареунії вагінальне застосування 4 % ізофлавонового крему є порівнянним з 0,5 % кремом на основі кон'югованих естрогенів та достовірно перевершує плацебо. Ще в одній праці показано, що використання комбінованого вагінального гелю на основі ізофлавонів, *Lactobacillus sporogenes*, екстракту календули та молочної кислоти у поєднанні з пероральним прийомом таблетованої форми соєвих ізофлавонів значно зменшувало інтенсивність свербіж, еритеми і сухості у піхві порівняно із застосуванням лише таблеток [65].

Клінічно досліджено ефективність етанольного екстракту фенхелю у вигляді 5 % вагінального крему за показниками рН вагінального середовища та індексом дозрівання піхвового епітелію у жінок із симптомами вагінальної сухості та диспареунії порівняно з кремом плацебо. Результати дослідження показали, що використання крему з екстрактом фенхелю впродовж 8 тижнів сприяло значному збільшенню кількості клітин поверхневого шару вагінального епітелію поряд з істотним зменшенням клітин проміжного та парабазальних шарів. Крем з екстрактом фенхелю знижував рівень рН у піхві у 100 % випадків порівняно із 7,4 % у групі плацебо. Крім того, рослинний

вагінальний крем покращував суб'єктивну симптоматику у жінок, знижуючи вагінальний свербіж, сухість і диспареунію [66].

Чимало наукових публікацій свідчать про суттєву користь ресвератролу в профілактиці та полегшенні менопаузальних розладів [67 – 70]. Ресвератрол (3,5,4-тригідростильбен) – це природний фітоалексин групи рослинних поліфенолів, який синтезується у листях винограду та є у червоному вині. Встановлено, що ресвератрол, на відміну від інших фітоестрогенів, зв'язується з приблизно однаковою спорідненістю як з ER- α , так і ER- β . Фітоестрогенна активність ресвератролу обумовлює його призначення при клімактеричному синдромі, естрогенасоційованих метаболічних порушеннях, остеопорозі. Як показали результати пілотного випробування, ресвератрол ефективно зменшує частоту вазомоторних епізодів та покращує загальну якість життя у пацієнток з хірургічно індукованою менопаузою. Тривале дослідження у групі жінок віком від 45 до 85 років у постменопаузі підтвердило, що регулярне вживання ресвератролу покращує когнітивні та цереброваскулярні функції й у подальшому попереджає їх послаблення, пов'язане з постменопаузальними та загальновіковими змінами. В *in vitro* випробуваннях ресвератрол підвищував кількість остеобластів у кістковій тканині та інтенсифікував остеогенез на фоні зменшення адипоцитів, а при застосуванні у жінок у період постменопаузи впродовж 14 тижнів приводив до зменшення хронічного болю, спричиненого остеоартритом. Також наявні експериментальні дані, які вказують на те, що при інтравагінальному застосуванні ресвератрол утримується у клітинах слизової оболонки піхви, не всмоктуючись у системний кровотік [71]. Слід зазначити, що ресвератрол міститься у складі деяких комплексних клімактеричних препаратів та дієтичних добавок для перорального застосування, але дані стосовно його локального застосування при симптомах вагінальної атрофії відсутні. Отже, враховуючи окреслені механізми естрогеноміметичної активності ресвератролу, перспективними є дослідження у напрямку розробки та випробування його вагінальних лікарських форм для місцевого лікування та профілактики проявів ГУСМ.

1.4 Біофармацевтичні аспекти розробки та дослідження вагінальних лікарських форм

Вагінальне застосування лікарських препаратів традиційно передбачає локальну терапевтичну дію, хоча при цьому певні лікарські речовини можуть піддаватися всмоктуванню крізь слизову піхви та потрапляти у системний кровотік. Зокрема, проникність вагінальної слизової оболонки виявилася вищою, ніж у слизовій кишечника для таких речовин, як вода, 17β -естрадіол, пропранолол [72, 73]. Тому деякі автори розглядають вагінальний шлях введення як можливий спосіб системної доставки ліків, що обґрунтовується відсутністю низки негативних факторів, притаманних пероральному прийому: побічної дії з боку органів травлення, зниження ефективності або дезактивації активних речовин під дією травних соків та ферментів, взаємодії лікарських речовин з компонентами їжі у шлунку тощо [74]. Тим не менше, незважаючи на усі потенційні переваги, поки що вагінальні лікарські засоби системної дії не набули поширення через гендерну специфічність та відмінності, пов'язані з циклічними та віковими змінами стану піхви та її середовища [75].

Головною проблемою інтравагінального способу застосування є фізіологічні механізми вимивання, які діють у просвіті піхви, обмежуючи знаходження лікарського засобу на вагінальній стінці. Це перешкоджає досягненню та/або підтриманню ефективної терапевтичної концентрації препарату в місці аплікації [76, 77]. Саме тому при розробці вагінального лікарського препарату важливо приділити увагу мукоадгезивним властивостям лікарської форми (ЛФ), тобто її здатності утримуватися на слизовій оболонці.

Мукоадгезію можна визначити як контактну взаємодію між лікарським засобом та компонентами слизу, що секретується клітинами слизової оболонки [78]. Основними складовими слизу є муцини – високоглікозильовані глікопротеїни, субодиниці яких зв'язані дисульфідними містками, що формують у просторі розгалужену макромолекулярну мережу. Завдяки такій

структурі муцини здатні до захоплення великої кількості води, створюючи при цьому на слизовій дуже гідратований в'язкопружний шар, який перешкоджає фіксації на поверхні епітелію патогенних мікроорганізмів, а одночасно й лікарських засобів [79, 80].

У середині минулого століття було відмічено, що введення до складу лікарських препаратів деяких полімерних речовин, наприклад, камедей, подовжує час перебування нанесеного засобу на поверхні слизової та підвищує ефективність антибіотикотерапії. Упродовж подальших десятиліть у межах розвитку теорії мукоадгезії й у міру вдосконалення методів дослідження мукоадгезивні властивості були встановлені у багатьох полімерів, дозволених до застосування у фармації [81, 82].

Мукоадгезивні полімери можна класифікувати на природні та синтетичні, водорозчинні та нерозчинні у воді. Як природні мукоадгезивні речовини (агароза, хітозан, желатин, пектин, натрію альгінат, гіалуронова кислота), так і синтетичні мукоадгезиви (похідні целюлози, полімери на основі полі(мет)акрилової кислоти та ін.), як правило, мають схожі структурні властивості: вони являють собою лінійні або неупорядковані полімери з високою молекулярною масою, які містять значну кількість гідрофільних, негативно заряджених функціональних груп і утворюють тривимірні розгалужені мережі. Прикладами водорозчинного та нерозчинного полімерів серед мукоадгезивів синтетичного походження є, відповідно, поліакрилова кислота та полікарбофіл; останній, хоча є водонерозчинним, характеризується здатністю до набухання у воді зі збільшенням своїх початкових розмірів до 100 %. Молекули мукоадгезивних полімерів можуть бути як незарядженими (наприклад, гідроксипропілцелюлоза), так і мати катіоногенний (хітозан) або аніоногенний (полікарбофіл) характер.

Для пояснення механізмів взаємодії полімерів та муцинів було запропоновано декілька теорій: електронну, адсорбційну, дифузійну, теорію змочування, проте найбільш повно описати суть явища мукоадгезії дозволяє лише поєднання усіх зазначених теорій. Так, першочерговим етапом

мукоадгезії є щільний контакт між полімером та слизовою, що виникає при достатньому зволоженні поверхні біологічної тканини та необхідному розподіленні й набуханні мукоадгезивної речовини. Ефективність такого контакту пояснюється з позицій теорії змочування: загалом розподілення та контактування ЛФ зі слизовою є тим кращим, чим меншим є контактний кут змочування (рис. 1.3). Відповідно, на цьому етапі чинять вплив характер поверхні тканини та реологічні властивості ЛФ. Складчастість та шорсткість поверхні слизової полегшують закріплення ЛФ, а для поверхонь з відносно гладким рельєфом вагомим значення набуває в'язкість ЛФ [83 – 88].

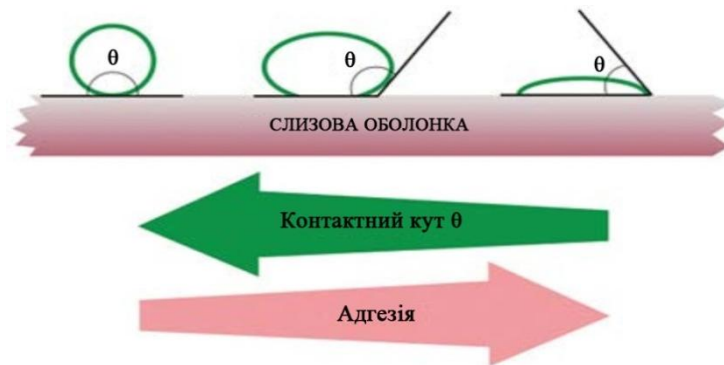


Рис. 1.3 Взаємозв'язок між величиною контактного кута змочування та адгезією ЛФ на слизовій оболонці

Наступним етапом є взаємопенетрація мукоадгезиву та муцинів слизу, тобто відбувається дифузія ланцюгів полімеру (які володіють достатньою гнучкістю) у зазори, петлі і пори глікопротеїнової мережі (дифузійна теорія; рис. 1.4). Слідом за механічним переплетінням устанавлюються слабкі міжмолекулярні водневі та Ван-дер-Ваальсові зв'язки (адсорбційна теорія). Виникнення міжмолекулярних зв'язків також пояснюється електронною теорією, оскільки зумовлюється перенесенням електронів між шарами полімеру та муцину, які у фізіологічних умовах є протилежно зарядженими [89].

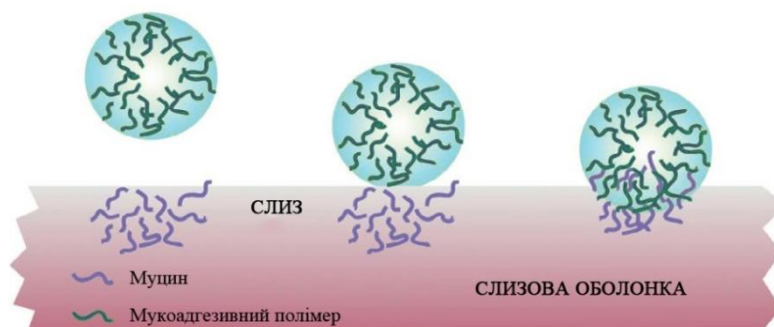


Рис. 1.4 Механізм мукоадгезії з позицій дифузійної теорії: ланцюги полімеру дифундують у зазори, петлі і пори глікопротеїнової мережі

Як впливає з наведеного механізму мукоадгезії, ключову роль у взаємодії з полімерними речовинами відіграє здатність муцинів до утворення водневих зв'язків завдяки наявності в їх структурі значної кількості функціональних груп: гідроксильних на бічних вуглеводних ланцюгів, аміногруп протеїнового каркасу, карбоксильних і сульфогруп термінальних ділянок бічних ланцюгів [90].

Виділяють три основні групи факторів, які впливають на мукоадгезію [91]:

1. *Фактори навколишнього середовища:*

– рН – зміна рН призводить до відмінностей у ступені дисоціації функціональних груп вуглеводного ланцюга або амінокислот поліпептидного ланцюга муцину, а також полімеру;

– тиск, що докладається при аплікації – має прямий вплив на глибину дифузійного проникнення ланцюгів полімеру;

– час первинного контакту – визначає ступінь набухання та дифузії полімерних ланцюгів;

– достатнє зволоження – є необхідним для того, щоб мукоадгезивний полімер розподілявся по поверхні та утворював «макромолекулярну мережу» для взаємопроникнення молекул полімеру та муцину, а також для посилення рухливості полімерних ланцюгів;

– присутність у середовищі іонів металів, які, взаємодіючи з зарядженими групами полімерів і/або слизу, можуть зменшувати міцність мукоадгезивного зв'язку.

2. Фізіологічні фактори:

– супутні захворювання – можуть змінювати фізико-хімічні властивості слизу або його кількість (наприклад, вагінальні бактеріальні та грибові захворювання).

3. Властивості мукоадгезивного полімеру:

– оптимальна молекулярна маса – у межах від 10^4 до $4 \cdot 10^6$ Да: полімери з низькою молекулярною масою краще проникають у слизовий шар, проте формують нестійкі гелі або швидко розчиняються; полімери з високою молекулярною масою здатні до більш міцного механічного переплетіння з ланцюгами муцину, але їх зволоження та, відповідно, розкриття функціональних груп, вільних для взаємодії із субстратом, відбувається досить повільно;

– гнучкість полімерних ланцюгів – є необхідною умовою для дифузії полімерних ланцюгів та їх переплетіння з муцином. Для полімерів із високим ступенем зшивки рухливість окремих ланцюгів знижується, що призводить до зменшення сили мукоадгезії;

– концентрація у складі ЛФ – впливає на доступну для проникнення у шар слизу довжину полімерних ланцюгів;

– ступінь набухання полімеру – набухання полімеру робить можливим механічне переплетення завдяки розкриттю полімерних ланцюгів і подальшого утворення водневих зв'язків і/або електростатичних взаємодій між полімером і компонентами слизової.

Найбільшого поширення як мукоадгезивні ЛФ для вагінального застосування набули гелі [92]. У випадку інтравагінального введення гелі здатні забезпечити тривалий контакт між діючою речовиною і слизовою піхви та сприяти поступовому вивільненню активного інгредієнта. Саме тому ця ЛФ є ідеальним рішенням з погляду терапевтичної ефективності та комплаєнсу

пацієнток. Крім того, завдяки високій гідратованості та своїм консистентним властивостям гелі чинять зволожувальну та лубрикантну дію, що особливо корисно при патологічних станах, які характеризуються сухістю слизової піхви. Використання мукоадгезивних полімерів у складі вагінальних гелів може подовжити час контакту ЛФ зі слизовою оболонкою, що збільшить ефективність терапії.

Як і для інших м'яких ЛФ, терапевтична ефективність вагінальних гелів безпосередньо пов'язана з їх консистентними властивостями, оскільки в'язкість гелю безпосередньо впливає на розподілення при аплікації, а також позначається на здатності до утримування на слизових в умовах «вимивання» фізіологічними рідинами. Використання гелю з низькими реологічними параметрами сприятиме легкому розподіленню, а отже, контакту з вагінальним епітелієм, однак у цьому разі лікарський препарат матиме обмежений час утримування через неспроможність протистояти ефекту вимивання у вагінальному середовищі. У випадку високов'язкісного гелю виникне протилежна ситуація: ЛФ характеризуватиметься стійкістю до вимивання в умовах *in vivo*, проте буде незручною у застосуванні та важко розподілятиметься на слизових при інтравагінальному введенні [93]. Відповідно, бажані біофармацевтичні показники вагінального гелю можуть бути досягнуті лише при певній оптимальній в'язкості, що вимагає проведення ретельних реологічних досліджень у ході фармацевтичної розробки.

Розробка складу та вибір допоміжних речовин будь-якої ЛФ для вагінального застосування має включати й оцінку мукоадгезивної здатності. Найбільш доступними є методи дослідження мукоадгезії *in vitro*, які не потребують унікального обладнання та придатні для аналізу взаємодій між молекулами полімерів і муцину. До таких можна віднести реологічний і механічний методи, а також метод потоку.

Суть реологічного методу полягає у визначенні в'язкості розчинів полімеру і муцину окремо та у суміші. При взаємодії молекул

мукоадгезивного полімеру з молекулами муцину відбувається зміна реологічних показників. Зазвичай експериментально встановлена в'язкість суміші вище розрахованої на основі значень індивідуальних компонентів:

$$\eta_{\text{total}} = \eta_{\text{mucin}} + \eta_{\text{polymer}} + \eta_{\text{mucoadh}}, \quad (1.1)$$

де: η_{mucoadh} – фактор, обумовлений мукоадгезивною взаємодією муцину і полімеру.

Отже, сила мукоадгезії є додатковою силою міжмолекулярного тертя до одиниці площі контакту і розраховується як добуток в'язкості мукоадгезії та напруги зсуву (σ):

$$F = \eta_{\text{mucoadh}} \times \sigma. \quad (1.2)$$

В'язкість мукоадгезії визначається експериментально при дотриманні ідентичних умов для всіх компонентів (концентрація, температура, час і швидкість зсуву).

Реологічний метод застосовний для в'язких і рідких ЛФ та дозволяє швидко оцінювати мукоадгезивні властивості полімерів, але він не завжди достовірний. При інтерпретації результатів потрібно мати на увазі залежність в'язкості у системі від співвідношення полімеру і муцину, а також враховувати склад, рН і температуру дослідження.

Механічний метод визначення мукоадгезивних властивостей полягає у визначенні навантаження, яке здатна витримати система в експерименті на зсув, відрив або на відшаровування від тканини слизової. При цьому слизова може бути замінена на пластини або фільтри, покриті шаром муцину (рис. 1.5).

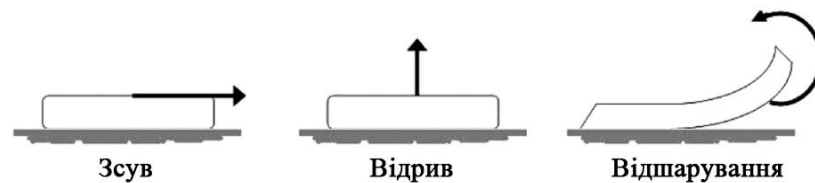


Рис. 1.5 Механічне визначення сили мукоадгезивної взаємодії: варіанти прикладення навантаження

Для механічного визначення найчастіше використовується аналізатор текстури – багатофункціональний прилад, що визначає напругу і деформацію у дослідженнях структурно-механічних властивостей зразків. Під час мукоадгезивних досліджень кронштейн аналізатора текстури з тензодатчиком і ЛФ опускається до контакту зі слизовою, чинить стиснення протягом заданого часу при постійному тиску, а потім повертається у вихідне положення з фіксованою швидкістю. Показання приладу, що реєструються в автоматичному режимі, використовують для побудови кривих у координатах «напруга (σ) – деформація (d)».

При механічному визначенні мукоадгезії слід ретельно підібрати умови проведення експерименту, оскільки такі параметри, як тривалість і сила початкового контакту між ЛФ та слизовою, а також ступінь зволоження значною мірою впливають на одержувані результати.

Хоча механічний метод максимально наближений до фізіологічних умов, у ньому досліджується тип взаємодії, який практично ніколи не діє на ЛФ в умовах живого організму. Найбільш ймовірно, що в умовах *in vivo* при відриві ЛФ від слизової велику роль відіграє напруга зсуву або комбінація різних сил, які рідко спрямовані суворо перпендикулярно до площини контакту. Проте метод є корисним і зручним на етапі вибору мукоадгезивного носія.

Метод потоку може бути використаний для ЛФ, які піддаються постійному впливу біологічних рідин. Із цією метою потік буферного розчину із заданими швидкістю і температурою пропускають над ЛФ, закріпленою на ділянці слизової тканини. Розчин змиває зі слизової досліджуваний об'єкт,

тривалість утримування якого оцінюється будь-яким методом, придатним для кількісного аналізу включеного до складу ЛФ активного фармацевтичного інгредієнта (спектрофотометрія, флуориметрія, хроматографія та ін.).

Отже, фізіологічні особливості слизової піхви обумовлюють необхідність створення вагінальних ЛФ на основі мукоадгезивних систем. Найоптимальнішим рішенням є вибір лікарської форми гелю, що не тільки сприяє зволоженню та лубрикації слизової піхви, але й завдяки вмісту полімерного гелеутворювача одночасно виявляє певні мукоадгезивні властивості. Для забезпечення максимальної терапевтичної ефективності лікарського засобу у формі вагінального гелю на стадії розробки має бути оцінена здатність ЛФ до розподілення (тобто її в'язкісні властивості) та утримання на слизових оболонках (мукоадгезія).

Висновки до розділу 1

1. Показано, що в Україні майже дві третини літніх осіб становлять жінки. Суто «жіночими» фізіологічними особливостями у літньому віці, які мають вплив на здоров'я та якість життя, є менопауза та дефіцит естрогенових гормонів. Найхарактернішими симптомами вікової нестачі естрогенів є вазомоторні розлади, порушення сну, психоемоційні та урогенітальні порушення.

2. Охарактеризовано механізми патогенезу та підходи до фармакотерапевтичної корекції генітоуринарного синдрому в менопаузі. Визначено, що процеси старіння урогенітального тракту можуть виявлятися вульвовагінальною та цистоуретральною атрофією, проте найбільш виражено перебігають у тканинах піхви. Лікування засновано на застосуванні естрогенових гормонів, які мають низку протипоказань та побічних явищ не тільки при системному, але й при місцевому використанні. Для локальної негормональної терапії вульвовагінальних проявів застосовують вагінальні лубриканти та місцевозволожувальні засоби.

3. Наведено класифікацію, охарактеризовано механізм дії за літературними даними щодо ефективності фітоестрогенів у лікуванні симптомів генітоуринарного синдрому в менопаузі. Визначено, що суттєву користь у профілактиці та полегшенні менопаузальних розладів має природний фітоалексин ресвератрол, який є компонентом деяких комплексних клімактеричних засобів для перорального застосування, але дані стосовно його локального застосування при симптомах вагінальної атрофії відсутні.

4. Розглянуто біофармацевтичні аспекти вагінальних лікарських форм, зокрема в'язкість та мукоадгезивну здатність, які безпосередньо впливають на терапевтичну ефективність при інтравагінальному введенні лікарських засобів. Наведено механізми мукоадгезії, фактори, що на неї впливають, а також допоміжні речовини, які використовуються як мукоадгезиви. Представлено методи оцінки мукоадгезії в умовах *in vitro*, які можуть бути використані на етапі розробки складу вагінальних лікарських препаратів.

Результати досліджень за розділом наведено у таких публікаціях:

1. Зайченко Г. В., Горчакова Н. О., Стрига О. А., Яковлева Н. Ю., Рубан О. І. Аспекти фармакодинаміки та клінічної фармакології гіалуронової кислоти. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип. 1 (135). С. 33–42.

2. Зайченко Г. В., Горчакова Н. О., Стрига О. А., Рубан О. І. Фармакологічне обґрунтування розробки нових лікарських препаратів на основі ресвератролу. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип. 4 (1). С. 21–30.

3. Рубан Е. И. Ярных Т. Г. Гиалуроновая кислота и её роль в организме человека. *Перспективы развития биологии, медицины и фармации* : материалы IV Междунар. науч. конф. молодых ученых и студентов, г. Шымкент, 9-10 дек. 2016 г. Шымкент, 2016. С. 28–29.

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАГАЛЬНОЇ КОНЦЕПЦІЇ ТА МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Особливості фармацевтичної розробки м'яких лікарських форм для застосування в гінекології

Фармацевтична розробка (ФР) є найважливішим етапом життєвого циклу лікарських засобів. Відповідно до сучасних положень, прийнятих у країнах з розвинуеною фармацевтичною індустрією, ФР покликана реалізовувати принципи запланованої якості лікарських засобів, що розробляються.

Аспекти ФР регламентуються документами, прийнятими міжнародними організаціями, а саме:

- ICH Q8 Фармацевтична розробка – методичне керівництво (Pharmaceutical Development, Part I, Part II);

- Quality by Design (QbD) Якість шляхом розробки – документ, що відображає принципи запланованої якості, системний підхід до розробки, заснований на надійних наукових даних;

- ICH Q9 Управління ризиками для якості (Quality Risk Management).

Згідно з аналізом регламентувальної нормативної документації нами була обрана загальна методологія зі створення м'якої лікарської форми для застосування у гінекології, яка містить рослинні компоненти. Методологія передбачає виконання трьох основних етапів: інформаційно-пошукового, дослідно-технологічного та стандартизаційно-фармакологічного. На підставі цього нами були сформульовані головні напрямки проведення досліджень:

- 1) експериментальне обґрунтування виду гелеутворювача у складі основи на підставі реологічних та текстурних досліджень;

- 2) вибір концентрації активних фармацевтичних інгредієнтів за допомогою фармакологічних досліджень;

- 3) оптимізація складу лікарського засобу за біофармацевтичними, технологічними та іншими критеріями;
- 4) обґрунтування введення мукоадгезивного компонента до складу гелю;
- 5) розробка раціональної технології лікарського засобу, створення нормативної документації на його виробництво;
- 6) вибір критеріїв контролю якості вагінального гелю, а також розробка і валідація основних методик проведення аналізу, розробка проєкту методів контролю якості;
- 7) дослідження з метою обґрунтування терміну придатності та умов зберігання м'якого лікарського засобу з ресвератролом та кислотою гіалуроновою;
- 8) доклінічне вивчення фармакологічної активності та токсичності.

Дотримання розробленого плану є системним підходом до розробки нового лікарського засобу у вигляді гелю для застосування у гінекології, який дозволить отримати ефективний, безпечний та доступний препарат.

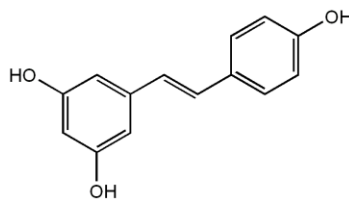
2.2 Об'єкти дослідження

Використані у дисертаційній роботі активні фармацевтичні інгредієнти та сучасні допоміжні речовини (гелеутворювачі, розчинники, консерванти, емульгатори) за якісними та кількісними показниками відповідали вимогам нормативно-технічної документації і дозволені до медичного застосування.

Характеристика АФІ

Екстракт ресвератролу (resveratrol) – транс-3,5,4'-тригідроксистильбен; 3,4',5-стилбентріол; транс-резвератрол(Е)-5-(p-гідростирил)резорсинол (Naturex S.p.A, Франція, Food Chemical Codex – P.1001, CAS 501-36-0). Вміст транс-ресвератролу – не менше 50,0%. Втрата в

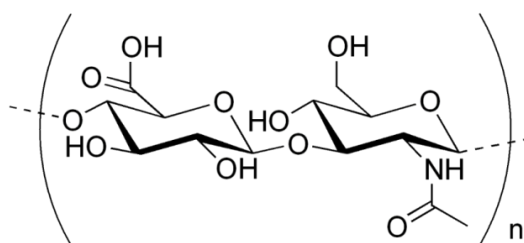
масі при висушуванні – 2,0%. Являє собою дрібнодисперсний порошок від жовто-коричневого до темно-коричневого кольору з характерним запахом.



$C_{14}H_{12}O_3$ М.м. 228,25

Кислота гіалуронова (натрію гіалуронат низькомолекулярний (sodium hyaluronate) (Ph Eur 2.0. р. 1472). Аморфний білий порошок, без запаху, добре розчиняється у воді з утворенням прозорого гелю. Вміст D - глюкуронової кислоти 46,6%. Вміст основної речовини – 96,5%. рН 0,5% розчину – 6,0-7,5.

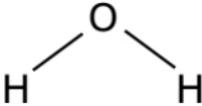
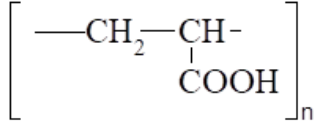
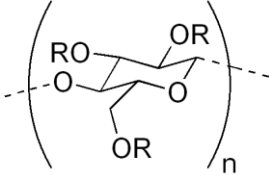
CAS:9067-32-7, Мм 0,1 МДа

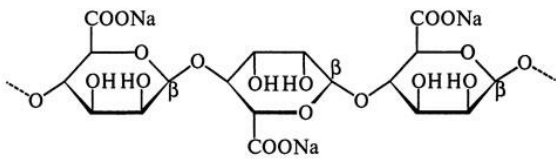


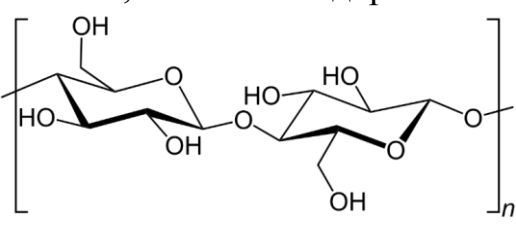
Таблиця 2.1

Характеристика допоміжних речовин

Речовина	Характеристика
Пропіленгліколь <i>(1,2 пропандіол,</i> <i>Propylenglycolum</i> <i>(Ph Eur), Propylene glycol (USP, BP, JP)) – ДФУ вид. 2, Т. 2, С. 563-565</i> CAS: 57–55–6	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$ М.м. 375-450 Безбарвна, прозора в'язка гігроскопічна рідина. Змішується з водою Р, дуже легко змішується з ацетоном Р, 96% спирті Р і метиленхлориді Р, практично не змішується з жирними оліями і мінеральними маслами. Густина – 1,120 г/мл; в'язкість – 105-130 мПа·с.

Вода очищена (Aqua purificata (Ph Eur), Purified Water (BP; JP; USP)) – ДФУ, вид. 2, Т. 2, С. 129-132	 H₂O М. м. 18,02 Прозора, безбарвна рідина без смаку та запаху. Властивості: T_{кип.} – 100 °С; критичний тиск – 22,1 МПа (218,3 атм); T_{крит.} – 374,2 °С; діелектрична константа D²⁵=78,54; дипольний момент – 1,76 (у бензені при 25 °С) та 1,86 (у діоксані при 25 °С); константа іонізації – 1,008·10⁻¹⁴ (25 °С); T_{пл} – 0 °С; показник заломлення – 1,3330; питома вага – 0,9971 (25 °С); поверхневий натяг – 71,97 мН/м (25 °С); динамічна в'язкість – 0,89 МПа·с. Змішується з усіма полярними розчинниками
Карбопол Ultrez 21 (USP 30/NF 25), 2007. Р. 1086)	Високомолекулярний полімер акрилової кислоти. Містить у своєму складі від 56% до 68% карбоксильних груп (-COOH) у перерахунку на суху речовину.  Білий гігроскопічний порошок слабокислої реакції, набухає у воді й інших полярних розчинниках після диспергування й утворює стабільні гелі при нейтралізації лужними розчинами. Дозволяє отримувати прозорі, нелипкі гелі, утворює захисну зволожуювальну плівку (без липкості), біологічно не активний, не вступає у взаємодію з іншими компонентами і зі шкірою, регулює в'язкість у гелях, не токсичний. Гігроскопічний, обмежено набухає у воді, а також в інших полярних розчинниках
Метилцелюлоза (Methylcellulosum) – ДФУ, Т.2, С. 447. CAS: 9004-67-5	 R = H or CH₃ Порошок білого, жовтувато-білого або сірувато-білого кольору або гранули. Гігроскопічний після

	висушування. Практично не розчиняється у гарячій воді, ацетоні, етанолі, ефірі і толуолі. Розчиняється в холодній воді з утворенням колоїдного розчину
Натрію альгінат <i>(Natrii alginas) (ЄФ 4 вид., 2002, с. 1900, монографія Sodium alginate).</i> CAS: 9005-38-3	 М.м. (176)_n. Аморфний, кремовий або світло-сірий порошок з кремовим відтінком, без запаху, мало розчиняється у воді з утворенням каламутних колоїдних розчинів, практично не розчиняється у 95% спирті, ефірі, хлороформі
Aristoflex AVC <i>(Ammonium Acryloyldimethyltaurate/VP Copolymer)</i> CAS: 91081-14-0.	Нейтралізований зшитий співполімер акриламідопропілпропанової сульфенової кислоти і вінілпіролідону. Застосовується як згущувач для емульсій «олія у воді» і як гелеутворювач для водних систем. Дозволяє отримувати стійкі водні гелі в діапазоні рН від 4 до 9 і стабілізувати водонерозчинні рідини у складі гелю, без додаткового введення емульгатора до рецептури
Sepimax Zen (Polyacrylate Crosspolymer-6) CAS: 111286-86-3	Асоціативний полімер (поліакриловий кроссполімер-6) з відмінною стійкістю до електролітів, здатний утворювати стійкі водні гелі у широкому діапазоні рН від 2 до 8. Володіє поверхневою активністю, що дозволяє отримувати емульсію без додавання емульгаторів. За фізичними властивостями являє собою дрібнодисперсний порошок білого кольору, добре розчиняється у воді, змішується з оліями. Рекомендована концентрація в ЛЗ – до 5 %. Ефективний у діапазоні рН 2-8
Sepinov EMT 10 (Hydroxyethyl Acrylate/Sodium Acryloyldimethyl Taurate Copolymer) CAS: 818-61-1	Попередньо нейтралізований полімерний загущувач, емульгатор, стабілізатор емульсій, регулятор в'язкості. Ефективний при низьких концентраціях, стійкий до електролітів, має відмінні стабілізуювальні властивості навіть з високим рівнем олії в рецептурі. Легко вводиться у водну або олійну фазу при холодному і гарячому процесі. Ефективний у широкому діапазоні рН 3-12

Гідроксietилцелюлоза (ГЕЦ) Hydroxyethylcellulosum) (PhEur), Hydroxyethyl cellulose (USPNF), (ЄФ 6 вид., монографія Hydroxyethylcellulose, с. 1345). CAS: 9004-62-0	Похідне целюлози, неіонний водорозчинний полімер  $C_{36}H_{70}O_{19}$ М.м. 806,9 Білий, жовто-білий або сіро-білий порошок. Розчиняється у гарячій і холодній воді з утворенням колоїдного розчину, практично не розчиняється в ацетоні, етанолі, етері і толуолі й у більшості інших органічних розчинників; у деяких полярних органічних розчинниках або набрякає, або розчиняється, рН 1 % водного розчину становить 5,5 – 8,5. Може використовуватися як загусник, емульгатор, гелеутворювач, плівкоутворювач, пролонгатор для приготування розчинів із широким діапазоном в'язкості. Рекомендована концентрація в ЛЗ: 0,1–3 %.
Гідроксипропілметилцелюлоза Hydroxypropyl Methylcellulose (Гіпромелоза, ГПМЦ; Methocel® Ph Eur: Nupromellose. CAS: 9004-65-3	R = -H; -CH₃; -CH₂CH(OH)CH₃): целюлоза, в якій ступінь заміщення на -CH₃ радикал становить 19-24 %, на -CH₂CH(OH)CH₃, являє собою білий або кремово-білий волокнистий або гранульований порошок, розчиняється в холодній і практично не розчиняється в гарячій воді, хлороформі, 95 % етанолі, ефірі, але розчиняється у суміші етанолу та дихлорметану, метанолу та дихлорметану, суміші води і спирту. В'язкість 2 % (м/об) розчину
Euxyl PE 9010 (Phenoxyethanol, Ethylhexylglycerin) CAS 122-99-6	Прозора жовтувата рідина з характерним ароматом, розчиняється в олії. Має широкий спектр біоцидної дії: грампозитивні та грамнегативні бактерії, гриби, дріжджі. Не виявляє подразливої дії. Застосовується у виробництві м'яких косметичних і лікарських засобів. Рекомендована концентрація в ЛФ – 0,5-1%
Cosgard (косгард) Активні речовини у складі: бензиловий спирт (Benzyl	Консервант, являє собою безбарвну рідину, іноді з жовтим відтінком, розчиняється у воді і спирті, має дуже слабкий специфічний аромат. Активний проти грампозитивних бактерій <i>Staphylococcus aureus</i>,

alcohol), дегідрооцтова кислота (Dehydroacetic acid), вода (Aqua) CAS: 520-45-6	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , дріжджів, цвілі (<i>Candida Albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i>). Рекомендована доза препарату складає 0,6%, але залежно від рецептури може варіюватися від 0,2 до 1% від загального об'єму засобу
Leusidal (Leuconostoc/Radish Root Ferment Filtrate) CAS: 84775-94-0	Світло-рожева рідина, розчиняється у воді, пропіленгліколі, гліцерині, також може змішуватися з оліями. Запах практично відсутній. Консервант активно діє при дуже широкому діапазоні pH, але починає втрачати свою активність при pH 9. Отримують шляхом ферментації редису бактеріями Leuconostoc, містить пептиди з антибактеріальними властивостями. Активний проти <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>C.</i> <i>Albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i> та ін. Не володіє подразливою дією на шкіру, має зволожувальні властивості.
OraRez® W (співполімер метилвінілового ефіру малеїнової кислоти) CAS: 25153-40-6	Біологічно сумісний водорозчинний плівкоутворювальний полімер, має біoadгезивні та мукоадгезивні властивості. Білий або майже білий порошок, pH (1% водного розчину 6,0~7,0)
OraRez® MS (змішана натрієво- кальцієва сіль метилвінілового ефіру / малеїнової кислоти) CAS: 62386-95-2	Біологічно сумісний водорозчинний полімер, має біoadгезивні та мукоадгезивні властивості. Місточки кальцієвої солі посилюють когезійні взаємодії всередині полімеру, що приводить до утворення псевдозшивок, які підвищують тривалість адгезійного ефекту. Білий або майже білий порошок, pH (1% водного розчину 6,0~7,0)

2.3 Методи дослідження

При виконанні роботи були використані сучасні методи дослідження (фізико-хімічні, біофармацевтичні, структурно-механічні, мікробіологічні,

фармакологічні), що дозволяють оцінювати модельні зразки і розроблену лікарську форму.

2.3.1 Органолептичні дослідження

Опис. Контролювали зовнішній вигляд і характерні органолептичні властивості зразків (колір, запах, консистенцію тощо). Досліджувані лікарські форми контролювали щодо наявності згірклого запаху, а також ознак фізичної нестабільності (агрегація частинок, коалесценція, коагуляція, розшарування). Визначення зовнішнього вигляду та кольору проводили переглядом мазків гелю шаром 2 – 4 мм, нанесених на предметне скло [94].

Визначення однорідності проводили за методикою, наведеною в ДФУ. Брали чотири проби кожного зразка по 20–30 мг кожна, розміщували по дві проби на предметне скло, накривали другим предметним склом і міцно притискували до утворення плям діаметром близько 2 см.

Одержані проби розглядали неозброєним оком (на відстані близько 30 см від очей). Зразок вважали однорідним, якщо в усіх чотирьох пробах не виявлялися видимі частинки, сторонні включення й ознаки фізичної нестабільності: агрегація і коалесценція частинок, коагуляція. Якщо одна з проб не витримувала випробування, визначення проводили додатково ще на восьми пробах, при цьому всі вісім проб мали витримувати тест [94].

2.3.2 Фізико-хімічні методи дослідження

Вивчення реологічних властивостей. Визначення структурно-механічних властивостей проводили за допомогою реометра Rheolab QC, Anton Paar (Австрія), який відповідає вимогам стандарту ISO 3219. У ході дослідження були використані системи коаксіальних циліндрів C-CC27/SS. Температура навколишнього середовища складала 25 °С. Процес виміру реологічної кривої включав лінійне збільшення та лінійне зменшення швидкості зсуву зі 105 точками виміру (від 0,1 до 350 с⁻¹) і тривалістю

виміру точки 1 с. Результати дослідження були оброблені за допомогою програмного забезпечення.

Визначення ступеня руйнування структури проводили методом Ребіндера за формулою (2.1):

$$\alpha = \frac{\eta_0 - \eta_{ef}}{\eta_0 - \eta_n}, \quad (2.1)$$

де: η_0 – найбільша в'язкість;

η_{ef} – ефективна в'язкість;

η_n – в'язкість гранично зруйнованої структури.

Значення механічної стійкості обчислювали за формулою (2):

$$MC = \frac{\tau_1}{\tau_2}, \quad (2.2)$$

де: τ_1 – межа плинності структури до руйнування;

τ_2 – межа плинності структури після руйнування.

Визначення мікроелементного складу екстракту ресвератролу. При виконанні роботи використовували спектрограф ДСФ-8. Дугу змінного струму отримували за допомогою генератора ІВС-28.

Основою для градуювальних зразків служила суміш оксидів та солей металів, яка відповідає складу різнотрав'я (листя). Серію градуювальних зразків з добавками визначених елементів $1 - 1 \cdot 10^{-3}$ мас.% готували шляхом ретельного перемішування основи та оксидів елементів, що визначалися.

У роботі використовували спектральні графітові електроди «осч» 7-3 діаметром 6 мм та довжиною 50–60 мм. Градуювальні зразки та підготовлені проби поміщали у нижні кратери (глибиною 5 мм, діаметром 1,9 мм).

Установлювали такі умови вимірювань: сила струму дуги змінного струму – 16 А; фаза підпалу – 60°C, частота імпульсів, що підпалюють – 100 розрядів на секунду, аналітичний проміжок – 2 мм, ширина щілини – 0,015 мм, експозиція – 60 с. Спектри фотографували у ділянці 240–350 нм [95].

pH. Визначали потенціометрично згідно з ДФУ, вид. 2, Т. 1, п. 2.2.3.

Кристалографічний аналіз. Дослідження розчинності, форми та розміру проводили за допомогою мікроскопічного аналізу з використанням лабораторного мікроскопа Konus Academi (Італія). Для частинок порошку, що спостерігались у полі мікроскопа, підбирали правильну геометричну форму і заміряли її довжину та ширину з урахуванням збільшення. Для характеристики ступеня ізометричності частинок порошку обчислювали фактор форми за формулою:

$$K = Ш / Д, \quad (2.3)$$

де: $Ш$ – середня ширина частинок, мкм;

$Д$ – середня довжина частинок, мкм.

Співвідношення речовини і розчинника складало 1:5 [96].

Дослідження швидкості розподілу гелю проводили з використанням полімерної плівки з боросилікатного волокна (Японія) з нанесеним шаром 3,7% розчину гідроксипропілметилцелюлози, який імітував вагінальний слиз. Плівка була закріплена під кутом 25° , що відповідає фізіологічному розташуванню піхви відносно вертикалі хребетного стовбура. На поверхні плівки відмічали лінію старту та наносили 1,0 г зразка. Час експерименту складав 10 хв, що відповідає фізіологічній швидкості вагінальної секреції. Після цього заміряли відстань від точки нанесення гелю до кінцевої точки шляху та розраховували середню швидкість його розподілу [97].

Вивчення ступеня деформації під час навантаження проводили за такою методикою: плівку з боросилікатного волокна закріплювали на поверхні предметного скла; наважку препарату в кількості 0,5 г наносили на плівку, накривали зразок іншим предметним склом та вимірювали діаметр плями. На верхнє предметне скло поміщали вантаж (100 г) та вимірювали діаметр плями через 5 хв досліду. Коефіцієнт розподілу обчислювали за формулою:

$$k = \frac{d_{max}}{d_0}, \quad (2.4)$$

де: d_0 – початковий діаметр плями гелю;

d_{max} – діаметр плями через 5 хв досліду.

Визначення ступеня розріджування зразків гелю цервікальним слизом проводили за методом «поток» [97]. На модельну мембрану наносили досліджувані зразки гелів у кількості 0,5 г та поміщали у чашку Петрі з 25 мл фізіологічного розчину з рН 4,0, на 1 год. Проводили органолептичний аналіз та обчислювали площі плям зразків за формулою:

$$S = d^2 \times \frac{\pi}{4}, \quad (2.5)$$

де: d^2 – діаметр плями зразка гелю.

Дослідження здатності до адгезії проводили за допомогою тензіометра, фіксація показників проводилась за допомогою електронного динамометра. Досліджуваний зразок поміщали у чашку Петрі, зафіксовану на горизонтальній поверхні. Масу досліджуваного зразка розраховували зі співвідношення 0,25 г/см² площі покривної пластини, що забезпечує оптимальну товщину шару для вимірювання зусилля відриву від поверхні контакту зразка та пластини. Зразок гелю притискували пластиною, оснащеною тягою для передачі зусилля відриву на динамометр, контактну поверхню попередньо покривали тонким шаром парафіну до повного змочування її контактної поверхні зразком. Для однорідності зусилля на пластину поміщали вантаж масою 1 кг на 60 с, після чого вантаж прибирали. Динамометр з прикріпленою до нього контактною пластиною піднімали вертикально вгору до відриву контактної пластини від поверхні зразка та фіксували необхідне зусилля відриву за показниками динамометра [98].

Адгезію визначали за силою, що необхідна для розділу двох поверхонь після виникнення адгезії. Силу розраховували за формулою 2.6:

$$Sm = \frac{Fm}{Ao}, \quad (2.6)$$

де: Fm – максимальна сила відриву;

Ao – загальна площа поверхні.

Текстурний аналіз. Для визначення текстурних властивостей зразків гелю був використаний аналізатор текстури TA.XT Plus (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, Великобританія) [99].

Випробування на зворотну екструзію проводили із використанням устатковини А/ВЕ.

Приблизно 50 мл гелю поміщали у стандартний контейнер для зразка місткістю 100 мл, уникаючи появи повітря і забезпечуючи утворення гладкої поверхні. Диском у діаметрі 40 мм, який на початку випробування встановлювали над поверхнею зразка, стискати гель, у результаті чого відбувалось видавлювання продукту вгору між стінками контейнера і краями диска. При цьому обирали параметри проведення дослідження: швидкість руху – 2 мм/с, відстань (глибина введення) – 10 мм. Проводили три повторних аналізи при кімнатній температурі для кожного зразка, забезпечуючи однакові умови для кожного вимірювання. Параметри гелю, а саме: міцність (максимальна сила стиснення), консистенцію (когезійна та адгезійна здатність), визначали з одержаного графіка сила – час. Типовий графік вимірювання сили зворотної екструзії для гідрогелів на основі карбополу [100] наведений на рис. 2.1. При русі поршня з диском вниз створюється позитивна частина графіка зворотної екструзії: максимальна сила стиснення, необхідна для деформації гелю, демонструє міцність гелевої форми, а площа графіка вище нуля – когезію гелю. Чим вище значення, тим більш щільна (в'язка) консистенція зразка. Після того, як диск повертається у початкове становище, його рух угору створює негативну частину графіка: площа нижче нуля дає уявлення про адгезію та опір зразка при відриві від диска (мінімальну силу втягування гелю). Чим вище значення, тим більше енергії необхідно для розриву контакту зразка з поверхнею диска і, відповідно, тим краща адгезійна здатність гелю.

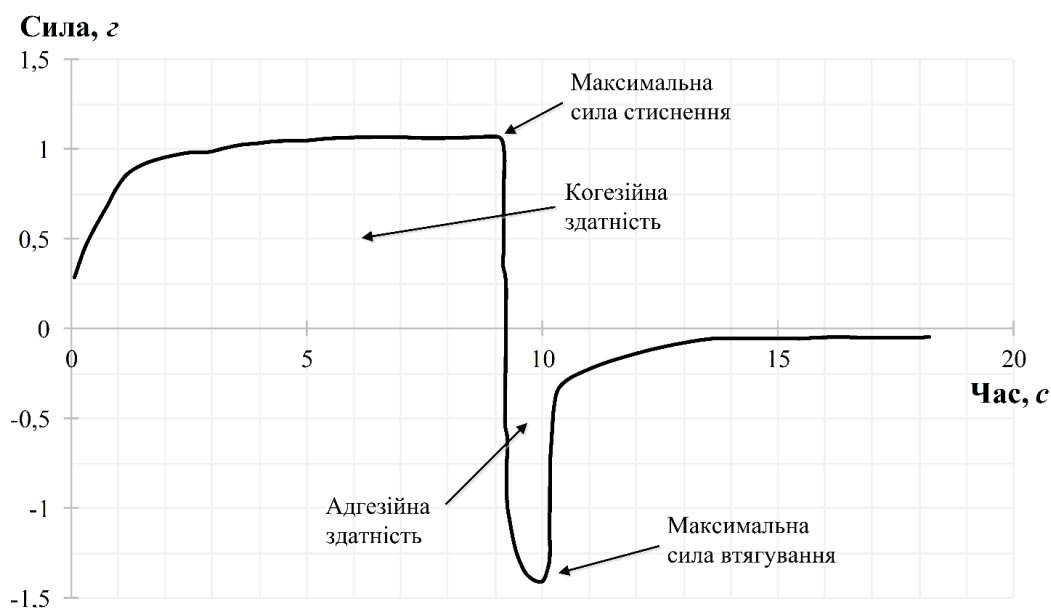


Рис. 2.1. Графік зворотної екструзії при проведенні текстурного аналізу

Випробування на намазуваність гелю

Випробування на намазуваність проводили із використанням устатковини HDP/SR.

Зразок гелю поміщали у приймач, який має форму конуса, уникаючи появи повітря і забезпечуючи утворення гладкої поверхні. Зонд, який також має форму конуса, на початку випробування встановлювали над поверхнею гелю. При цьому обирали параметри проведення дослідження: швидкість руху – 2 мм/с, відстань (глибина введення зонда у гель) – 10 мм. Проводили три повторних аналізи при кімнатній температурі для кожного зразка, забезпечуючи однакові умови для кожного вимірювання. Параметри гелю: міцність, намазуваність та адгезійну здатність, визначали з одержаного графіка сила – час (рис. 2.2). Під час тесту (руху зонда униз) гель має витікати назовні між поверхнями конуса приймача та зонда під кутом 45°. Легкість цього процесу вказує на ступінь розтікання гелю, тобто характеризує його намазуваність (площа вище нуля). Пік на позитивній частині графіка демонструє здатність гелю до витікання (міцність). Чим вище значення, тим більш рідка консистенція зразка, що також негативно

позначиться на намазуваності гелю. Вилучення конусного зонда зі зразка (рух угору) дає інформацію про адгезійну здатність гелю. Легкість відокремлення зразка від поверхні зонда показана максимальним піком на негативній частині графіка (значення сили адгезії).

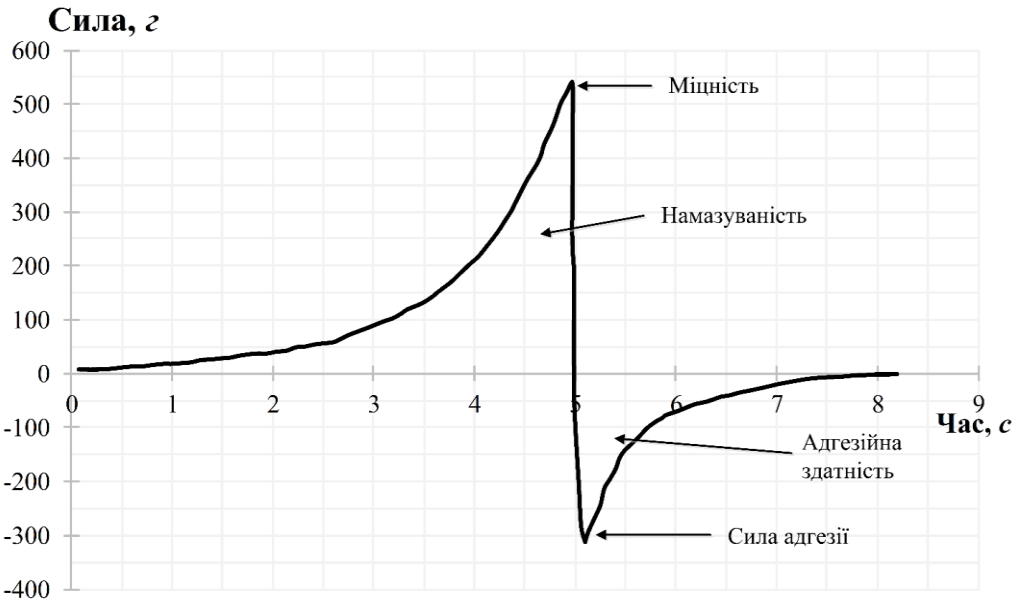


Рис. 2.2. Графік намазуваності при проведенні текстурного аналізу

Умови текстурного аналізу вагінального гелю

Зворотна екструзія	Кількість гелю – 50 г Діаметр насадки (диска) – 40 мм Швидкість руху поршня з диском – 2 мм/с Глибина введення поршня у гель – 10 мм Кількість повторювання дослідів – 3
Намазуваність	Кількість гелю – до повного заповнення конусоподібного приймача Швидкість руху конусоподібного зонда – 2 мм/с Глибина введення конусоподібного зонда у гель – 5 мм Кількість повторювання дослідів – 3

Кількісне визначення гіалуронової кислоти та ресвератролу в досліджуваному препараті під умовною назвою «Вагітрол»

Дослідження проводили методом вискоєфективної рідинної хроматографії відповідно до вимог ДФУ 2.0, ст. 2.2.29 «Рідинна хроматографія» під керівництвом доц. В. А. Ханіна.

Для аналізу використовували рідинний хроматограф Agilent 1290, укомплектований діодно-матричним детектором, чотириканальним насосом для формування градієнта низького тиску, автосамплером, термостатом колонки та мас-спектрометром Agilent 6420 Triple Quad. Для обробки отриманих результатів дослідження використовували програмне забезпечення MassHunter B04.01.

Також у ході кількісного визначення гіалуронової кислоти, пропіленгліколю та ресвератролу в складі гелю використовували аналітичні ваги ER-182 (Японія) та мірний посуд класу А. Для аналізу використовували ацетонітрил та метанол («Sigma-Aldrich», Німеччина) кваліфікації «*gradient grade, for HPLC*», н-бутанол («LiChrosolv», Німеччина) кваліфікації «*for HPLC*» та воду для хроматографії Р.

Методика кількісного визначення вмісту ресвератролу

Як стандартний зразок використовували СЗ ресвератролу («Sigma Aldrich», Німеччина, серія № SLBS8228).

Випробовуваний розчин. 1,00 г (точна наважка) препарату поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 90,0 мл метанолу Р та обробляють ультразвуком протягом 10 хв. Після чого розчин охолоджують до кімнатної температури, доводять до позначки тим самим розчинником та перемішують протягом 10 хв.

Розчин порівняння. 70,0 мг (точна наважка) СЗ ресвератролу поміщають у мірну колбу місткістю 200,0 мл, додають 170,0 мл метанолу Р та обробляють ультразвуком до повного розчинення. Після чого розчин охолоджують до кімнатної температури, доводять до позначки тим самим

розчинником та перемішують. 2 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 20 мл, доводять до позначки *метанолом Р* та перемішують.

Розчини використовують свіжоприготованими.

Перед хроматографуванням розчини фільтрують крізь PTFE мембранний фільтр із розміром пор не більше 0,2 мкм.

Перевірка придатності хроматографічної системи. Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови:

- ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком ресвератролу на хроматограмі розчину порівняння, має бути не менше 1000 теоретичних тарілок;

- коефіцієнт симетрії піку, розрахований за піком ресвератролу на хроматограмі розчину порівняння має бути не більше 2,0;

- відносне стандартне відхилення для площ піків ресвератролу розрахованих з хроматограми розчину порівняння, не має перевищувати 1,0%, розраховане за результатом 5 інжекцій.

Кількісне визначення ресвератролу проводили на високоефективному рідинному хроматографі з мас-спектрометричним детектором Agilent 6420 Triple Quad.

Хроматографували розчин порівняння та отримували п'ять хроматограм. Для площі піка ресвератролу з отриманих хроматограм розчину порівняння розраховували відносне стандартне відхилення (RSD).

Вміст ресвератролу (X), у відсотках, в препараті обчислювали за формулою:

$$x = \frac{S_i \times m_0 \times 100 \times 2 \times P}{S_0 \times m \times 200 \times 20} = \frac{S_i \times m_0 \times P}{S_0 \times m \times 20}, \quad (2.7)$$

де: S_i – середнє значення площі піку ресвератролу, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площі піку ресвератролу, розраховану з хроматограм розчину порівняння;

m_0 – маса наважки стандартного зразка СЗ ресвератролу, у грамах;

m – маса наважки препарату, у грамах;

P – вміст ресвератролу в стандартному зразку, у відсотках.

Валідація методики кількісного визначення ресвератролу

Валідацію аналітичних методик і випробувань проводили відповідно до вимог ДФУ 2 вид., том 1, 5.3.N.2. «Валідація аналітичних методик і випробувань» [1].

Критерії прийнятності для лінійності

Вимоги до вільного члена a :

1. Критерій статистичної незначущості. Вільний член a має бути статистично невиразний від нуля, тобто не має перевищувати свій довірчий інтервал:

$$|a| \leq \Delta_A = t(95\%, n - 2) \times S_a, \quad (2.8)$$

де: S_a – стандартне відхилення для відрізка відсікається на осі ординат (для розрахованої регресійної прямої).

2. Критерій практичної незначущості. Якщо перший критерій не виконується, використовують критерій практичної незначущості для вільного члена. Внесок нульового члена в невизначеність результату аналізу має бути незначним у порівнянні з максимально допустимою невизначеністю:

$$|a| \leq \frac{0.32 \times \Delta_{As}}{1 - (x_{min}/100)} \quad (2.9)$$

Вимоги до відносно залишкового стандартного відхилення (S_0):

Довірчий інтервал точок навколо прямої дорівнює добутку коефіцієнта Стюдента на залишковому стандартному відхиленні (s_0) і не має перевищувати гранично допустимої невизначеності методики аналізу Δ_{As} :

$$S_0 \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, f)} = 0.84, \quad (2.10)$$

де: b – кут нахилу для розрахованої регресійної прямої.

Вимоги до коефіцієнта кореляції (r):

Стандартне відхилення обчислюють за формулою:

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum_1^9 (x_1 - \bar{x})^2}{n-1}}, \quad (2.11)$$

де: X_i – концентрація випробовуваного розчину;

$\bar{X}$ – середня концентрація розчинів;

n – обсяг вибірки (число точок прямої).

Коефіцієнт кореляції обчислюють за формулою:

$$r = \sqrt{1 - \left(\frac{S_o}{S_y}\right)^2} \quad (2.12)$$

Критерії прийнятності для правильності

Відповідно до вимог ДФУ 2.0 правильність оцінюють за двома критеріями.

Критерій статистичної незначущості. Систематична похибка статистично не відрізняється від нуля, якщо відхилення $\bar{Z}$ від 100 % не перевищує свій довірчий інтервал:

$$\delta\% \leq \frac{\Delta_Z}{\sqrt{n}} \quad \delta\% = |\bar{Z} - 100|, \quad (2.13)$$

де: Δ_Z – довірчий інтервал;

n – обсяг вибірки (число точок прямої).

Критерій практичної незначущості. Якщо критерій статистичної незначущості не виконується, використовують критерій незначущості цієї систематичної похибки в порівнянні з максимально припустимою невизначеністю аналізу:

$$\delta\% \leq 0.32 \times \Delta_{As} \quad \delta\% = |\bar{Z} - 100|_{As} \quad (2.14)$$

Критерії прийнятності для прецизійності

Однобічний довірчий інтервал Δ_Z не має перевищувати максимально припустим у невизначеність аналізу (Δ_{As})

$$\Delta_Z \leq \Delta_{As} \quad \Delta_Z = S_Z(\%) \times t(95\%, n - 1),$$

$$S_Z(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \frac{(Z_i - \bar{Z})^2}{n-1}}{n-1}}, \quad (2.15)$$

де: S_Z – стандартне відхилення, виражене у відсотках, розраховане для відношень «знайдено/введено» для всіх розчинів;

t – однобічний критерій Стюдента для імовірності 95% і числа ступенів свободи $\nu = n - 1$;

n – обсяг вибірки (число точок прямої).

Методика кількісного визначення вмісту гіалуронової кислоти

Випробовуваний розчин. 2,0 г перпарату поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 50 мл 50% розчину метанолу P і доводять до позначки водою P . Перемішують і фільтрують крізь скляний фільтр з розміром пор 0,45 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

Розчин порівняння. 0,01 г (точна наважка) ФСЗ ДФУ натрію гіалуронату поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють у 40 мл 50% розчину метанолу P і доводять до позначки тим самим розчинником. 1 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл, доводять до позначки 50% розчином метанолу P і перемішують.

Розчини використовують свіжоприготовленими.

Хроматографували розчин порівняння й отримували від 2 до 6 хроматограм. Об'єм інжекції – 5 мкл. Для площі піків холестерину з отриманих хроматоргам розраховували відносне стандартне відхилення (RSD).

Отримання паралельних хроматограм (n_0) припиняли після досягнення вимог до відносного стандартного відхилення (RSD), вказаних у ДФУ 2.0, 2.2.46, N, табл. 2.2.46-2.

Вміст кислоти гіалуронової (X), у відсотках, у препараті обчислюють за формулою:

$$X = \frac{S_i \times m_0 \times 1 \times 100 \times P}{S_0 \times m_i \times 100 \times 10} = \frac{S_i \times m_0 \times P}{S_0 \times m_i \times 10}, \quad (2.16)$$

де: S_i – середнє значення площі гіалуронату, розраховану з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площі піку гіалуронату, розраховану з хроматограм розчину порівняння;

m_0 – маса наважки стандартного зразка ФСЗ ДФУ натрію гіалуронату, у грамах;

m_i – маса наважки препарату, у грамах;

P – вміст основної речовини у ФСЗ ДФУ натрію гіалуронату, у відсотках.

Придатність хроматографічної системи:

– ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком гіалуронату на хроматограмі розчину порівняння, має бути не менше 5000 теоретичних тарілок;

– коефіцієнт симетрії піку, розрахований за піком гіалуронату на хроматограмі розчину порівняння, має бути не більше 1,5;

– відносне стандартне відхилення для площ піків гіалуронату розрахованих з хроматограми розчину порівняння не має перевищувати 2,0%.

Методика кількісного визначення вмісту пропіленгліколю

Приготування розчину н-бутанолу. 1,5 мл н-бутанолу поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл, розчиняють у 7 мл води, доводять тим самим розчинником до позначки та перемішують. Термін придатності – 6 місяців.

Випробовуваний розчин. 0,8 г (точна наважка) препарату поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, доводять об'єм розчину водою P до позначки і перемішують. 5,0 мл отриманого розчину і 2,0 мл розчину н-бутанолу (внутрішній стандарт) поміщають у мірну колбу місткістю 50,0 мл, доводять об'єм розчину водою P до позначки і перемішують.

Розчин порівняння. Близько 0,6 г (точна наважка) або 0,6 мл ($\rho = 1,0363 \text{ г/см}^3$) пропіленгліколю CRS поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм розчину водою P до позначки і перемішують. 5 мл отриманого розчину і 5,0 мл розчину н-бутанолу (внутрішній стандарт) поміщають у мірну колбу місткістю 50,0 мл, доводять об'єм розчину водою P до позначки і перемішують. Розчини використовують свіжоприготовленими.

По 2 мкл випробовуваного розчину і розчину порівняння хроматографують на газовому хроматографі з полуменево-іонізаційним детектором, отримуючи не менше 5 хроматограм для кожного розчину.

Вміст пропіленгліколю (X), у відсотках, у препараті обчислюють за формулою:

$$X = \frac{B_i \times m_0 \times 5 \times 20 \times 50 \times P}{B_0 \times m_i \times 100 \times 50 \times 5} = \frac{S_i \times m_0 \times P}{S_0 \times m_i \times 5}, \quad (2.17)$$

де: B_i – відношення середніх значень площ піків пропіленгліколю на хроматограмах випробуваного розчину до середнього значення площі піку внутрішнього стандарту;

B_0 – відношення середніх значень площ піків пропіленгліколю на хроматограмах розчину порівняння пропіленгліколю до середнього значення площі піку внутрішнього стандарту;

m_0 – маса наважки стандартного зразка пропіленгліколю *CRS*, у грамах;

m_i – маса наважки препарату, в грамах;

P – вміст основної речовини в пропіленгліколі *CRS*, у відсотках.

Придатність хроматографічної системи:

– ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком *пропіленгліколю* на хроматограмі *розчину порівняння*, має бути не менше 2000 теоретичних тарілок;

– коефіцієнт симетрії піку, розрахований за піком *пропіленгліколю*, не має бути менше 2,0;

– коефіцієнт розділення піків *н-бутанолу* і *пропіленгліколю розчину порівняння* не має перевищувати 2,0 %.

2.3.3 Біофармацевтичні методи дослідження

Дослідження осмотичних властивостей. Осмотичні властивості експериментальних основ вивчали за допомогою методу діалізу крізь напівпроникну мембрану [101]. До нижнього отвору внутрішнього циліндра діалізаційної камери прикріпляли напівпроникну мембрану. У якості мембрани був використаний інертний пористий целюлозний матеріал Curgorphan, Type 150 pm, $11 \pm 0,5$ мкм завтовшки. Схема діалізатора наведена на рис. 2.3.

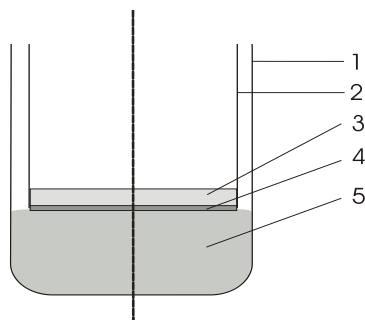


Рис. 2.3. Схема діалізатора: 1 – діалізна камера; 2 – внутрішній циліндр; 3 – наважка зразка; 4 – напівпроникна мембрана; 5 – буферний розчин

Наважку досліджуваного зразка (близько 10,0 г) рівномірним шаром наносили на поверхню напівпроникної мембрани, площа якої при діаметрі циліндру 50 мм складала близько 2000 мм². Внутрішній циліндр разом зі зразком поміщали у діалізну камеру, в яку заздалегідь наливали певну кількість буферного розчину. Вимірювання маси внутрішніх циліндрів проводили через кожні 60 хв до постійної маси на аналітичних вагах з точністю до 0,001 г, попередньо витерши його із зовнішнього боку. Випробування проводили при температурі $(37,0 \pm 1,0) ^\circ\text{C}$ за допомогою термостата ТС-80М-2. Періодично об'єм води очищеної в діалізній камері доводили до початкового рівня.

За різницею маси між двома зважуваннями визначали кількість рідини, що поглиналася.

Дослідження вивільнення ресвератролу методом рівноважного діалізу крізь напівпроникну мембрану. Біофармацевтичні дослідження вивільнення ресвератролу проводили впродовж 6 год. Оптичну густину отриманих проб визначали за допомогою спектрофотометра Evolution 60-S при довжині хвилі 270 нм у кюветі з товщиною шару 1 см. Відібрані зразки поміщали у мірну колбу та розводили фосфатним буферним розчином із рН 4,5 до отримання розчину з оптимальним значенням оптичної густини, яке знаходиться в межах підпорядкування закону Бугера-Ламберта-Бера. Як контрольний розчин використовували фосфатний буферний розчин із рН 4,5,

що відповідає фізіологічним показникам слизових оболонок статевих органів.

Концентрацію отриманих проб (г/мл) обчислювали за формулою, використовуючи дані оптичних густин стандартних розчинів, отриманих при будіванні графіка:

$$C = \frac{A \cdot C_{cm} \cdot b}{A_{cm}}, \quad (2.18)$$

де: A – оптична густина досліджуваного розчину;

A_{cm} – оптична густина стандартного розчину;

C_{cm} – концентрація стандартного розчину, г/мл;

b – розведення.

2.3.4 Фармакологічні та мікробіологічні методи дослідження

Фармакологічні дослідження проводили на кафедрі фармакології НМУ імені О.О. Богомольця під керівництвом докторки мед. наук, професорки Зайченко Г. В.

Для дослідження фармакологічного впливу нових крем-гелів комбінованого складу тварин випадковим чином розподіляли на експериментальні групи, в кожній з яких було по 6 самок (табл. 2.2).

Для моделювання у тварин гіпоестрогенного стану видаляли основну гормонопродукувальну залозу – яєчники. Оваріектомію самок (білатеральна оваріектомія за Кіршенблатом) проводили під наркозом в асептичних умовах. Як шовний матеріал використовували вікрилову нитку. Через 5 тижнів після операції (із 35 доби експерименту) самкам раз на добу впродовж 28 діб вводили тест-зразки.

Таблиця 2.2

Експериментальні групи та умови експерименту

Експериментальна група	Умови експерименту	Доза
1	2	3
Група 1. Інтактний контроль (ІК)	Інтактні тварини	—
Група 2. Контрольна патологія (КП)	Самки після білатеральної оваріоектомії	Вода для ін'єкцій, 0,5 мл
Група 3. Оварієктомовані самки (ОС)	Самки після білатеральної оваріоектомії	Гель із ресвератролом 0,5%
Група 4. Оварієктомовані самки (ОС)	Самки після білатеральної оваріоектомії	Гель із ресвератролом 1%
Група 5. Оварієктомовані самки (ОС)	Самки після білатеральної оваріоектомії	Гель із ресвератролом 2%
Група 6. Оварієктомовані самки (ОС)	Самки після білатеральної оваріоектомії	Гель із ресвератролом 3%

Інтровагінальне введення тест-зразків здійснювали за допомогою інсулінового шприца раз на день у часовому інтервалі 9.30-10.00 год. Динаміка маси тіла є непрямим підтвердженням релевантності моделі гіпоестрогенії та ефективності впливу тест-зразків на цей симптом, який виникає внаслідок порушення як рівня статевих гормонів, так і балансу естрогенів та гестагенів у крові в пременопаузальний період. Масу тіла тварин вимірювали на лабораторних електронних вагах у часовому інтервалі 9.00 – 9.15. год натщесерце. Наявність вегетативних вазомоторних порушень у самок щурів виявляли щоденно на 35 день упродовж 28 діб шляхом вимірювання температури шкіри біля кореня хвоста в інтервалі 9.15 – 9.30 год за допомогою термометра. Зміни температури на цій ділянці шкіри щурів вважають еквівалентом такого клінічного прояву клімактеричного синдрому у жінок, як «припливи жару».

Водневий показник (pH) вагінального середовища проводили за допомогою одноразових вагінальних pH-тестів Citolab (DFI Co, Ltd, Korea) вимірювали за 24 год до початку введення і через 24 год після останнього введення тест-зразків після лікування через 28 діб. Кисле середовище піхви є універсальним маркером нормального гормонального статусу та стану біоценозу генітального тракту. Мікробіологічне дослідження біотопу піхви проводили за класичною схемою визначення потенційної дисбіотичної дії

лікарських препаратів у різні строки: до початку лікування та після його завершення. Відбір біологічного матеріалу для дослідження проводили стерильними тампонами, які вносили у стерильні пробірки з тіогліколевим буферним розчином.

Рівень естрадіолу, прогестерону і тестостерону, як гормонів, які найбільшою мірою змінюються при хірургічному видаленні яєчників, вимірювали за допомогою імуноферментного методу на імуноферментному аналізаторі з використанням комерційних наборів реагентів «Естрадіол-ІФА», «Прогестерон-ІФА» і «Тестостерон-ІФА» згідно з інструкціями до наборів. Дослідження впливу обраних екстрактів на поведінку і тривожність експериментальних тварин проводили з використанням тестів «відкрите поле» та «піднесений хрестоподібний лабіринт».

Вибір антимікробних консервантів. Дослідження з вибору консерванту проводились за методикою оцінки ефективності антимікробних консервантів, наведеною в ДФУ 2.0 (Т.1, п. 5.1.3, с. 773). Принцип методу полягає у тому, що в зразки готової лікарської форми з різними консервантами, які знаходяться у первинній упаковці, вносять певну кількість тест-мікроорганізмів і зберігають ці зразки при певній температурі (від 20 до 25 °С) у захищеному від світла місці. Безпосередньо після інокуляції і через визначені проміжки часу (2, 7, 14 і 28 діб) з інокульованих зразків відбирають проби (звичайно 1,0 г) і визначають число життєздатних мікроорганізмів.

Усі дослідження виконували в асептичних умовах з використанням ламінарного бокса (кабінет біологічної безпеки AC2-4E1 «Esco», Індонезія).

Як тест-мікроорганізми для інокуляції зразків гелів використовували *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Дослідження мікробіологічної чистоти зразків здійснювали згідно з вимогами ДФУ, вид. 2, Т. 1, п. 5.1.4, використовуючи метод прямого висівання, маса зразка складала 10 г, розведення 1:10. Оцінка ступеня

мікробного забруднення препарату складалась із визначення загального числа бактерій та грибів, відсутності бактерій родини *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Статистичну обробку результатів експериментальних даних проводили згідно з методикою, наведеною у розд. «Статистичний аналіз результатів» за допомогою програми Statistica (StatSoft, USA) та Excel (Microsoft, USA)) (ДФУ, вид. 2, Т. 1, п. 5.3).

Висновки до розділу 2

1. Визначено загальну концепцію досліджень із розробки складу і технології гелю вагінального з ресвератролом та кислотою гіалуриновою.

2. Наведено опис та властивості об'єктів дослідження – діючих і допоміжних речовин, що використовувались при проведенні досліджень.

3. Наведено та опрацьовано методики фізико-хімічних, фармакотехнологічних, структурно-механічних, біофармацевтичних, мікробіологічних та фармакологічних досліджень, що були застосовані під час фармацевтичної розробки гелю вагінального.

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА СКЛАДУ І ТЕХНОЛОГІЇ ГЕЛЮ ВАГІНАЛЬНОГО

3.1 Огляд ринку препаратів для профілактики та лікування урогенітальних симптомів у пре- та постменопаузальному періоді

У різні роки дослідження українського фармацевтичного ринку ЛЗ та їх споживання стали предметом досліджень багатьох вітчизняних науковців: проф. З. М. Мнушко, проф. Л. В. Яковлевої, проф. О. М. Євтушенко, доц. О. О. Герасімової та ін. Сучасні публікації як вітчизняних, так і закордонних фахівців щодо лікування і профілактики симптомів менопаузи охоплюють останні тенденції в охороні здоров'я, практичні настанови, рекомендації щодо збереження здоров'я жінок, аналіз ринку близьких груп препаратів, а саме для лікування урологічних захворювань або препаратів статевих залоз і препаратів, що застосовуються при патології статевої сфери [102].

Інформація стосовно аналізу асортименту, структури і динаміки споживання препаратів, що застосовуються для ліквідації симптомів, викликаних саме менопаузою, зокрема урогенітальних, була відсутня.

У зв'язку з цим, нами проведений огляд вітчизняного ринку препаратів для профілактики та лікування урогенітальних симптомів у пре- та постменопаузальному періоді з метою визначення маркетингових можливостей для вітчизняної фармації.

Проведено структурний аналіз, з використанням логічного і графічного методів, методів маркетингового аналізу.

Аналіз структури асортименту, вартості препаратів, тенденцій споживання проводили за даними системи «Моріон», період проведення аналізу – вересень 2016 року – вересень 2018 року. Дослідження здійснювали також згідно з Державним реєстром лікарських засобів України та АТС-класифікацією [103, 104, 105]. Об'єктами досліджень були біоідентичні естрогени (препарати групи G03C A03 Естрадіолу валеріат, G03C A07

Естрон, G03C A04 Естріол, G01C A57 Кон'юговані естрогени), G01A X14 Ферменти лактобактерій, Прогестагени (G03D B01 Дидрогестерон, G03D A04 Прогестерон мікронізований, G03D A02 Медроксипрогестерону ацетат, G03F A01 Норетистерон, G03A D01 Левоноргестрел), комбіновані препарати (зазвичай застосовуються поєднання естрогенних компонентів із прогестагенними), стероїди та засоби рослинного походження, що мають статус ЛЗ [106]. Що стосується виробників препаратів, аналіз свідчить, що на сьогодні імпорتنі препарати займають близько 90% вітчизняного ринку за номенклатурою і понад 83% за обсягом реалізації, а за кількістю МНН – 93%. Розподіл препаратів за країнами-виробниками відповідно до кількості найменувань та форм випуску представлений на рис. 3.1–3.4. В аптеках найбільш широко представлені препарати виробництва Швейцарії, Франції, Німеччини, Данії, Фінляндії, США, Канади та інших країн, і незначно – України. Незважаючи на те, що ринок є привабливим у зв'язку з великою цільовою аудиторією, кількість вітчизняних препаратів дуже мала, бажаний обсяг ринку та ширина асортименту для вітчизняного виробника ще не досягнуті. Наприклад, вітчизняний виробник біоідентичних естрогенів ПАТ «Монфарм» з препаратом Естріол-М займає лише 7% ринку. Ринок препаратів ферментів лактобактерій та ринок стероїдів повністю імпортозалежний, а в групі препаратів прогестогену ПАТ «Фармак» займає теж незначну частку за кількістю найменувань – 6% з препаратом Інжеста.

Динаміка обсягів реалізації цих препаратів свідчить, по-перше, про стабільні обсяги попиту на ці препарати, по-друге, про поступове загальне збільшення споживання цих препаратів. Так, ланцюговий змін обсягів продажів у натуральних одиницях за 2016, 2017 та 2018 роки зростав у середньому на 1,05-1,15 (табл. 3.1).

Фізична доступність цих препаратів залишається на середньому рівні, за певними групами (дидрогестерон, левоноргестрел, ферменти лактобактерій) вона складає 55-80%, але велика частка препаратів має

проблеми з пенетрацією, наявність цих препаратів в аптеках може бути досить низькою – від 5 до 35%.

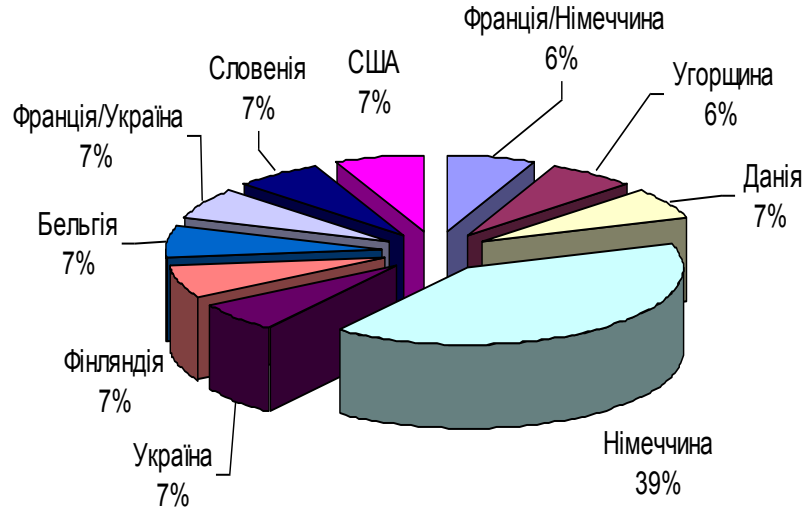


Рис. 3.1 Структура країн-виробників препаратів біоідентичних естрогенів, присутніх на фармацевтичному ринку України

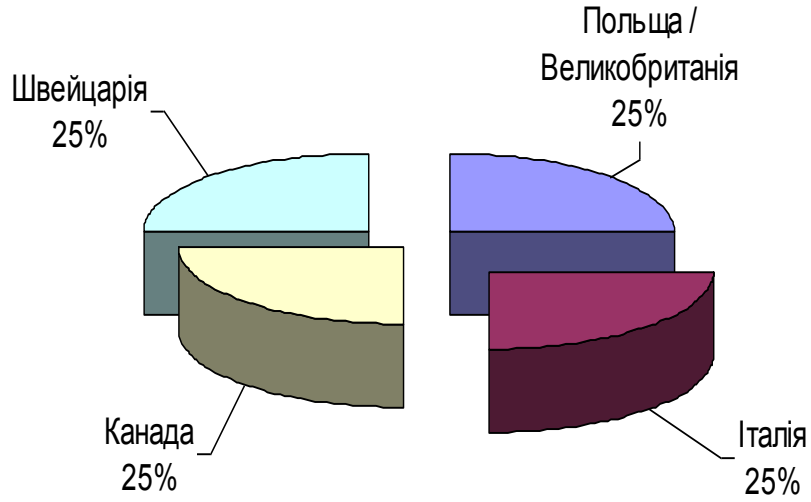


Рис. 3.2 Структура країн-виробників препаратів ферментів лактобактерій, присутніх на фармацевтичному ринку України

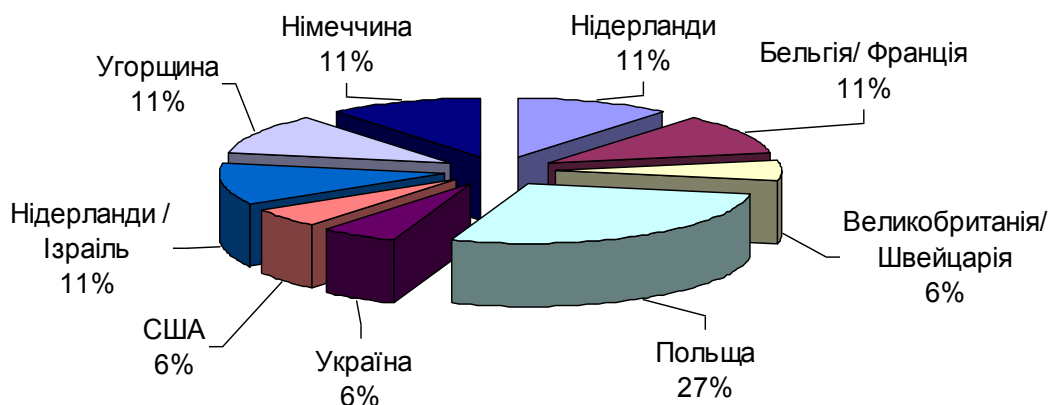


Рис. 3.3 Структура країн-виробників препаратів прогестогену, присутніх на фармацевтичному ринку України

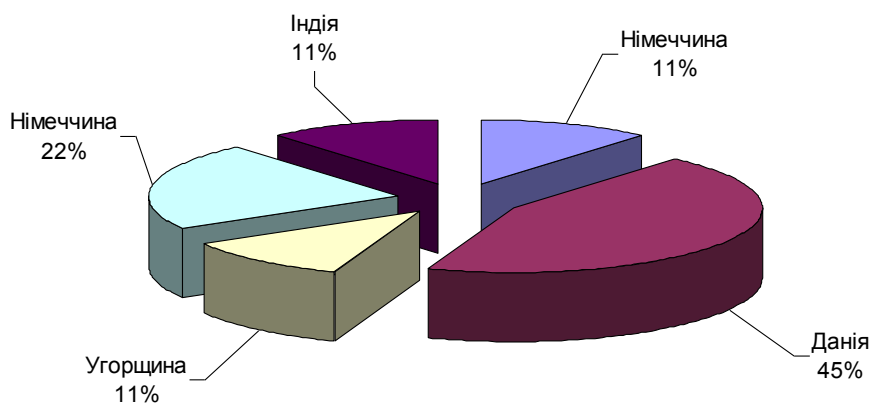


Рис. 3.4 Структура країн-виробників комбінованих препаратів для ЗГТ групи G03F, присутніх на фармацевтичному ринку України

Низьку фізичну доступність також має препарат тиболону Лівіал. Слід зазначити, що найбільший асортимент препаратів наявний в аптеках великих міст (Київ, Харків, Дніпро, Запоріжжя, Одеса, Львів, Полтава), чим далі від мегаполісів, тим менший вибір є у хворих. Причому асортимент препаратів у маленьких містах та селищах формується, судячи з усього, з тих препаратів, чії представники відвідують медичні заклади на цій території [107]. Виходить, що якщо якийсь препарат є у наявності у певному населеному пункті, то він є в усіх аптеках, а якщо якийсь препарат відсутній, його неможливо купити поблизу.

**Структура, динаміка обсягів реалізації та наявність в аптеках
препаратів, що рекомендовані для профілактики та лікування
менопаузального синдрому**

Основні діючі речовини / основна сировина	ЛЗ або ЛРС, присутні на ринку України, у складі яких є зазначені речовини	Індекс (ланцюговий) змін обсягів продажів у натуральних одиницях групи препаратів, <i>T_{ср.пр.ланц.}</i>			Наявність в аптеках препаратів певної групи, (пенетрація), 2018 р., %
		2016р	2017р	2018р	
1	2	3	4	5	6
Біоідентичні естрогени					
Естрадіолу валерат G03C A03	Прогінова, таб., Естримакс, таб.,	1,01	1,13	1,1	17-42
Естрон (E1) G03C A07	Естрофем, таб.,	1,04	1,9	1,14	30-40
Естріол (E2) G03C A04	Овестін, таб., Естріол-М, супоз., Естрокад, супоз., Дивігель, гель, Естрожель, гель, Естрамон 50, пласт., Клімара, пласт., Колпотрофін, супоз.	0,97	1,2	0,94	33-45
Кон'юговані естрогени G01C A57	Дуавів, таб.	Немає даних	Немає даних	Немає даних	Немає даних
Ферменти лактобактерій					
Ферменти лактобактерій G01A X14	Гінофлор, таб. ваг., Біоселак, капс. ваг., Вагілак, капс. ваг., Гінолакт, супоз. ваг.	0,98	0,96	1,21	50-55
Прогестагени					
Гидрогестерон G03D B01	Дуфастон, таб.	1,02	1,1	1,29	86-90
Прогестерон мікронізований G03D A04	Утрожестан, капс., Кринон, гель, Лютеїна, таб. ваг., Інжеста, р-р/ін.	0,98	1,07	1,33	31-75
Медроксипрогестерону ацетат G03D A02	Депо-Провера, сусп./ін., Вераплекс, таб.	0,95	1,1	1,02	30-34
Норетистерон G03F A01	Норколут, таб., Примолут-Нор, таб., Паузогест, таб.	1,01	0,99	0,88	34-55
Левоноргестрел G03A D01	Левоноргестрел Сандоз, таб., Клімонорм, таб.	1,02	1,01	1,01	60-80

Продовження табл. 3.1

1	2	3	4	5	6
Комбіновані препарати ЗГТ G03F (G03F A, G03F B)					
Естрогенні компоненти + прогестагенні компоненти	Гіновел, таб., Клімодієн, таб., Кліогест, таб., Активель, таб., Силует, таб., Анжелік, таб.	1	1,01	1,01	25-35
Стероїди (STEAR-терапія)					
Тиболон G03C X01	Лівіал, таб.	1,06	1,25	1,17	5-8,5
Комбіновані засоби інших груп та засоби рослинного походження*					
Циміцифуга (Cimicifuga racemosa) G02CX	Клімадинон капс., таб., та Клімадинон Уно, Клімактоплан, (Клімактоплан Н), Ци-Клім, капс., Симідона, таб.	1,13	1,25	1,43	36
Комбіновані препарати рослинного походження, що застосовуються у гінекології G02CX.	Тазалок, крап. ор., Гінекофіт, наст. склад.	1,1	0,87	1,02	40-50
Засоби, що містять амінокислоти G02CX	Аб'юфен, таб.	0,95	0,99	0,87	25-43
* Крім зазначених лікарських препаратів, для профілактики та лікування симптомів у пре- та постменопаузальному періоді застосовуються у зборах та інших формах така ЛРС: корейський женьшень (Korean ginseng), солодка, дягель лікарський, дикий ямс, соя, звіробій продірявлений, манжетка, хміль, люцерна, заманиха, ожина, алое, фенхель, пажитник сінний, перстач прямостоячий, льон, шавлія, чорний кмин.					

Усі жінки мають бути поінформовані про можливий вплив короткочасного і тривалого дефіциту естрогенів і, відповідно, про позитивний вплив ЗГТ, протипоказання і побічні ефекти. У деяких препаратів відзначається їх негативний вплив на тканини молочної залози, обмінні процеси, серцево-судинну систему. Ризик розвитку раку грудей, набору зайвої ваги, інфаркту та інсульту – це не повний перелік наслідків прийому гормональних таблеток. Тому системна замісна гормонотерапія протипоказана певним категоріям жінок, а для інших застосовується дуже обмежено, тільки в разі наявності тяжкої симптоматики. Така терапія при патологічному клімаксі протипоказана жінкам, у яких діагностовано:

– рак ендометрія, різного роду пухлини в яєчниках і молочних залозах;

- порушення згортання крові;
- порушення функціонування печінки;
- тромбоемболію, тромбофлебіт;
- маткову кровотечу нез'ясованого походження;
- ниркову недостатність [108, 109].

Також відзначається негативне ставлення частки жінок до ЗГТ. Це обумовило поповнення асортименту препаратів за рахунок упровадження в медичну практику нових активних субстанцій та розробки ефективних лікарських форм (рис. 3.5), створення сучасної упаковки та аплікаторів для їх уведення.

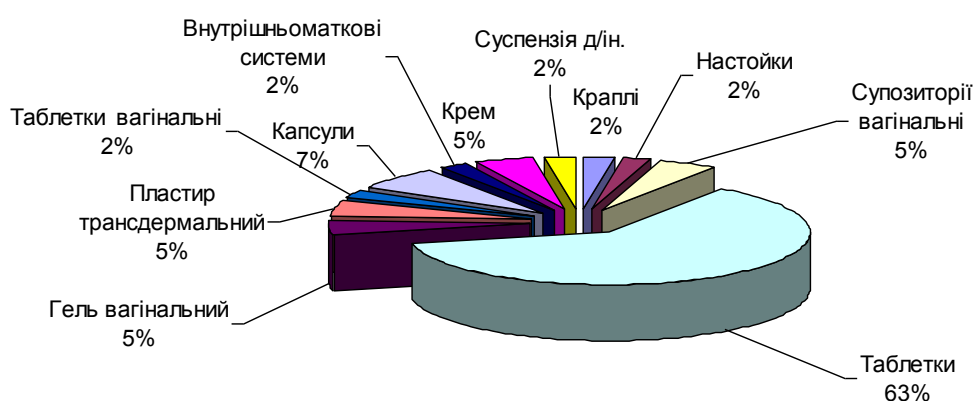


Рис. 3.5 Розподіл лікарських засобів, що застосовуються у профілактиці та лікуванні пре- та постменопаузального синдрому, за формами випуску

Найбільш популярною формою є таблетки та капсули (загалом 70%). Власну частку ринку займають суспензії для ін'єкцій (2%), краплі та настойки (по 2%), але поширюється використання препаратів місцевої дії. До них належать трансдермальні пластири, вагінальні гелі, таблетки та супозиторії, креми та внутрішньоматкові системи (загалом вони займають 28%). Левову частку серед цих препаратів займають естрогеновмісні, що виключають первинне проходження гормону крізь печінку. Їхньою перевагою є забезпечення низького рівня побічних проявів (вони дають менше тромбоемболічних ускладнень), і більш стабільного рівня естрогенів у крові [110-112]. Також прикладом можуть бути препарати з вмістом естріолу,

який володіє вибірковою активністю відносно урогенітального тракту. Естріол є однією зі складових натуральних естрогенів поряд з естроном і естрадіолом. Перевага естріолу в тому, що при місцевому застосуванні він не має системної дії – просто не встигає. Протягом 2-4 годин він зв'язується з рецепторами тканин сечостатевої системи, не зачіпаючи інші органи: міометрій, молочні залози, матку. Можна сказати, що дія препаратів, які містять естріол, на рецептори є короткочасною. Однак при цьому, як показали спостереження, інтравагінальне введення цих засобів покращує стан тканин піхви, уретри і шийки сечового міхура. За наявності в тканині незначної кількості цього гормону зменшується сухість, знижується дискомфорт під час сексуального контакту, зникає прояв розладів сечовипускання. Результати розподілу препаратів за формами випуску свідчать про широке використання препаратів місцевої дії поряд із класичними таблетками та капсулами, оскільки вони займають понад чверть досліджуваного ринку.

ЗГТ урогенітальних розладів також може здійснюватись вищезазначеними препаратами як із системною, так і з місцевою дією. Найбільш поширеними препаратами для локальної терапії генітоуринарного менопаузального синдрому залишаються препарати естріолу (моно- чи комбіновані з прогестероном, лактобактеріями тощо) [113-118]. Також існують альтернативні методи профілактики і лікування без гормональних складових. Ці варіанти можуть включати в себе фітогормони і фітоестрогени або подібні до них речовини (наприклад, препарати на основі фітоестрогенів сої, екстракту циміцифуги або червоної конюшини). Разом з тим вітчизняними та закордонними фахівцями сформульовані рекомендації, що пропонують як першу лінію терапії у жінок з вагінальної атрофією негормональні зволожувальні препарати, які мають використовуватись тривалий час і/або під час статевого акту (рівень доказовості А) [119-121].

На сьогоднішній день триває пошук нових складових для лікування і профілактики урогенітальних проявів. Так, для усунення сухості піхви становило інтерес застосування нових розробок на основі гіалуронової

кислоти. Висока біосумісність і біологічна активність гіалуронової кислоти, відсутність антигенних властивостей дозволяють широко використовувати її в багатьох сферах медицини, таких, як трансплантологія, офтальмологія, вертебрологія, комбустіологія, естетична медицина, а тепер ще й у гінекології [121].

За аналізом представлених на ринку препаратів та рекомендацій фахівців можна зазначити, що негормональна терапія ГУМС може включати гіалуронову кислоту, рослинні екстракти або олії (наприклад, сої, червоної конюшини, ромашки, алое, календули, чайного дерева, центели азійської, мигдалю тощо), водорозчинний гель на основі гідроксіетилцелюлози, вітаміни, кислоту молочну або аскорбінову тощо.

Тому наступним етапом досліджень став аналіз асортименту негормональних препаратів місцевої дії для профілактики та лікування саме урогенітальних розладів у менопаузі.

Аналіз асортименту негормональних препаратів для місцевого застосування дозволив визначити основні складові препаратів, фармакологічну дію, терапевтичні ефекти, країну-виробника (табл. 3.2).

Слід зазначити, що препарати місцевої дії, які у своєму складі містили гормони, усі зареєстровані як лікарські засоби. Але досліджувані препарати не належать до лікарських засобів, а входять до різних груп, а саме: косметичні засоби, медичні вироби, засоби для інтимної гігієни, лубриканти. Асортимент нараховує 8 найменувань препаратів закордонного та 1 вітчизняного виробництва. Закордонні препарати представлені відомими фармацевтичними виробниками з Греції, Індії, Франції, Італії, Австрії, Швейцарії, Польщі. Вони виявляють такі фармакологічні ефекти: бактерицидний, фунгіцидний, протизапальний, десенсибілізуючий, спазмолітичний, регенеруючий, відновлення мікрофлори, відновлення тонусу й еластичності слизової оболонки піхви. Останні властивості є основними, на які робиться наголос при їх просуванні на ринок.

Таблиця 3.2

**Характеристика асортименту негормональних препаратів місцевої дії для профілактики та лікування
урогенітальних розладів у менопаузі**

№	Препарат	Форма випуску	Активні інгредієнти	Фармако-терапевтична дія	Код АТХ	Фармакологічні властивості/ Показання у пре- та постменопаузальному періоді	Країна-виробник	Середньозважена ціна упаковки, 2018 р., грн
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Муважель	Гель вагінальний	Гіалуронат натрію, токоферол-ацетат	Зволожувальна, репаративна, антиоксидантна	Медичні вироби 22	При місцевому лікуванні вагінітів антисептиками, при недостатності функції яєчників різного походження, при станах, що супроводжуються сухістю слизової оболонки піхвитаї її атрофією (менопауза)	Франція	776,99
2	Гінодек	Гель вагінальний	Декаметоксин, гіалуронат натрію	Бактерицидна, фунгіцидна, і протизапальна, десенсибілізувальна, спазмолітична, регенерувальна, зволожувальна	Медичні вироби 05 Лубріканти	Стани, що супроводжуються сухістю слизової оболонки піхви (дистрофічні зміни слизової оболонки в постменопаузі, подразнення, печіння, свербіж).	Україна	332,3

Продовж. табл. 3.2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
3	Лайфемін Інтим комфорт	Супози торії вагіналь ні	Натрію гіалуронат, екстракти календули, алоє, олія чайного дерева; олійний екстракт центели азіатської	Зволожувальна, репаративна, антисептична, протизапальна	Косметичні засоби 06 Косметичні засоби для здоров'я	Відновлення слизової оболонки піхви, природне зволоження інтимної зони	Греція	235,92
4	Ревітакса	Супози торії вагіналь ні	Натрію гіалуронат, екстракти календули, алоє, олія чайного дерева; олійний екстракт центели азіатської	Регенеративна, антисептична, протизапальна і імуностимулюваль на для швидкого відновлення слизо- вої оболонки піхви	Косметичні засоби 06 Косметичні засоби для здоров'я	Відновлення слизової оболонки при запальних станах піхви, атрофічних і дистрофічних кольпітах, при ерозії шийки матки	Греція	254,32
5	Цикатри- діна	Супози торії вагіналь ні	Натрієва сіль гіалуронової кислоти, олійні екстракти центели азіатської, календули, алоє віра; ефірна олія чайного дерева	Відновлення мікрофлори, регенерація тканин	Медичний виріб CE 0373	Відновлення процесів в ділянках атрофічних та дистрофічних змін слизової оболонки піхви	Італія	253,07

Продовж. табл. 3.2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
6	Інтинова	Гель вагінальний зволожувальний	Екстракти алое віра, мигдалю, гамамелісу, пуерарії, мірифіки, женьшеню звичайного, гранатового дерева; гіалуронова кислота	Відновлення тону і еластичності слизової оболонки піхви, зволожувальна	Косметичні засоби 06 Косметичні засоби для здоров'я	Сухість слизової оболонки піхви та її атрофія (менопауза)	Індія	218,0
7	Гелік	Гель д/інтим. заст. зволожувальний	Гідроксіетилцелюлоза, хлоргексидину гідрохлорид (0,01%)	Зволожувальна	Косметичні засоби 04, 4.3 Засоби для інтимної гігієни, лубриканти	При недостатності виділення природного секрету	Австрія	69,2
8	Гінофіт	Гель вагінальний	Гідроксіетилцелюлоза, р-анісова кислота, натрію гідроксид, гліцерин, левулінова кислота	Протизапальна, зволожувальна	Медичні вироби 22	Підтримка природного лужно-кислотного балансу жіночих зовнішніх статевих органів, усунення печіння, дискомфорту, сухості	Швейцарія	360,0
9	Феміnum інтима	Таб. вагінальні	L-аскорбінова кислота, вітамін Е, інουλін, гіалуронова кислота	Відновлення мікрофлори, підтримання фізіологічного рН, зволожувальна, регенерація тканин	Медичні вироби 22	Ліквідує дискомфорт і сухість слизової оболонки піхви, зменшує свербіж, виділення з піхви, неприємний запах	Польща	206,24

Ці препарати добре психологічно сприймаються хворими, добре переносяться, мають швидку дію та незначну кількість побічних ефектів. Для виробників вони цікаві можливістю використання вітчизняної сировинної бази, що зменшує собівартість продукції і спрощує логістичну складову, полегшує процес контролю якості, а також тим, що ця група препаратів входить у високовартісну нішу. Виходячи з нижчої собівартості вітчизняний виробник зможе запропонувати ринку конкурентну ціну, зробити препарати доступнішими, при цьому не втративши необхідної рентабельності. Тобто розробка препаратів для лікування та профілактики урогенітальних проявів у менопаузі, їх виробництво є перспективним напрямком у розвитку вітчизняної фармацевтичної науки та промисловості.

3.2 Дослідження з розробки складу гелю з ресвератролом та кислотою гіалуроновою

3.2.1 Елементний аналіз екстракту ресвератролу

Важливе значення при створенні препаратів, що містять речовини природного походження, є визначення їх макро- і мікроелементного складу. Це зумовлено їх можливим біологічним впливом та екологічними факторами. Відомо, що мінеральні компоненти визначають терапевтичну значущість та дозволяють прогнозувати виявлення фармакологічної активності [122]. Вони є ініціаторами та активаторами біологічних процесів, ферментативних реакцій, доповнюють та підсилюють лікувальну дію на організм людини. Хімічні елементи входять до складу рослин у легкозасвоювальній формі, що властива живим організмам [123]. Тому нами був проведений аналіз джерел літератури щодо впливу макро- та мікроелементів на урогенітальну систему жінок (табл. 3.3). Також значну роль відіграють макроелементи: калій, кальцій, магній, фосфор, хлор, натрій.

Рекомендована доза мікроелементів у жінок

Вік або особливості періоду	Мікроелемент								
	Cr	Cu	F	J	Fe	Mn	Mo	Se	Zn
9 – 13	21	700	2	120	8	1,6	34	40	8
14 – 18	24	890	3	150	15	1,6	43	55	9
19 – 30	25	900	3	150	18	1,8	45	55	8
31 – 50	25	900	3	150	18	1,8	45	55	8
51 +	20	900	3	150	8	1,8	45	55	8
Вагітність	30	1000	3	220	27	2,0	50	60	11
Грудне годування	45	1300	3	290	9	2,6	50	70	12
Верхня межа	НВ	5000 – 10000	10	600 – 1100	40 – 45	6 – 11	1100 – 2000	280 – 400	23 – 40

Примітка. НВ – не визначається; звичайним шрифтом наведені рекомендовані добові дози, жирним шрифтом – адекватний рівень споживання.

Враховуючи вищенаведене, на наступному етапі досліджень нами був проведений аналіз мікроелементного складу екстракту ресвератролу атомно-емісійним спектрографічним методом, який заснований на випарюванні зразків із кратерів графітових електродів та збудженні спектрів у дузі.

Результати проведених досліджень наведено у табл. 3.4. Дослідження проводили на базі ДНУ НТК «Інститут монокристалів» НАН України. Маса досліджуваного зразка складала 0,7521 г, маса отриманої золи – 0,0021 г.

Наведені результати свідчать, що до складу екстракту ресвератролу в необхідній кількості, згідно з визначеною терапевтичною концентрацією, входять есенціальні мікроелементи (цинк, марганець, купрум, залізо), баланс яких буде сприяти зникненню клінічних симптомів естрогенодефіциту.

Елементний склад зразка екстракту ресвератролу

Елемент	Вміст мг/100 г	Функція в організмі
K	196,0	Регулює водно-електролітний баланс та осмотичний тиск у клітинах живого організму
Si	168,0	Знижує проникність судинної стінки, має протизапальну дію, бере участь в імунологічних процесах
Na	84,0	Підтримує нормальний баланс рідин в організмі, відіграє основну роль у нормальному функціонуванні нервової системи та м'язової тканини
Mg	67,0	Регулює гліколіз, роботу нервової системи, синтез білка, сприяє виведенню холестерину
Ca	56	Бере участь у регуляції водного балансу, входить до складу нервової тканини, гормонів
Mn	22,4	Є каталізатором дії багатьох ферментів, стимулює синтез холестерину і жирних кислот; сприяє кращому засвоєнню заліза і міді, активізуючи процес кровоутворення, сприяє утворенню інсуліну
Fe	15,7	Входить до складу гемоглобіну, є складовою частиною багатьох ферментів та білків, підвищує активність імунної системи
P	14,0	Входить до складу ферментів, що забезпечують діяльність головного мозку та інших органів
Zn	11,2	Регулює рівень глюкози, сприяє кровотворенню, нормальній роботі імунної системи
Al	10,1	Входить до структури оболонки нервових клітин головного мозку. При підвищенні вмісту є токсичним
Ni	1,4	Бере участь у структурній організації та функціонуванні ДНК та РНК, регулює гормональний фон організму, підвищує активність ферментів
Cu	0,36	Бере участь у тканинному диханні та кровотворенні, підвищує захисні сили організму, бере участь у синтезі гемоглобіну, інсуліну та інших білків
Sr	0,31	Підтримує щільність кісток та хрящової тканини, при збільшенні концентрації є токсичним
Mo	0,067	Стимулює глюкокортикоїдні рецептори, сприяє метаболізму вуглеводів та жирів, попереджує анемію
Pb	<0,03	Є токсичним елементом для людини

Наявність неесенціальних елементів (фосфор, нікель, кремній) буде сприяти відновленню ураженої слизової піхви, оскільки вони є компонентами мембран клітин. Ці елементи також є кофакторами ферментів, які запускають процес відновлення функцій уrogenітальної

системи. Вміст токсичних елементів не перевищує гранично допустимі межі.

Отримані результати елементного складу екстракту ресвератролу підтверджують доцільність використання його у терапії естрогенодефіцитних станів у жінок.

3.2.2 Фізико-хімічні дослідження активних фармацевтичних інгредієнтів

Термічні методи дослідження досить поширені, що обумовлено швидкістю отримання інформації про фізико-хімічні властивості активних фармацевтичних інгредієнтів. Тому нами був проведений дериватографічний аналіз АФІ гелю вагінального, що розробляється. Він дозволяє дослідити поведінку індивідуальних речовин в умовах програмованого нагріву. Кількісну та якісну оцінку процесів, які виникають при підвищенні температури, здійснювали за кривими тепловиділення або зміни маси при обробці дериваторам.

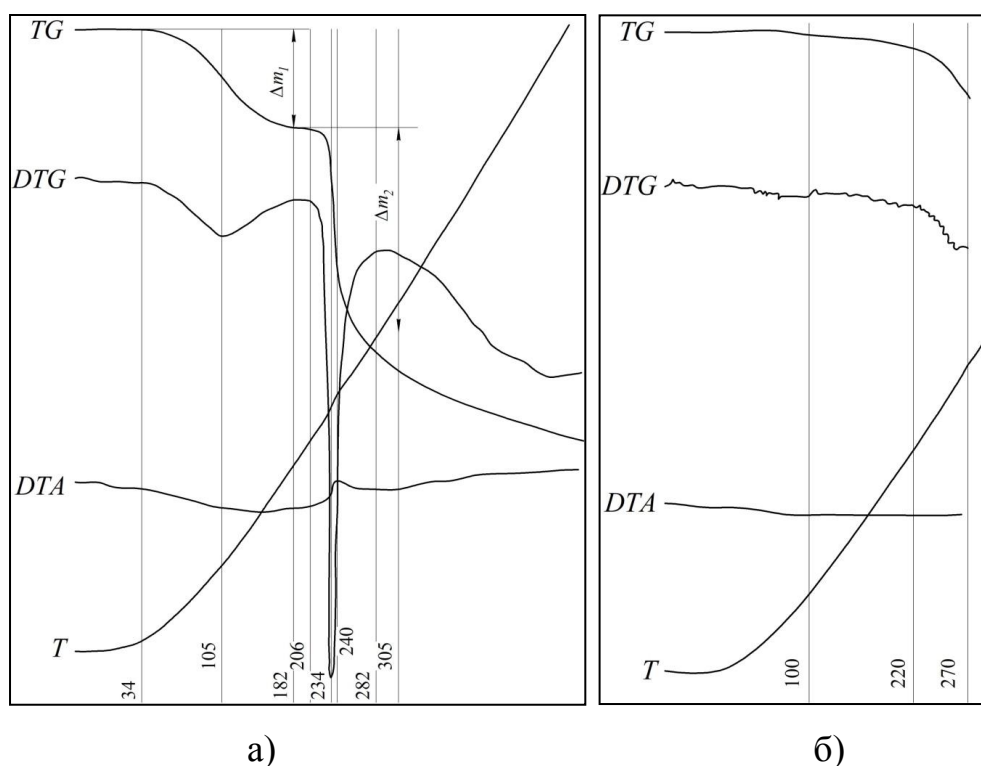


Рис. 3.6 Дериватограми діючих речовин: а) кислота гіалуронова; б) екстракт ресвераторолу

Як видно з рис. 3.6, а, зменшення маси зразка кислоти гіалуронової починається при температурі 34°C і триває до 182°C. На першому етапі втрата маси зразком складає 15% від маси наважки. Максимальна швидкість процесу спостерігається при t 105°C. Ендо- та екзотермічні реакції не відбуваються. Другий етап відбувається при температурі 206–282°C зі втратою 38% від маси наважки. Процес супроводжується вираженою екзотермічною реакцією (можливе горіння або розрив валентних зв'язків та виділення частин макромолекули). Максимальна швидкість втрати маси спостерігається при температурі 234°C.

Зразок ресвератролу (рис. 3.6, б) до температури 100°C втрачає лише 0,4% маси. При 220°C починається інтенсивна втрата маси та спінювання. При 270°C утворюється багато піни, що унеможливорює подальше нагрівання зразка. Екзо- та ендоефекти не спостерігаються.

Результати термографічного дослідження свідчать, що кислота гіалуронова є термолабільною речовиною. Це важливо враховувати при розробці технологічного процесу отримання препаратів на її основі. Екстракт ресвератролу – термостабільна речовина, яка не має ознак хімічного розкладу до температури 220°C.

Результати фізико-хімічних і технологічних досліджень активних фармакологічних інгредієнтів є визначальними при обґрунтуванні технології отримання препарату. Розчинність АФІ, розмір частинок, здатність розподілятися у гелевій основі безпосередньо впливають на вибір компонентів основи та параметри технологічного процесу.

Тому наступним етапом наших досліджень було визначення розчинності екстракту ресвератролу та кислоти гіалуронової.

За даними кристалографічних досліджень, проведених за допомогою мікроскопа Konus Academy, оснащеного відеокамерою Scope Tek (рис. 3.7), встановлено, що ресвераторол являє собою суміш полідисперсних частинок неправильної об'ємної форми, з уламками на гладкій поверхні темно-

коричневого кольору. Лінійний розмір частинок коливається від 0,075 до 0,5 мкм. Фактор форми становить 0,75.

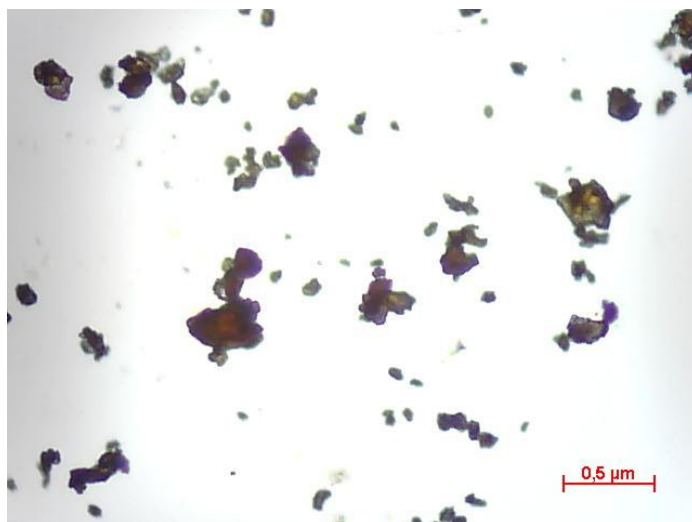


Рис. 3.7 Микрофотография порошку экстракта ресвератролу

Для визначення способу введення ресвератролу до складу гелю необхідно було встановити його розчинність у розчинниках, які найчастіше використовуються в технології м'яких лікарських форм. Тому проведено дослідження розчинності екстракту ресвератролу у воді очищеній, олії персиковій, пропіленгліколі, поліетиленоксиді-400, етанолі 96% та гліцерині. Ці речовини впливають на осмотичні властивості, стійкість лікарської форми щодо висихання та біодоступність АФІ [124].

Результати визначення розчинності екстракту ресвератролу наведено у табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Розчинність екстракту ресвератролу

Розчинник	Результати дослідження
Вода очищена (20 °C)	Практично не розчинний (1 : 10000)
Спирт етиловий (96 %)	Легко розчинний (1 : 5)
Олія персикова	Практично не розчинний (1 : 10000)
Пропіленгліколь	Легко розчинний (1 : 5)
Поліетиленоксид- 400	Розчинний (1 : 15)
Гліцерин	Дуже мало розчинний (1 : 9000)

Для проведення дослідження розчинності ресвератролу мікроскопічним методом були виготовлені зразки ресвератролу з розчинниками у співвідношенні 1 до 5.

Отримані результати при дослідженні розчинності екстракту ресвератролу у воді очищеній при температурі 20°C (рис. 3.8) свідчать, що субстанція є нерозчинною, але знижується агломерація частинок та покращується їх розподіл у рідкому середовищі. Суспензія має частинки від 0,075 до 0,5 мкм, але порівняно з сухою субстанцією спостерігається збільшення фракції частинок із середнім розміром 0,1 мкм. Зміна зовнішнього вигляду частинок свідчить про їх незначне змочування водою очищеною.

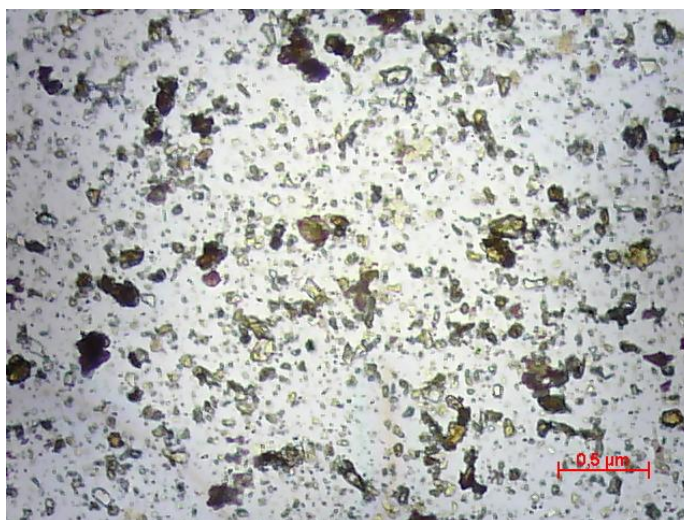


Рис. 3.8 Мікрофоторграфія екстракту ресвератролу у воді очищеній

Додавання гліцерину до сухого екстракту (рис. 3.9) також зменшує здатність до агломерації та покращує розчинність, про що свідчить зникнення з поля зору частинок розміром 0,1 та 0,5 мкм. Переважають частинки, середній розмір яких складає 0,25 мкм. Тобто можна стверджувати, що екстракт ресвератролу є помірно розчинним у гліцерині.

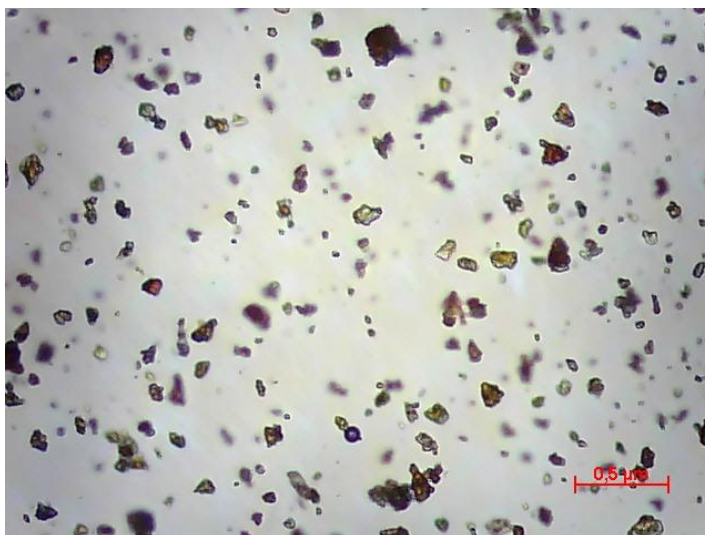


Рис. 3.9 Мікрофотографія екстракту ресвератролу у гліцерині

Результат дослідження зразка ресвератролу в олії персиковій (рис. 3.10) показав, що вона помірно сприяє змочуванню субстанції, але змочування не впливає на розчинність, про що свідчить практично незмінений лінійний розмір частинок ресвератролу.

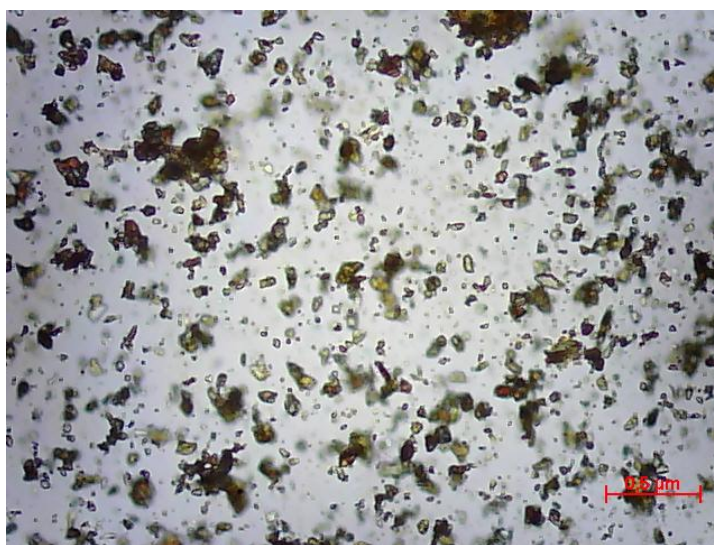


Рис. 3.10 Мікрофотографія екстракту ресвератролу в олії персиковій

При додаванні пропіленгліколю до екстракту ресвератролу (рис. 3.11) спостерігається значна зміна форми та розміру частинок – до 0,01 мкм. Розчинення субстанції відбувається за короткий проміжок часу, про що свідчить зміна лінійного розміру частинок до 0,01 мкм і ділянка інтенсивного

забарвлення навколо них. За 5 хв дослідження видимих частинок не спостерігається.

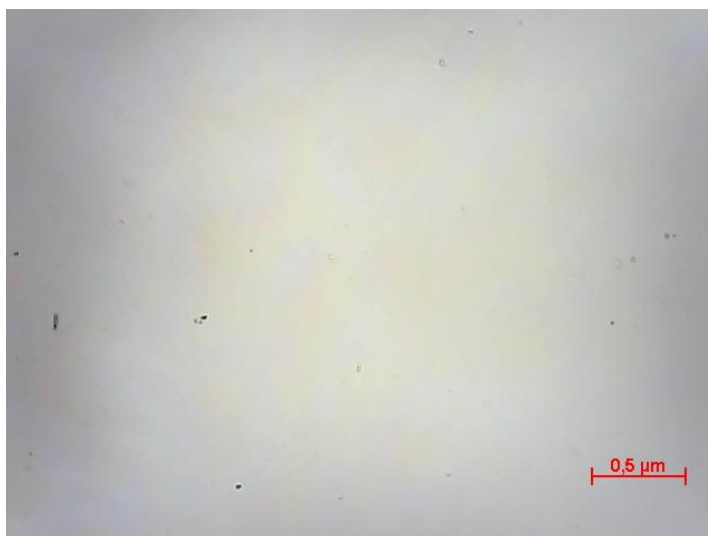


Рис. 3.11 Мікрофотографія екстракту ресвератролу у пропіленгліколі

Якісна та кількісна характеристика розчинності екстракту ресвератролу в ПЕО–400 (рис. 3.12) практично ідентична пропіленгліколю, але лінійний розмір частинок змінюється у часі значно повільніше і коливається від 0,015 до 0,15 мкм.

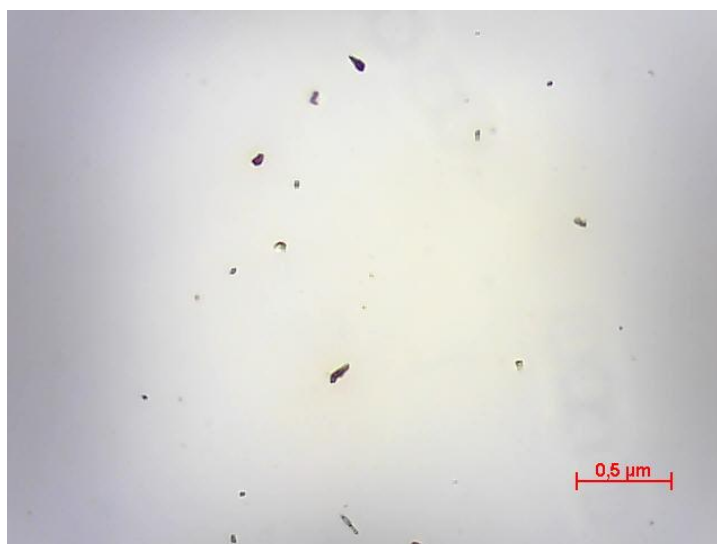
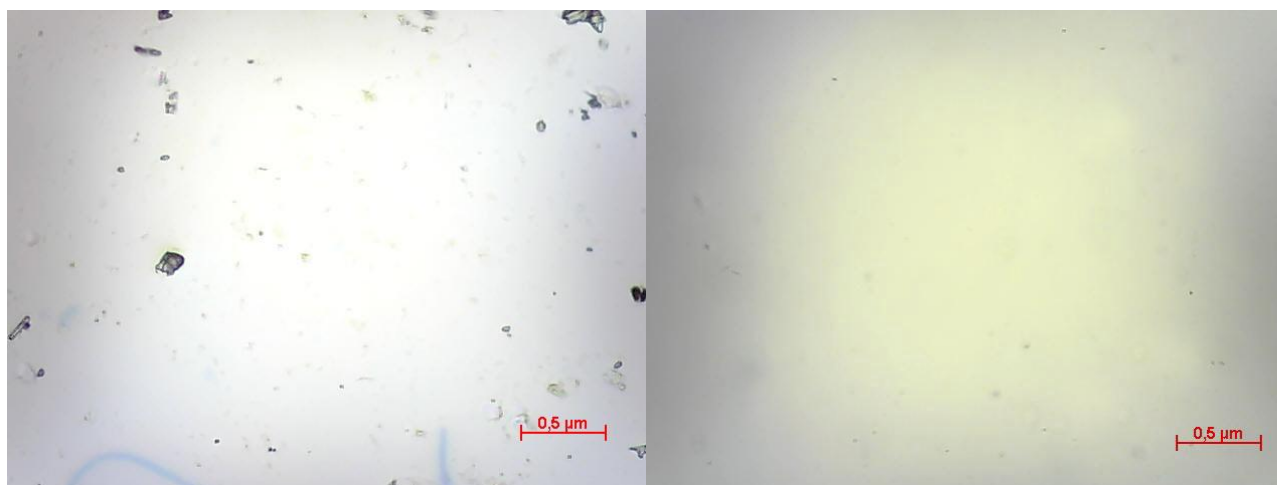


Рис. 3.12 Мікрофотографія екстракту ресвератролу у ПЕО–400

Гарні показники розчинності спостерігаються у зразку з етанолом 96% (рис. 3.13). Упродовж короткого проміжку часу (5 хв) спостерігається зміна лінійних розмірів частинок з 0,2 мкм до їх повного розчинення.



а) (початок)

б) (через 5 хв)

Рис. 3.13 Мікрофотографія екстракту ресвератролу в спирті етиловому 96%

Наприкінці дослідження спостерігається яскраве жовте забарвлення у полі зору без видимих частинок екстракту.

Отже, отримані результати дозволяють зробити висновок, що розчинність екстракту ресвератролу змінюється в ряду етанол, пропіленгліколь, ПЕО–400, гліцерин, олія та вода. З даних табл. 3.5 та рис. 3.7 – 3.13 видно, що екстракт ресвератролу легко розчиняється у спирті етиловому 96% та пропіленгліколі, розчиняється у поліетиленоксиді–400, дуже мало розчиняється у гліцерині, практично не розчиняється у воді очищеній та олії персиковій.

У зв'язку з тим, що спирт етиловий не рекомендовано застосовувати у складі вагінальних лікарських форм через можливу подразливу дію, екстракт ресвератролу до складу гелю було вирішено вводити у вигляді розчину в пропіленгліколі.

3.2.3 Визначення розчинності кислоти гіалуронової

Об'єктом дослідження була низькомолекулярна кислота гіалуронова з молекулярною масою 0,1 МДа.

Розчинність кислоти гіалуронової

Розчинник	Результати дослідження
Вода очищена (20 °С)	Легкорозчинна 1:2
Спирт етиловий (96 %)	Помірно розчинна (1 : 40)
Олія персикова	Помірно розчинна (1 : 40)
Пропіленгліколь	Розчинна (1 : 20)
Поліетиленоксид- 400	Помірно розчинна (1 : 30)
Гліцерин	Помірно розчинна (1 : 30)

Як видно з даних табл. 3.6, речовина помірно розчиняється у гліцерині, пропіленгліколі, олії соняшниковій та етанолі. У воді очищеній речовина є легкорозчинною, у поліетиленоксиді – розчинною. Для більш детального встановлення кількісних та якісних характеристик процесу розчинення гіалуронової кислоти у розчинниках, які найчастіше використовуються у виробництві лікарських форм, був застосований мікроскопічний аналіз. Визначення проводили протягом 5 хв після контакту речовини та розчинника [125, 126].

На рис. 3.14 наведено форму та розмір частинок сухого порошку кислоти гіалуронової.

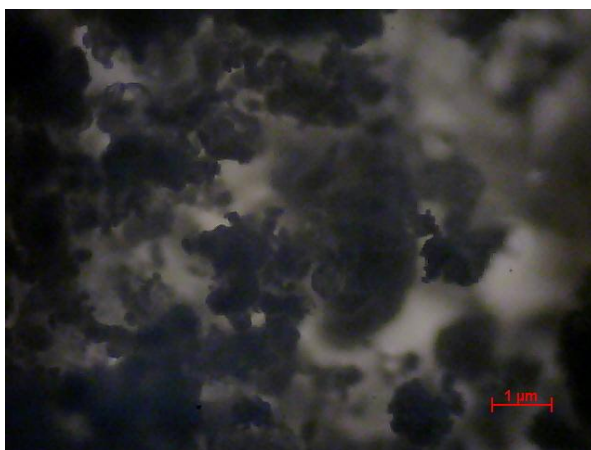


Рис. 3.14 Мікрофотографія сухого порошку кислоти гіалуронової

Як видно з рис. 3.14, частинки порошку здатні до агломерації. Їх скупчення має вигляд багатогранників з неоднорідною шорсткою поверхнею, з фактором форми приблизно 0,8 і розміром від 0,7 до 1,2 мкм. Отримані дані

дозволяють зробити висновок, що агрегати кислоти гіалуронової мають велику питому поверхню порівняно з окремими частинками, що зі свого боку, дозволяє прогнозувати незадовільне змочування субстанції.

Аналіз даних рис. 3.15 свідчить, що у суміші кислоти гіалуронової з гліцерином відбувається зміна форми частинок по всій поверхні, в полі зору спостерігаються як агрегати, так і окремі частинки з лінійним розміром від 0,01 до 0,5 мкм.

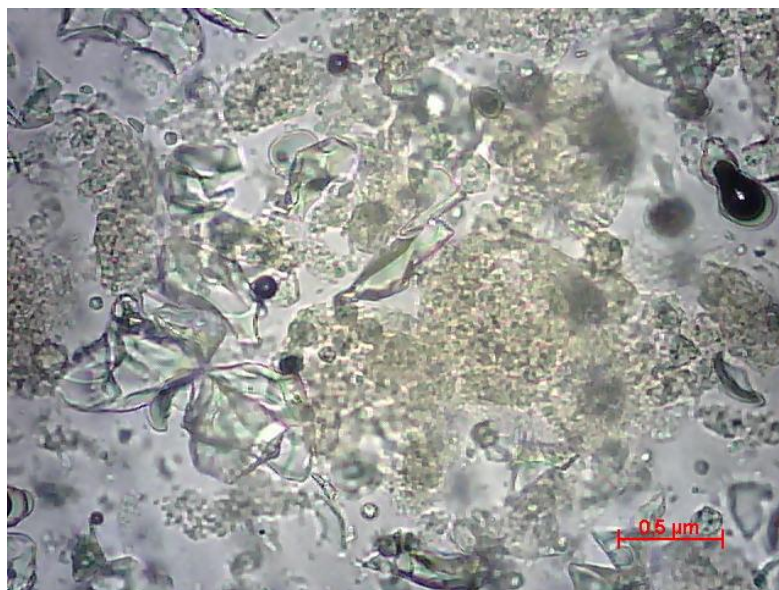


Рис. 3.15 Мікрофотографія кислоти гіалуронової у гліцерині

При додаванні пропіленгліколю (рис. 3.16) спостерігалось утворення нерозчинної дисперсії частинок порошку кислоти гіалуронової.

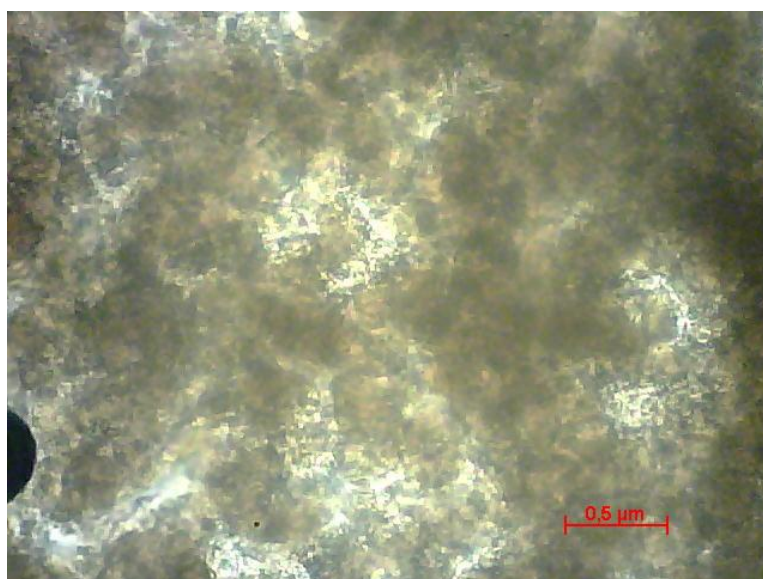


Рис. 3.16 Мікрофотографія кислоти гіалуронової у пропіленгліколі

Додавання ПЕО-400 (рис. 3.17) сприяє початку процесу крайового змочування з подальшою зміною форми та лінійних розмірів частинок. У полі зору спостерігаються як набухлі частинки, так і їх агломерати. Лінійні розміри коливаються від 0,01 до 0,5 мкм. Отримані результати свідчать про тривалий процес розчинення з обмеженим набуханням.

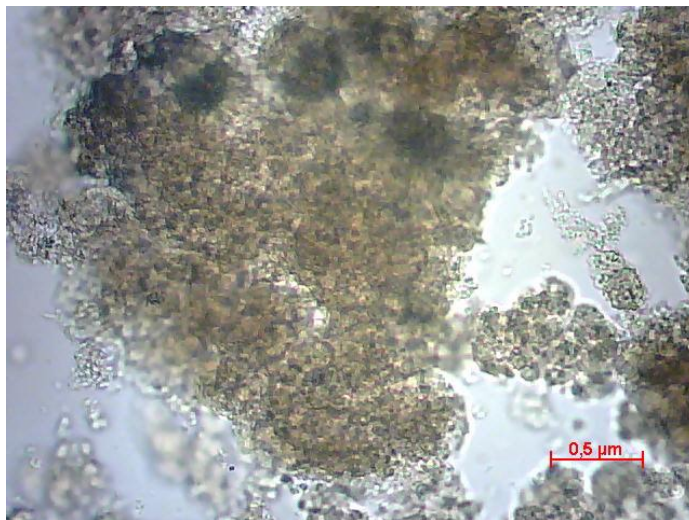


Рис. 3.17 Мікрофотографія кислоти гіалуронової у ПЕО-400

Додавання олії персикової до кислоти гіалуронової (рис. 3.18) сприяло утворенню щільних агломератів із включенням бульбашок повітря. Змочування спостерігалось лише в окремих частинках.



Рис. 3.18 Мікрофотографія кислоти гіалуронової в олії персиковій

Додавання спирту етилового до кислоти гіалуронової (рис. 3.19) не приводило до зміни лінійних розмірів та форми частинок, але спостерігався їх розподіл в об'ємі розчинника.



Рис. 3.19 Мікрофотографія кислоти гіалуронової у спирті етиловому 96%

Зміна мікроскопічної картини спостерігалась при додаванні води очищеної (рис. 3.20). У полі зору відмічались окремі частинки з одночасним набуханням утворених агрегатів.

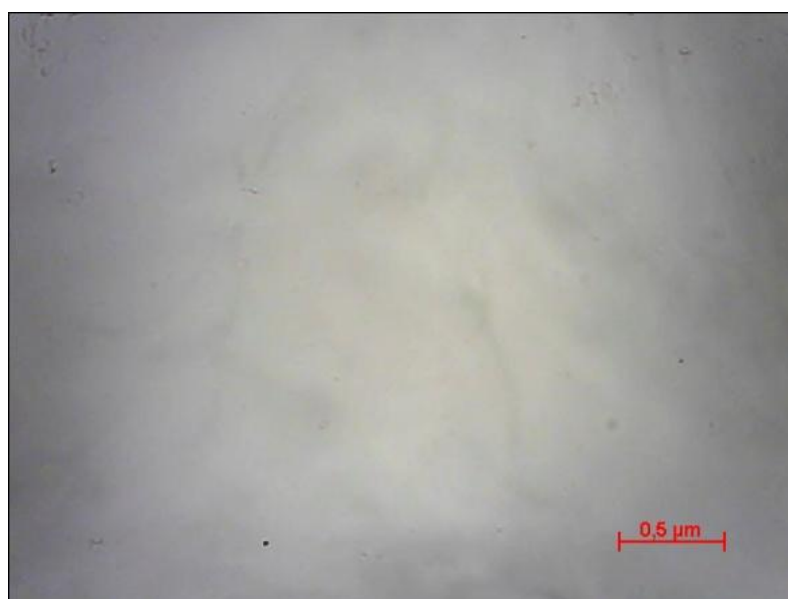


Рис. 3.20 Мікрофотографія кислоти гіалуронової у воді очищеній (20°C)

Отже, за результатами мікроскопічних досліджень було встановлено, що кращими показниками розчинності володіє вода очищена. Відбувається необмежене набухання порошку кислоти гіалуронової у водному середовищі при температурі 20° С з утворенням гомогенної системи через певний проміжок часу. Використання таких розчинників, як ПЕО-400, пропіленгліколь, гліцерин, спирт етиловий 96 % та олія персикова приводить до помірного змочування та перерозподілу частинок порошку в об'ємі розчинника.

Результати проведених досліджень дозволяють обґрунтувати вибір води очищеної як розчинника кислоти гіалуронової у складі гелю вагінального.

3.3 Дослідження з вибору гелеутворювача у складі препарату

Для проведення дослідження нами були обрані 6 сучасних гелеутворювачів: Aristoflex AVC (нейтралізований зшитий співполімер акриламідопропілпропанової сульфоновної кислоти і вінілпіролідону), Serimax Zen (нейтралізований асоціативний полімер з гарною стійкістю до електролітів), Sepinov EMT 10 (порошковий полімер з гарними стабілізувальними властивостями), гідроксietилцелюлоза (ГЕЦ) (похідне целюлози, неіонний водорозчинний полімер), Карбопол Ultrez 21 (високомолекулярний полімер акрилової кислоти) та Methocel (водорозчинний ефір целюлози – метилцелюлоза і гідроксипропілметилцелюлоза) у концентрації 1,5%.

До складу дослідних зразків активні фармацевтичні інгредієнти – екстракт ресвератролу та кислоту гіалуронову – вводили у кількості 0,5%. Як розчинник екстракту ресвератролу використовували пропіленгліколь (10%), кислоти гіалуронової – воду очищену. Зразки були виготовлені у лабораторних умовах при температурі 25 °С, швидкість обертів мішалки складала 100 об/хв. До води очищеної додавали кислоту гіалуронову,

залишали для набухання на 120 хв. Далі у розчин кислоти додавали гелеутворювач і також залишали для набухання на 60 хв, далі перемішували до утворення однорідного гелю. Екстракт ресвератролу розчиняли у пропіленгліколі та вводили у гель.

Органолептичні показники отриманих зразків представлені в табл. 3.7.

Таблиця 3.7

Органолептичні характеристики зразків гелю

№	Гелеутворювач	Органолептичні характеристики
1	Aristoflex AVC	Гель із невеликою кількістю бульбашок повітря, з легким специфічним запахом, однорідної консистенції, світло-коричневого кольору, липкий, нетягучий
2	Sepimax Zen	Гель із легким специфічним запахом, з великою кількістю бульбашок повітря, світло-коричневого кольору, однорідної консистенції, липкий, малотягучий
3	Sepinov EMT 10	Гель однорідної консистенції, світло-коричневого кольору, з легким специфічним запахом, без бульбашок повітря, нелипкий, злегка тягучий
4	ГЕЦ	Гель світло-коричневого кольору, з легким специфічним запахом, однорідний після перемішування, нещільної рідкої консистенції, злегка липкий, тягучий
5	Карбопол Ultrez 21	Гель однорідної консистенції з легким специфічним запахом, з великою кількістю бульбашок повітря, світло-коричневого кольору, липкий, нетягучий
6	Methocel	Гель без бульбашок повітря, нещільний, з легким специфічним запахом, світло-коричневого кольору, однорідний після перемішування, липкий, тягучий

Із результатів, наведених у табл. 3.7, видно, що всі зразки однорідні за консистенцією, мають однаковий колір і специфічний запах. Зразки з додаванням Карбополу Ultrez 21, Methocel, ГЕЦ, Aristoflex AVC липкі на дотик, що може сприяти зчепленню гелю зі слизовою піхви. Зразки № 4 та 6 за щільністю поступаються іншим. Зразки № 2 і 3 клейкі, здатні до розтягування, видовжуються, не розриваючись.

Із даних літератури відомо, що при розробці вагінальних лікарських форм важливим є визначення їх рН. У нормі у дорослої здорової жінки реакція піхвового вмісту кисла (вагінальний секрет має досить агресивний рівень рН – 4,0-4,5 [128, 129], який є бактерицидним для 90 % інфекційних

агентів, що потрапляють у піхву) [130-132]. При залуженні внутрішнього середовища піхви створюються умови для розвитку транзиторної та патогенної мікрофлори, що призводить до розвитку інфекційно-запального процесу і вагініту. Причиною зміни рН у лужний бік може бути зменшення колоній лакто- і біфідобактерій, що продукують молочну кислоту і перекисні сполуки, які власне і створюють необхідне значення рН й антибактеріальний бар'єр [132-135]. Тому нами було проведено визначення рН зразків, виготовлених на різних гелеутворювачах (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

рН дослідних зразків гелю

№ зразка	рН
1	4,3 ±0,1
2	4,5 ±0,2
3	4,3 ±0,2
4	4,4 ±0,1
5	5,1 ±0,1
6	4,6 ±0,2

Із табл. 3.8 видно, що всі зразки, за винятком зразку №5 на основі карбополу, мають рівень рН, що відповідає водневому показнику піхви здорової жінки.

Як відомо, утворення гелів пов'язане з виникненням і зміцненням зв'язків між макромолекулами полімерів з утворенням просторової сітки, що утримує в проміжках до 99% від загального об'єму розчинника [136, 137]. Гелі володіють такими реологічними та структурно-механічними властивостями, як в'язкість, пластичність, еластичність, пружність. Міцність внутрішньої структури залежить від природи та співвідношення складових гелевої основи та оцінюється граничною напругою зсуву і тиксотропністю, які характеризують стан системи у статичних умовах, а також пластичною в'язкістю, що характеризує стан системи у динамічних умовах. Реологічні параметри також впливають на такі показники якості лікарського засобу, як стійкість до руйнування, зручність і легкість нанесення на поверхню шкіри,

біодоступність діючої речовини. Крім того, оптимізувати виробничий процес можна, використовуючи дані реологічних досліджень. Вивчення реологічних параметрів має важливе значення для вибору швидкості перемішування, температурного режиму та визначення критичних стадій при промисловому виробництві лікарських засобів у формі гелю [138-141]. Під час проведення реологічних досліджень необхідно визначити такі показники, як в'язкість та напруга зсуву. Напруга зсуву є мірою інтенсивності опору внутрішніх сил пружності. Межа напруги зсуву характеризує можливість гелів чинити деякий опір при намазуванні, здатність витискатися з туб та дозаторів промислового обладнання [142-143]. Тому на наступному етапі нами були проведені реологічні дослідження зразків гелів. За результатами дослідження були побудовані реограми плинину (рис. 3.21).

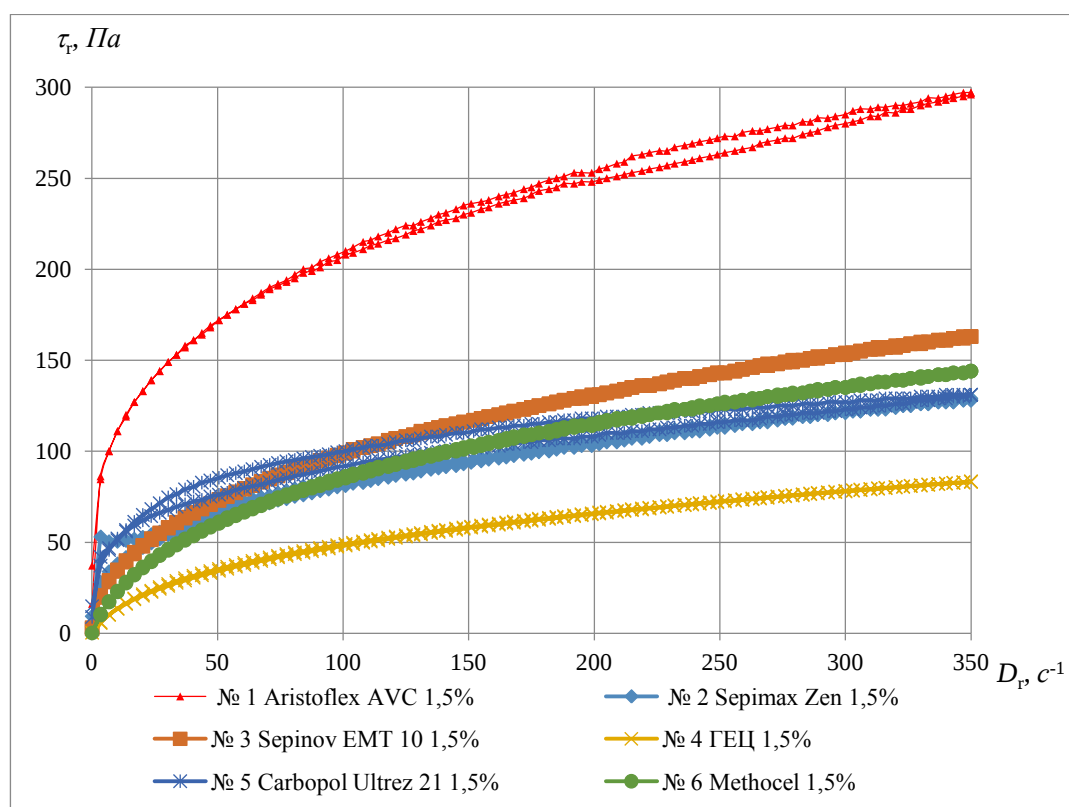


Рис. 3.21 Реограми плинину зразків гелів №1-6

Отримані результати свідчать, що всі зразки при постійних зовнішніх умовах і різних швидкостях зсуву змінюють свої показники, тобто вони належать до неньютонівського типу плинності. На відміну від ньютонівських

структурованих систем, ці системи характеризуються не динамічною, а ефективною в'язкістю. Плинність структурованої системи настає у мить, коли напруга сил зсуву перевищує напругу, яка називається межею плинності [144-145].

Як видно з рис. 3.21, для обраних систем характерне поступове зменшення в'язкості залежно від збільшення швидкості зсуву. Підвищення напруги зсуву до показників межі плинності призводить до стрибкоподібної зміни в'язкості. При збільшенні навантаження в'язкість зразків знижується, але після зняття впливу зовнішніх сил в'язкість відновлюється, що свідчить про псевдопластичний тип течії і тиксотропність структури. Оскільки усі досліджувані зразки мають властивість повністю відновлюватись після руйнування, це дозволяє припустити наявність взаємодії між частинками та молекулами через прошарки дисперсійної середи за рахунок сил зчеплення Ван-дер-Ваальса, що дозволяє віднести їх до коагуляційних структур [146-150].

За розрахованим показником площі петлі гістерезису було встановлено, що вона зменшується в ряду Карбопол Ultrez 21, Aristoflex AVC, Sepimax Zen, Methocel, ГЕЦ, Sepinov EMT 10, починаючи з 2406,54 Па/с до 109,49 Па/с. На відміну від показників площі петлі гістерезису, площа під петлею гістерезису змінює свої значення, починаючи з 79990,44 Па/с до 20125,41 Па/с·мл у ряду Aristoflex AVC, Sepinov EMT 10, Sepimax Zen, Карбопол Ultrez 21, Methocel, ГЕЦ. Усі зразки дуже відрізняються за початковою в'язкістю, мінімальне значення мають зразки ГЕЦ та Methocel, яке не перевищує 2,5 Па/с. Зразки на основі Sepimax Zen та Sepinov EMT 10 мають приблизно однакове значення в діапазоні 31,6–42,04 Па/с, найбільше значення мають зразки на основі Карбопол Ultrez 21 (99,5 Па/с) та Aristoflex AVC – 174,05 Па/с. Найбільш нестабільними системами, які починають руйнуватись при мінімальній дії зовнішніх сил, є зразки на основі ГЕЦ, Methocel та Sepinov EMT 10, в'язкість початку руйнування системи не перевищує 6 Па/с. Зразки на основі Карбопол Ultrez 21 та Sepimax Zen потребують більшої дії зовнішніх сил, в'язкість початкового руйнування

структури складає 12-15 Па/с. Більш міцною структурою є зразок на основі Aristoflex AVC – 24,84 Па/с. Зразок на основі Aristoflex AVC має найбільший період релаксації за показником найбільшої в'язкості неруйнованої структури та в'язкості максимально руйнованої структури, на відміну від інших зразків, які мають значно нижчі показники. Усі зразки окрім № 1, 5 мають невелику площу петлі гістерезису, що свідчить про незначне руйнування структури під впливом зовнішніх сил. Отримані дані підтверджують розрахунки ступеня руйнування структури за методом Ребіндера.

Отримані дані (табл. 3.9) свідчать, що за показником ступеня руйнування структури найбільш стійкими є зразки на основі Aristoflex AVC, Карбопол Ultrez 21 та Sepinov EMT 10. Зразки на основі ГЕЦ та Methocel мають показник значно менший 1,0, що свідчить про їх нестабільність під дією зовнішніх сил і можливість розшарування та седиментації діючих речовин.

Таблиця 3.9

Показники міцності зразків

Зразок	№ 1 Aristoflex AVC	№ 2 Sepimax Zen	№ 3 Sepinov	№ 4 ГЕЦ	№ 5 Карбопол Ultrez 21	№ 6 Methocel
Ступінь руйнування структури	7,23	2,86	5,64	0,13	8,53	0,26
Механічна стабільність	1,2	0,73	0,88	0,2	1,3	0,3

Пояснити отримані дані можна наявністю просторової сітки у досліджуваних зразках, яка виражена тим сильніше, чим більша різниця між η_0 і η_p та збільшенням показника межі плинності, який характеризує міцність структури. На рис. 3.22 наведені криві зміни в'язкості залежно від швидкості зсуву.

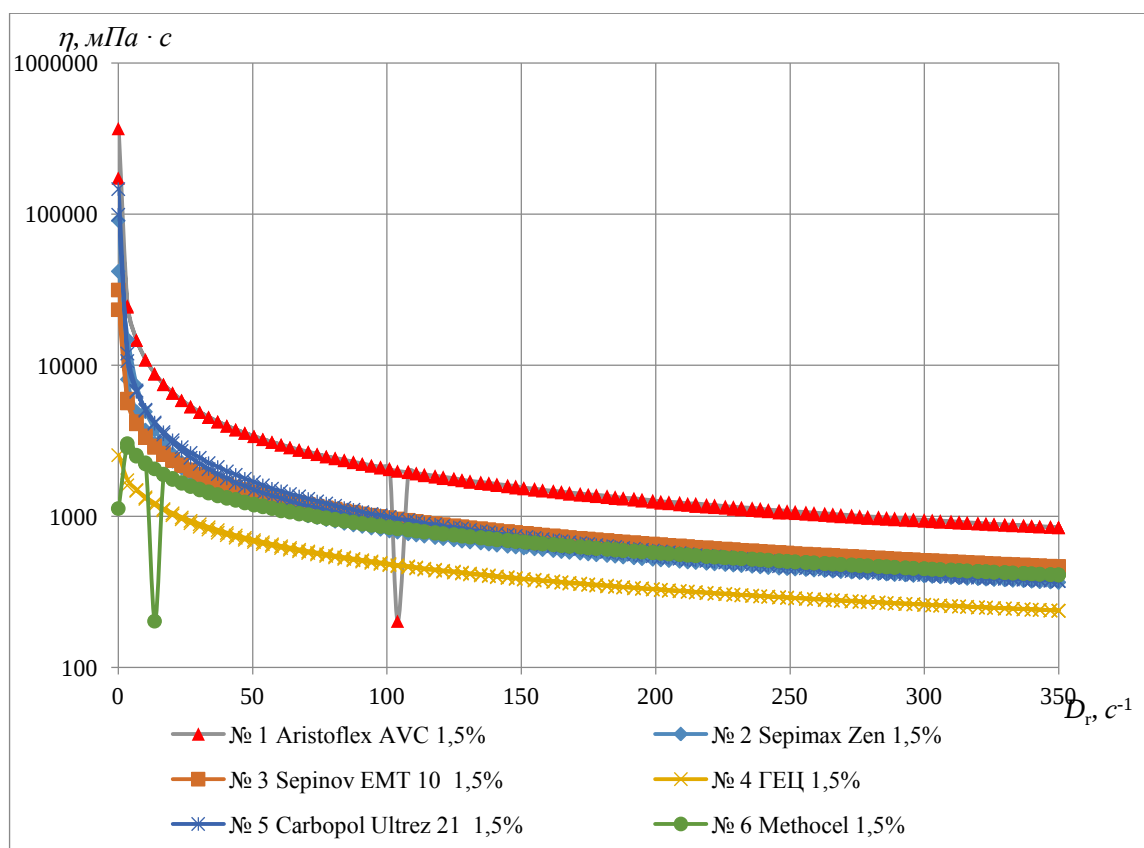


Рис. 3.22 Криві зміни в'язкості досліджуваних зразків залежно від швидкості зсуву

Як видно з рис. 3.22, усі зразки є пластичними системами, в яких межа плинності явно виражена, її перевищення викликає різке зменшення значення ефективної в'язкості. Результати дослідження залежності в'язкості від градієнта швидкості зсуву свідчать, що структурна в'язкість зразків № 1-6 швидко зменшується в діапазоні $0,1-20\ s^{-1}$, потім поступово зменшується. Для зразків № 1 та 5 критична напруга зсуву перебуває в області $0,1-10\ s^{-1}$ на відміну від $10-20\ s^{-1}$ для зразків № 2, 3, 4, 6, що дозволяє зробити висновок про їх більш міцну структуру. В ділянці малих значень криві зразків № 1, 5 мають прямолінійні ділянки з малим нахилом до осі абсцис, що свідчить про доволі низьку швидкість деформації. Так, у результаті проведених досліджень було встановлено, що за комплексом структурно-механічних властивостей подальші дослідження з розробки складу і технології гелю доцільно проводити зі зразком № 1 на основі Aristoflex AVC, який є найбільш стабільною структурою з оптимальними показниками в'язкості для

вагінальних гелей [151]. Застосування зразка на основі Карбопол Ultrez 21 може призвести до труднощів у процесі екструзії та фасування, а зразки на основі Sepimax Zen, Sepinov EMT 10, Methocel та ГЕЦ не мають належних споживчих характеристик.

3.4 Обґрунтування вмісту пропіленгліколю та аристофлексу у складі гелю

За даними літератури відомо, що введення до складу м'яких лікарських засобів гідрофільних неводних розчинників уповільнює процес втрати вологи препаратами та впливає на вивільнення діючих речовин [152]. Тому наступним етапом було дослідження впливу різних концентрацій пропіленгліколю на вивільнення екстракту ресвератролу з гелю вагінального. У ході попередніх досліджень було встановлено, що саме ПГ є оптимальним розчинником ресвератролу, крім того, він сприяє рівномірному розподілу кислоти гіалуронової.

Для визначення раціонального вмісту ПГ у складі гелю вагінального були виготовлені зразки з ресвератролом 0,5% (результати фармакологічних досліджень з обґрунтування вмісту екстракту ресвератролу у складі гелю наведено у розділі 5) та кислотою гіалуроною 0,5%, до складу яких був уведений ПГ у концентрації 10% (зразок № 1) та 15% (зразок №2). Збільшення концентрації пропіленгліколю, за даними літератури, є недоцільним [153, 154].

Були проведені біофармацевтичні дослідження вивільнення ресвератролу методом рівноважного діалізу крізь напівпроникну мембрану впродовж 6 годин. Оптичну густину отриманих проб визначали за допомогою спектрофотометра Evolution 60-S при довжині хвилі 270 нм за методикою, наведеною у розділі 2.

Графічне порівняння загальної кількості ресвератролу, яка перейшла у розчин, наведено на рис. 3.23.

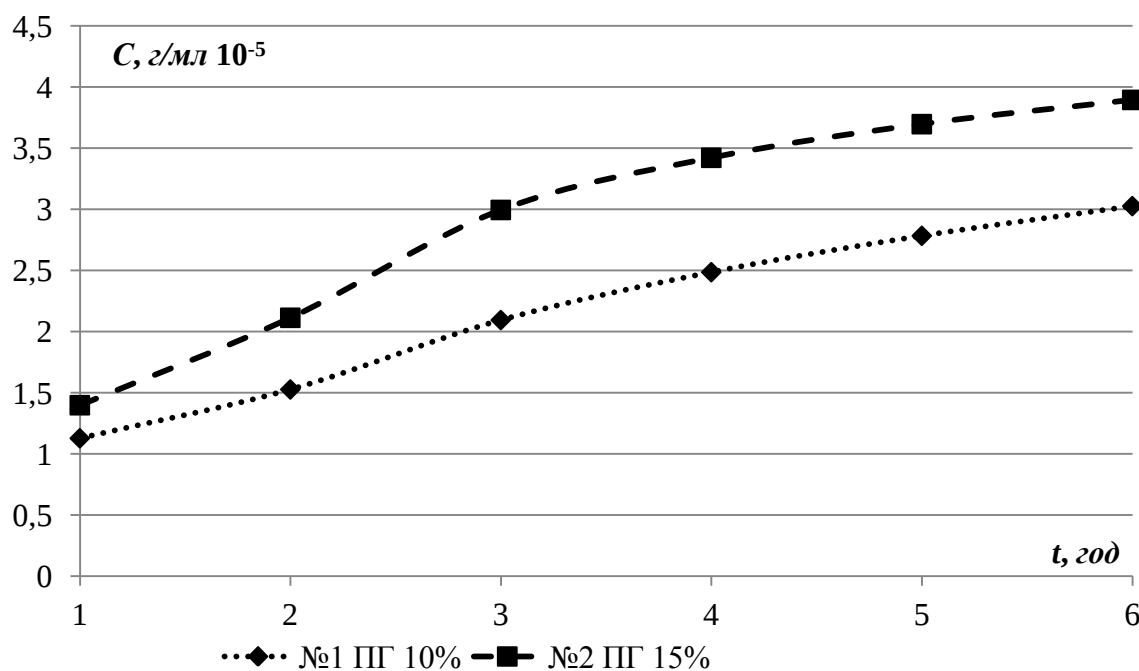


Рис. 3.23 Загальна кількість ресвератролу, яка перейшла до розчину, г/мл 10^{-5}

Результати, наведені на рис. 3.23, свідчать, що збільшення концентрації пропіленгліколю до 15% сприяє зростанню швидкості та повноти вивільнення діючої речовини зі зразків гелю. За 6 годин дослід зразка № 2 у розчин перейшло в 1,3 разу більше ресвератролу порівняно зі зразком № 1.

За рахунок наявності у складі великої кількості води усі гелі мають здатність до висихання при порушенні герметичності упаковки після відкриття та при зберіганні упродовж тривалого часу. Тому нами був досліджений вплив різних концентрацій ПГ на висихання гелю.

Для проведення дослідження було виготовлено 3 зразки гелю вагінального з концентрацією пропіленгліколю 5, 10 та 15%. Висихання зразків визначали за різницею між вихідною масою зразка та масою зразка після 24 годин зберігання. Втрату маси визначали кожну годину. Дослідження проводили при температурі 25 С. Результати дослідження наведені на рис. 3.24.

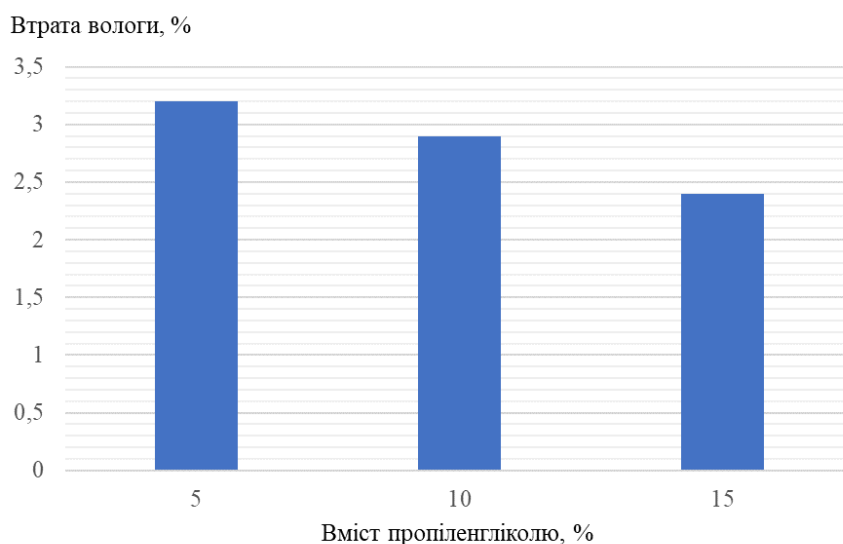


Рис. 3.24 Втрата води зразками

Як видно з діаграм, найкращу стійкість до висихання має зразок із концентрацією пропіленгліколю 15%. Відсоток втрати води складає 2,4 %, тоді як зразки з концентрацією ПГ 5 та 10% мають показники втрати води 3,2 % та 2,9 % відповідно.

Отже, було встановлено, що збільшення концентрації пропіленгліколю у складі гелю зменшує ступінь його висихання. Таким чином визначено, що раціональним є вміст ПГ у складі гелю у кількості 15%. Збільшення вмісту ПГ, за даними літератури, є недоцільним і буде призводити до значного розрідження лікарської форми [155].

Наступним етапом досліджень був вибір оптимальної концентрації гелеутворювача (аристофлексу) у складі гелю [156]. Концентрацію гелеутворювача визначали за реологічними показниками, використовуючи реометр Rheolab QC, Anton Paar (Австрія), який відповідає вимогам стандарту ISO 3219, за методикою, наведеною у розділі 2.

Для дослідження були виготовлені зразки з концентрацією аристофлексу 1, 1,5 та 2% та вмістом пропіленгліколю 15% (табл. 3.10).

Склад дослідних зразків

№ зразка	Вміст аристофлексу AVC, %	Вміст пропіленгліколю, %
2а	1	15
2б	1,5	15
2в	2	15

Результати дослідження наведені на рис. 3.25.

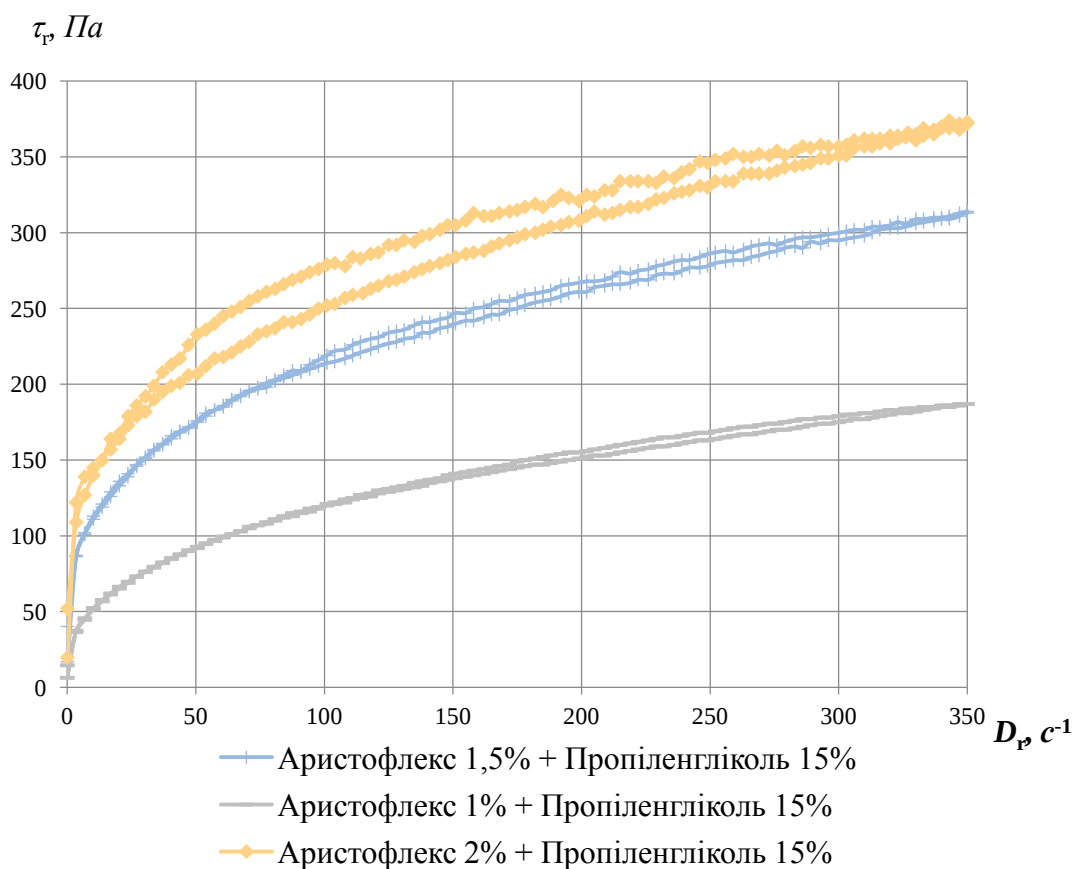


Рис. 3.25 Реограми зразків гелю з різною концентрацією гелеутворювача

Як видно з рис. 3.25, усі системи є коагуляційними з псевдопластичним типом плинності та певним ступенем тиксотропності. Зразок з концентрацією аристофлексу 1% є розрідженою системою, яка практично не має структури, про що свідчить мінімальна площа петлі гістерезису – 951,12 Па/с.а.ч Різниця

між початковою та кінцевою в'язкістю складає 77000 мПа/с, що може свідчити про його нестабільність при мінімальній дії зовнішніх сил. Збільшення концентрації гелеутворювача приводить до зміцнення структури. Зразки з концентрацією 1,5 та 2 % аристофлексу потребують збільшення сили зсуву у 2 рази для розрідження структури порівняно зі зразком із концентрацією гелеутворювача 1%. Але у зразку з концентрацією 1,5% площа петлі гістерезису (1375,62) менша, ніж площа у зразку з концентрацією 2% (5350,26), що свідчить про більшу здатність до рівномірного розподілу в місці нанесення та кращих споживчих властивостях зразка 2б [157]. Залежність в'язкості дослідних зразків від швидкості зсуву наведена на рис. 3.26.

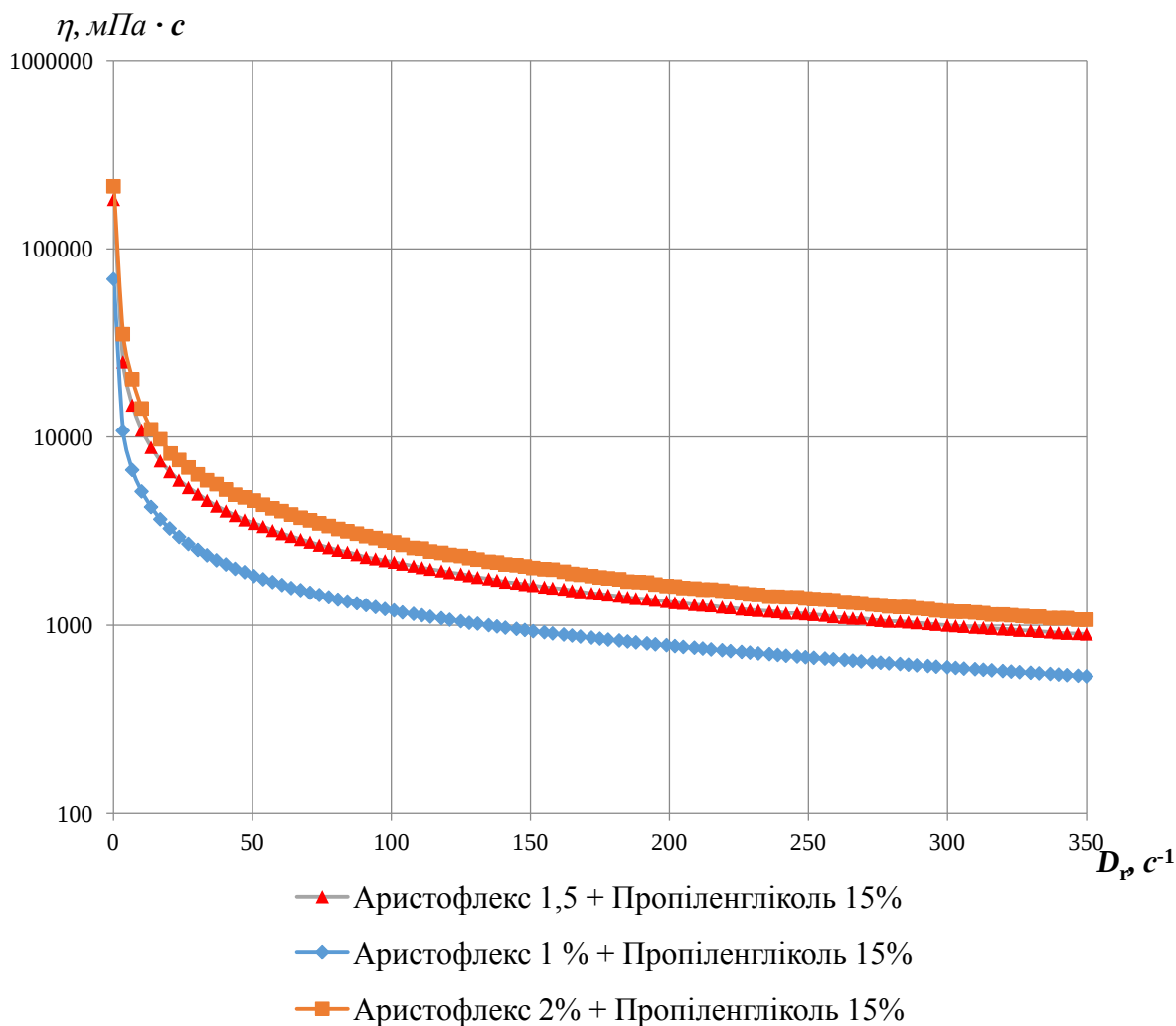


Рис. 3.26 Криві зміни в'язкості досліджуваних зразків залежно від швидкості зсуву

Як видно з рис. 3.26, при збільшенні швидкості зсуву зразок із концентрацією аристофлексу 1% є найменш міцним. При збільшенні швидкості зсуву в цьому зразку спостерігається різка початкова втрата в'язкісних параметрів порівняно з іншими. Вплив швидкості зсуву в зразках із концентрацією аристофлексу 1,5 та 2 % відбувається повільніше. Збільшення вмісту гелеутворювача сприяє утворенню щільнішої структури, що підтверджують показники механічної міцності, наведені у табл. 3.11.

Таблиця 3.11

Показники міцності зразків гелю з Aristoflex залежно від його концентрації

Параметр	Концентрація гелеутворювача		
	1 %	1,5 %	2 %
Механічна міцність	0,91	1,12	1,41

За результатами, що наведені у табл. 3.11, встановлено, що показники механічної міцності зразка з концентрацією аристофлексу 1,5 % максимально наближені до 1, на відміну від інших зразків. Зразок із концентрацією аристофлексу 1% є нестабільною системою, на що вказує значення механічної міцності менше 1. Результати вивчення механічної міцності зразка з 2% аристофлексу свідчать про щільну структуру, що може призводити до його нерівномірного розподілу у місці нанесення та погіршення вивільнення діючої речовини з лікарського засобу. Отримані дані вказують на можливість зразку з концентрацією гелеутворювача 1,5 % витримувати механічний вплив у процесі гомогенізації та мати необхідну консистенцію при нанесенні.

Для підтвердження доцільності вибору концентрації 1,5 % було проведено порівняння структурно-механічних показників зразка з препаратом «Гінодек» у формі вагінального гелю, який широко застосовується у лікуванні гінекологічних захворювань (рис. 3.27).

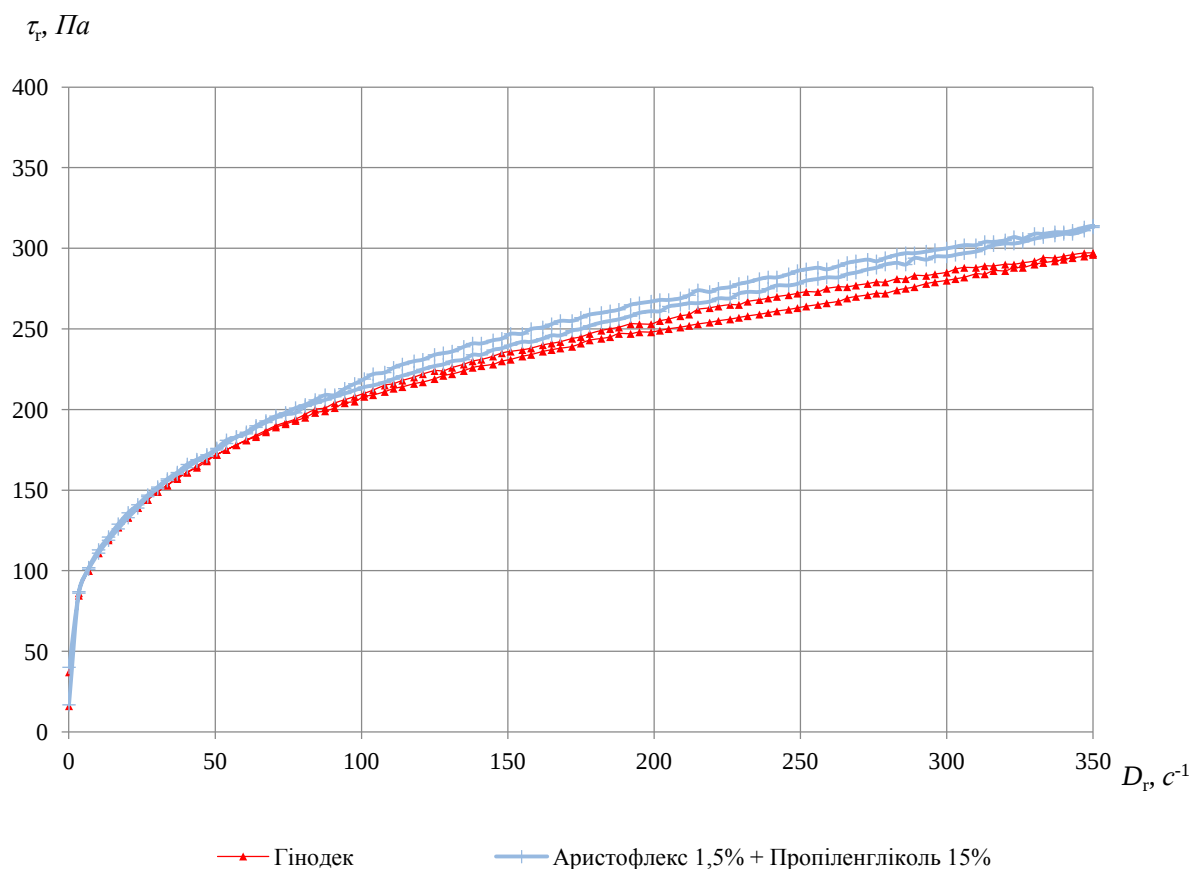


Рис. 3.27 Реограми досліджуваних зразків

Як видно з рис. 3.27, зразки за реологічними показниками майже не відрізняються один від одного, що може свідчити про задовільні споживчі характеристики гелю з концентрацією аристофлексу 1,5 %.

Для визначення впливу ПГ на реологічні показники гелю був проведений порівняльний аналіз структурно-механічних параметрів зразків, що містили ПГ у кількості 15% та без ПГ, результати якого наведені у табл. 3.12.

Таблиця 3.12

Структурно-механічні параметри зразків гелю

Показник	Аристофлекс 1,5 % + ПГ 15 %	Аристофлекс 1,5 %
Початкова в'язкість [Па/с]	174,00 ± 0,87	183,00 ± 0,81
Кінцева в'язкість [Па/с]	0,848 ± 0,73	0,897 ± 0,77

В'язкість відновленої структури [Па/с]	370,00±0,91	398,00 ± 0,57
В'язкість початку плину [Па/с]	24,84±0,65	25,10 ± 0,43
Площа петлі гістерезису [Па/с]	1397,02±0,71	1375,62 ± 0,54
Площа під петлею гістерезису	79990,44±0,72	83555,43 ± 0,62

Дані структурно-механічних параметрів двох зразків, що наведені у таблиці, відрізняються один від одного у середньому не більше ніж на 3,4 %, що свідчить про їх практично ідентичну структуру і властивості. Виходячи з результатів дослідження можна зробити висновок, що додавання пропіленгліколю до складу гелю суттєво не впливає на реологічні властивості.

3.5 Дослідження з вибору біoadгезиву у складі гелю вагінального

До гелів вагінальних висуваються вимоги щодо зручності у використанні і дозуванні і тривалості дії [158].

При розробці складу і технології вагінальних гелей у комплексі з реологічними характеристиками важливо оцінювати ступінь біoadгезії, яка визначає можливість утримання активного фармацевтичного інгредієнта (АФІ) на поверхні ураженого органа за допомогою міжфазних сил продовж тривалого часу. Якщо адгезивна фіксація відбувається до слизової оболонки, цей процес називається мукоадгезією, яка обумовлює час утримання препарату на поверхні, його рівномірний розподіл, відсутність передчасної евакуації введеної дози та повноту вивільнення АФІ [159–161].

Властивості слизової тканини статевих органів обумовлені наявністю специфічних глікопротеїнів – муцинів, які знаходяться на апікальній поверхні епітеліального шару або у складі слизу. Взаємодію з муцинами та можливість тривалої фіксації з контрольованим вивільненням діючих речовин забезпечують мукоадгезивні речовини, найчастіше це гідрофільні полімери. Вони мають численні гідрофільні групи, які сприяють зчепленню

та обумовлюють набухання полімерів у рідині і таким чином збільшують кількість адгезивних ділянок [162–165].

Об'єктом дослідження були зразки вагінальних гелів з різними мукоадгезивами у концентрації 0,5%. Склад дослідних зразків наведено у табл. 3.13.

Таблиця 3.13

Склад дослідних зразків

Речовина	№ зразка				
	1	2	3	4	5
Кислота гіалуронова	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Екстракт ресвератролу	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Пропіленгліколь	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Аристофлекс	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Альгінат натрію	–	0,5	–	–	–
Метилцелюлоза	–	–	0,5	–	–
Methocel	–	–	–	0,5	–
OraRez	–	–	–	–	0,5

Як мукоадгезиви були використані: альгінат натрію (FMC BioPolymer AS, Норвегія), метилцелюлоза (Shin Etsu, Німеччина), Methocel – метилцелюлоза з гідроксипропілметилцелюлозою (Dow Pharmaceutical Sciences, США), OraRez[®] W-100L16 – співполімер вініл метилового ефіру та малеїнового ангідриду (BOAI, Китай).

Як препарат порівняння був використаний гель вагінальний «Гінодек» (Юрія-Фарм, Україна), до складу якого входить кислота гіалуронова (зразок № 6).

Вагінальні лікарські форми мають короткий час перебування у місці нанесення препарату, тому для його контролю та визначення ступеня фіксації було визначено швидкість розподілу та показники адгезії [166–167].

На першому етапі дослідження проводилось визначення швидкості розподілу зразків вагінальних гелів з різними гелеутворювачами за методикою, наведеною у розділі 2 (рис. 3.28).

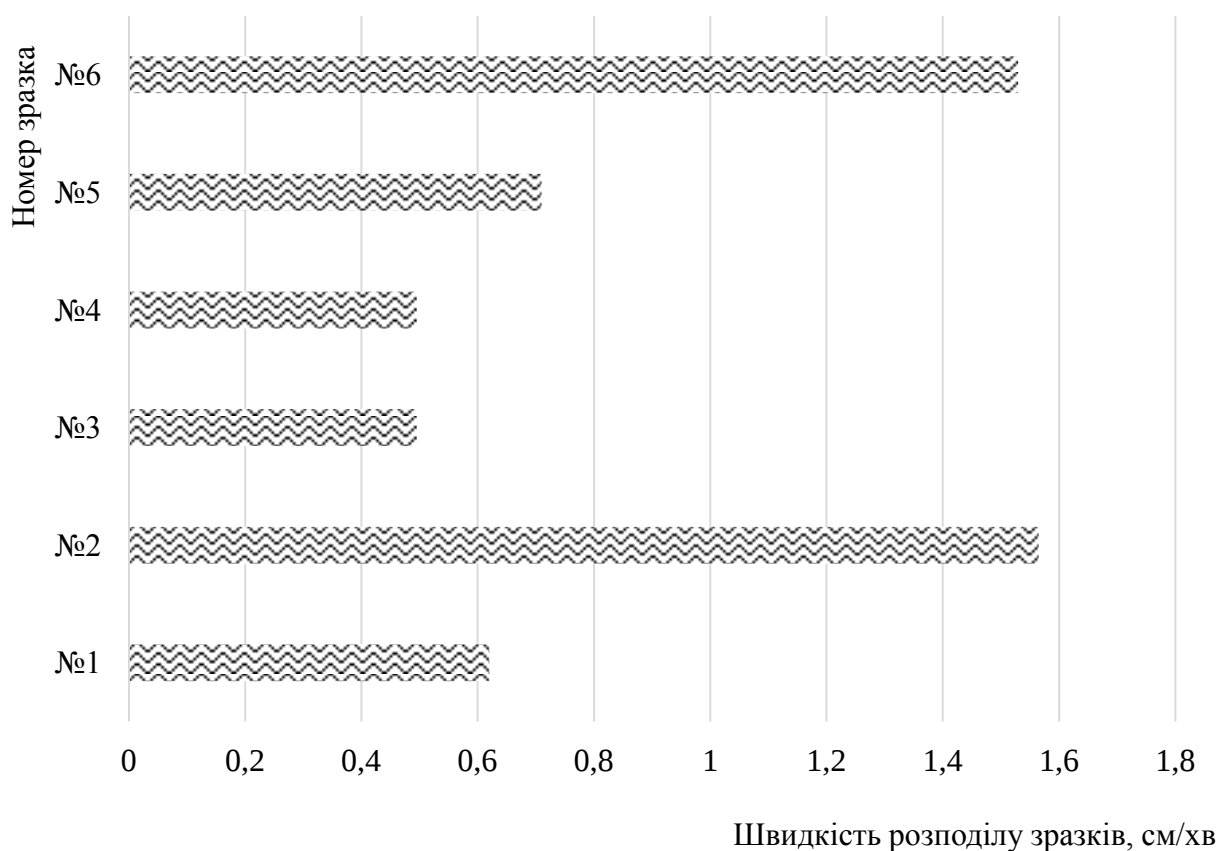


Рис. 3.28 Показники швидкості розподілу зразків

За результатами дослідження (рис. 3.28) можна зробити висновок, що зразок № 2 з альгінатом натрію має найбільшу швидкість розподілу, яка майже ідентична швидкості препарату порівняння (1,56 та 1,53 см/хв відповідно). Найменше значення мають зразки № 3 та № 4, їх швидкість розподілу складає 0,49 см/хв. Зразки № 2 та № 6 рівномірно стікали по поверхні плівки, тоді як зразки № 1, 3, 4 та 5 припиняли свій рух через декілька хвилин та утворювали скупчення гелю у вигляді краплі, що свідчить про можливість нерівномірного покриття поверхні слизової.

Здатність до розподілу під дією зовнішніх сил є важливою характеристикою м'яких лікарських форм, тому на наступному етапі

проводили визначення впливу механічної сили на розподіл дослідних зразків по поверхні модельної слизової (рис. 3.29).

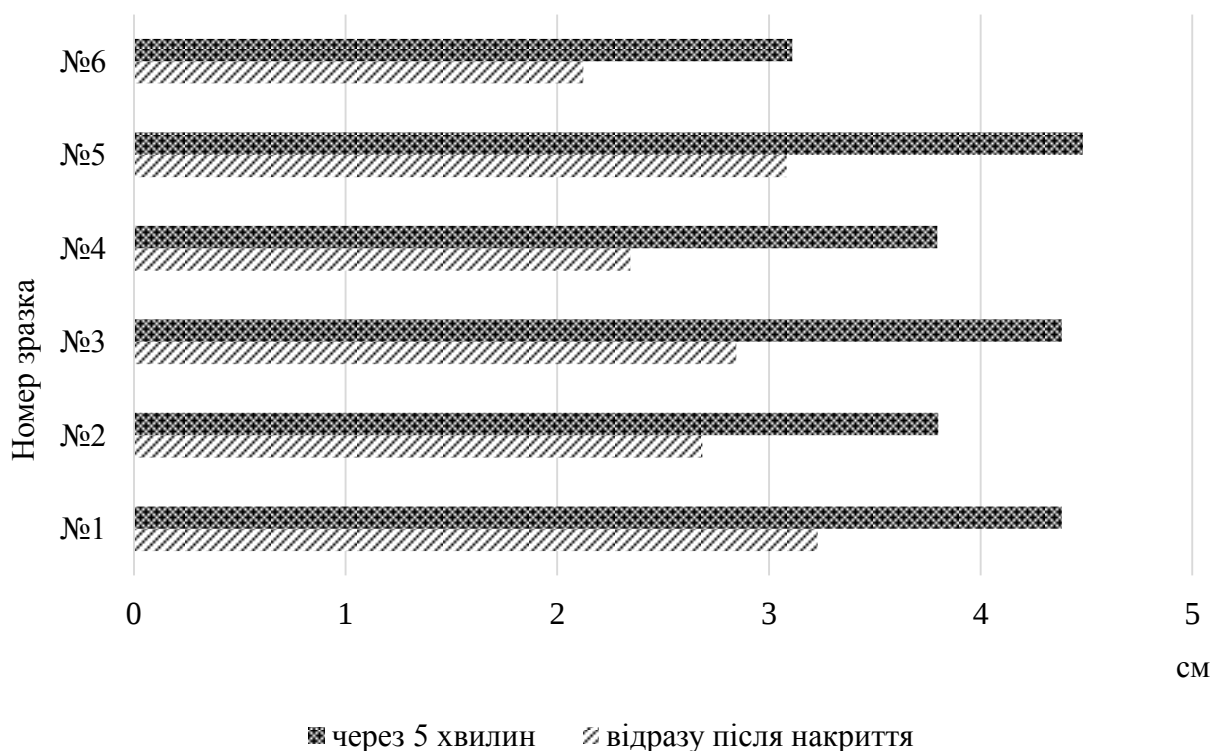


Рис. 3.29 Порівняльна характеристика діаметра плям під дією механічних сил

Зразки № 2 та 6 мають найвищі показники внутрішньої когезії, про що свідчать значення площ плям та коефіцієнти розподілу, які складають 1,42 та 1,47 відповідно. В інших зразках спостерігається зменшення сили зчеплення з поверхнею, що призводить до погіршення їх фіксації на поверхні. Коефіцієнт розподілу збільшується до 1,68.

Наступним етапом було визначення показників фіксації зразків на поверхні нанесення методом «потoku».

Органолептичні показники зразків та значення площ плям після нанесення на поверхню плівки наведені у табл. 3.14.

Як свідчать дані табл. 3.14, усі зразки здатні до розмивання протягом часу. Найближче значення площі плями до препарату порівняння має зразок № 2 з натрію альгінатом як адгезивом. Візуальне спостереження дозволяє

зробити висновок, що тільки у зразках № 2 та 6 відбувається повне закріплення плям гелю без зміни їх форми.

Таблиця 3.14

Порівняльний аналіз зразків гелю після розмивання

№	d1	d2	S	Опис
1	1	1,1	0,95 ±0,02	Спостерігається розмивання країв плями гелю, форма та рельєф не змінюються. Погана фіксація на поверхні плівки
2	1,6	1,9	2,83 ±0,11	Рівномірне розмивання країв плями. Повна фіксація на плівці
3	1,2	1,5	1,77 ±0,04	Зміна форми плями гелю. Часткова фіксація на плівці
4	1,2	1,5	1,77 ±0,05	Рівномірне розмивання країв без зміни форми та рельєфу, часткова фіксація на плівці.
5	1,3	2,2	3,80 ±0,19	Рівномірне розмивання країв плями, без фіксації на плівці
6	1,5	1,7	2,27 ±0,04	Рівномірне розмивання плями гелю з повною фіксацією на плівці

Примітка: d1 – початковий діаметр; d2 – кінцевий діаметр; S – площа плям гелю через 1 годину досліджу.

Найбільш нестійким є зразок № 5 з OraRez, який має найбільше значення площі плями ($S = 3,80$), але упродовж часу експерименту відбувається розмивання плями без фіксації на плівці. В інших зразках спостерігається зміна форми, нерівномірне розмивання без або лише з частковою фіксацією на поверхні плівки. Зменшення площ плям інших зразків відбувається у ряду № 3 = № 4 > № 1, що корелює з даними попередніх досліджень [168].

Також для обґрунтування вибору мукоадгезивного агенту в складі гелю вагінального було проведено вивчення текстурних властивостей зразків гелів за методикою, наведеною у розділі 2. Визначали показники зворотної екструзії та намазуваності (рис. 3.30, 3.31).

Аналіз показників зворотної екструзії зразків гелю наведено на рис.

3.32.

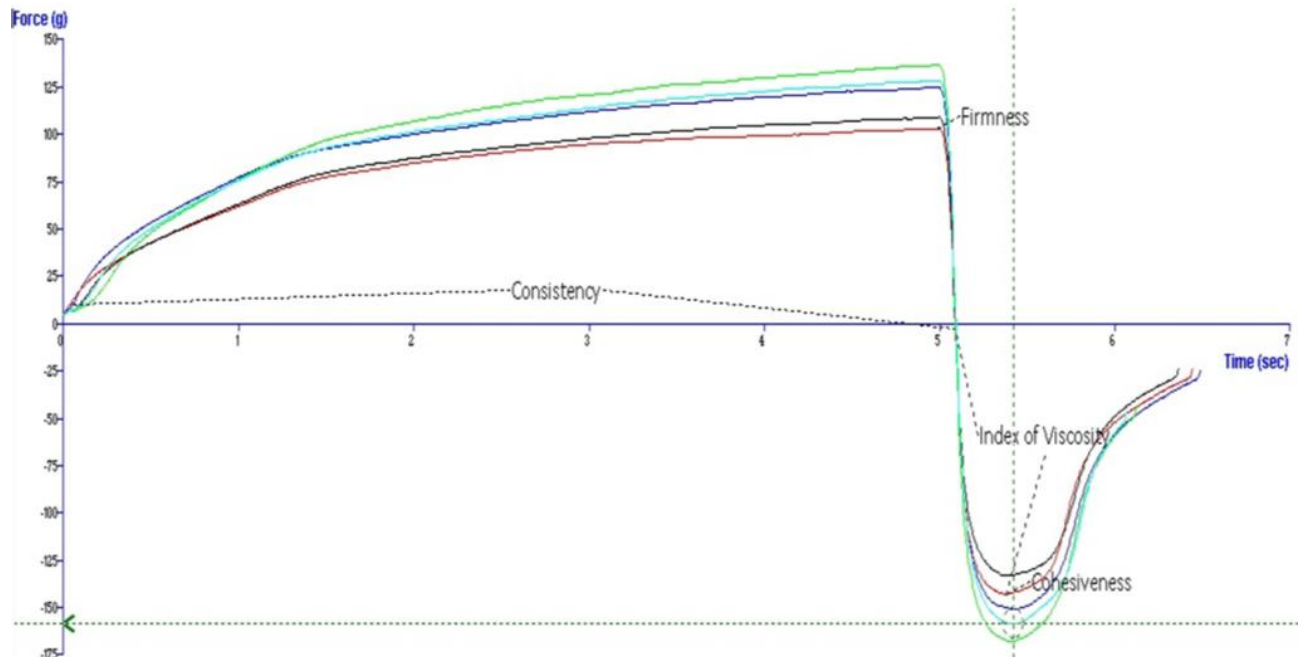


Рис. 3.30 Графік зворотної екструзії зразків: зразок № 1 ■ — без адгезиву, зразок № 2 ■ — з натрію альгінатом; зразок № 3 ■ — з OraRez; зразок № 4 ■ — з метилцелюлозою; зразок № 5 ■ — з Methocel.

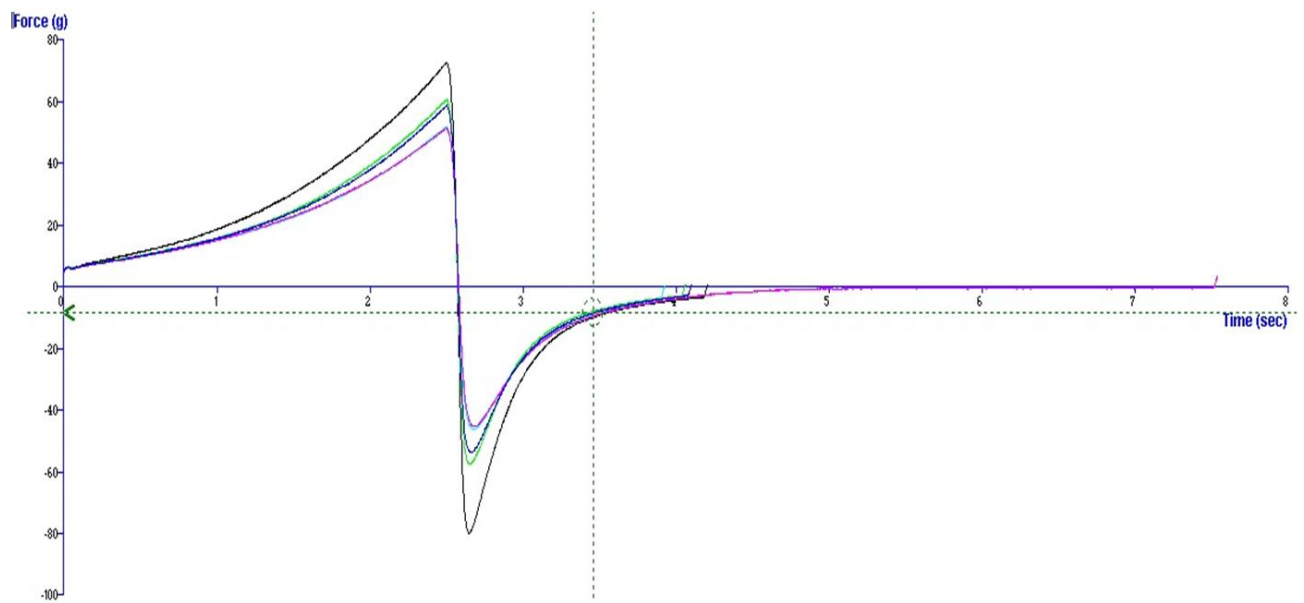


Рис. 3.31 Графік намазуваності зразків: зразок № 1 ■ — без адгезиву; зразок № 2 ■ — з натрію альгінатом; зразок № 3 ■ — з OraRez; зразок № 4 ■ — з метилцелюлозою; зразок № 5 ■ — з Methocel.

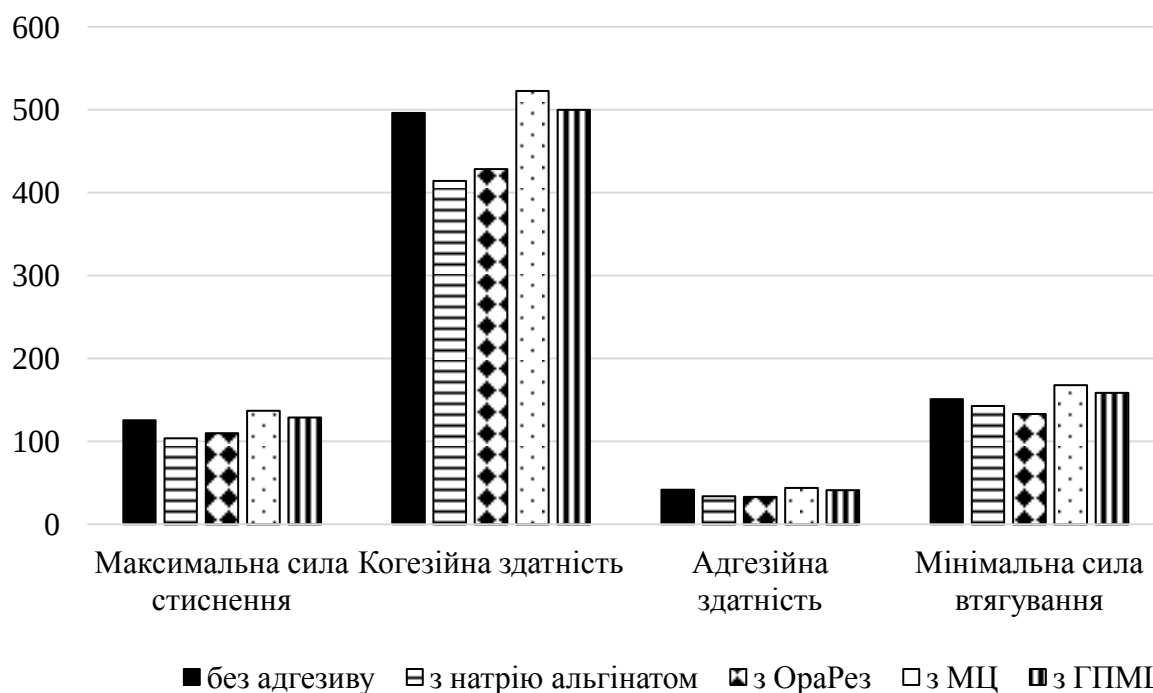


Рис. 3.32 Аналіз сили зворотної екструзії зразків вагінального гелю з різними адгезивами

За даними рис. 3.32, зразки вагінального гелю за значенням компресійної сили, що спричиняє деформацію гелю з подальшим утворенням зворотної екструзії, та когезійної здатності можна розмістити у такому порядку: з натрію альгінатом < з OraRez < без адгезиву < з ГПМЦ < з МЦ. Зростання сили стиснення пов'язане із підвищенням в'язкості (міцності) гелю, отже, найбільш в'язку систему має зразок гелю з додаванням МЦ, найменш в'язку – з додаванням натрію альгінату. Оскільки у процесі застосування інтравагінального гелю використовуються спеціальні аплікатори, велике значення має показник в'язкості у сукупності з когезійною здатністю. Тобто при введенні гелю у піхву він має легко та рівномірно розподілятися на її слизовій оболонці та утримуватися протягом тривалого часу для забезпечення фармакологічної дії. Гель з максимальною в'язкістю не дозволить забезпечити ці умови. За показниками адгезійної здатності та мінімальної сили втягування, значення яких корелюють між собою, зразки гелю можна розташувати у такій послідовності: з OraRez < з натрію альгінатом < з ГПМЦ < без адгезиву < з МЦ. Зразок із МЦ завдяки

найвищий в'язкості показав найкращу адгезійну здатність, а зразок з OraRez – найгіршу, але, за даними рис. 3.32, різниця у значеннях показників інших зразків знаходиться в межах статистичної похибки. Для встановлення раціонального адгезиву у складі інтравагінального гелю було додатково проведено аналіз намазуваності зразків, що також пов'язано з адгезійною здатністю (рис. 3.33).

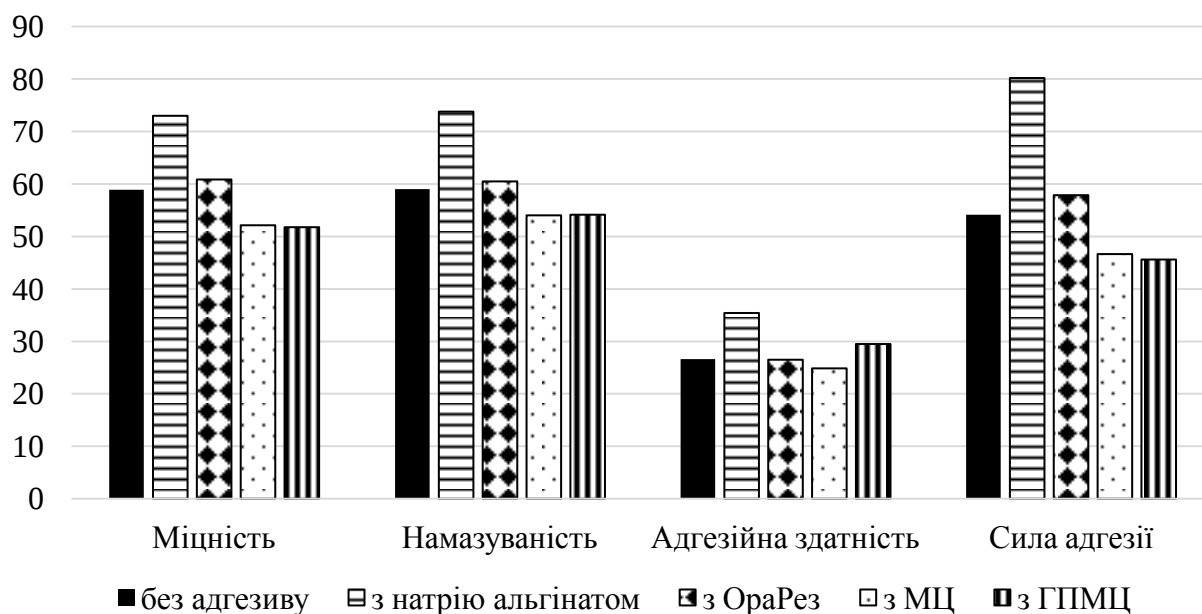


Рис. 3.33 Аналіз намазуваності зразків вагінального гелю з різними адгезивами

За результатами рис. 3.33, найбільш рідка консистенція зразка з натрію альгінатом, порівняно з іншими, забезпечує найлегшу здатність до деформації, що пояснює найвище значення міцності гелю. За значенням намазуваності найвищий показник мав також зразок гелю із натрію альгінатом. Тобто невелика когезійна здатність цього зразка, яка доведена шляхом зворотної екструзії, робить гель більш плинним, що позначиться на його розтіканні та однорідному розподілі на поверхні слизової оболонки, тобто на добрій намазуваності. За даними рис. 3.33, найкращою адгезійною здатністю та найвищою силою адгезії також характеризується гель із додаванням натрію альгінату. Тобто цей адгезивний компонент, порівняно з іншими адгезивами, максимально підвищує контакт гелю зі слизовою

оболонкою піхви, що забезпечить більш тривалий час утримання препарату на місці аплікації.

Отже, за результатами текстурного аналізу як раціональний адгезив у складі інтравагінального гелю, що розробляється, був обраний натрію альгінат.

Для вибору концентрації альгінату натрію було проведено визначення адгезивної здатності гелю з різними концентраціями мукоадгезиву – 0,25, 0,5 та 1 %. Як препарат порівняння був використаний Гінодек [169]. Результати дослідження наведені на рис. 3.34.

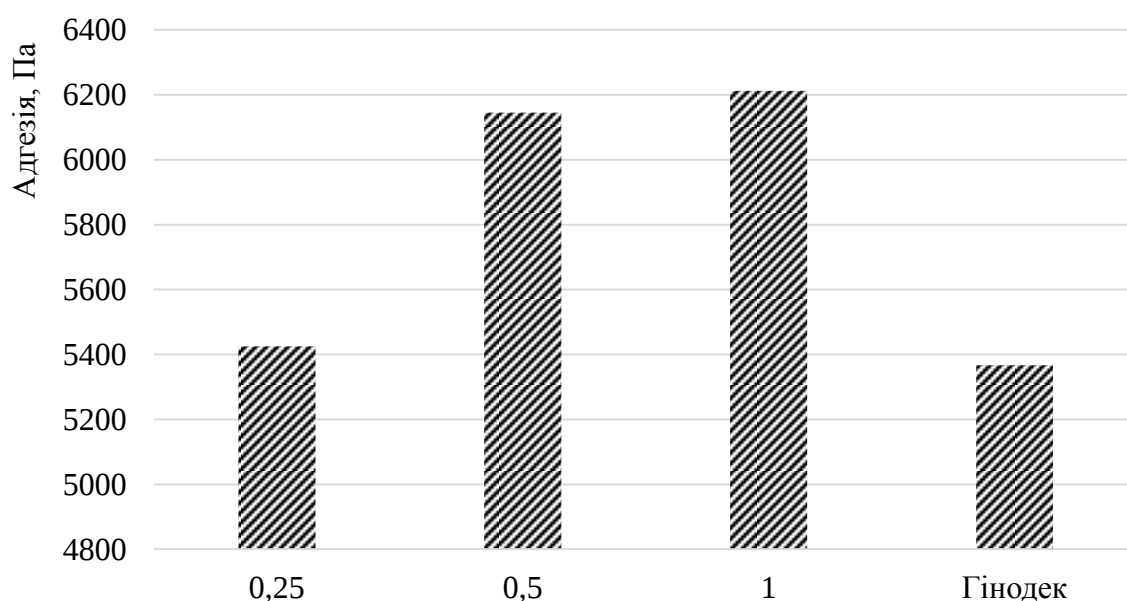


Рис. 3.34 Ступінь адгезії зразків

Результати дослідження свідчать, що адгезійна здатність зразка з концентрацією альгінату натрію 0,25 % майже ідентична здатності препарату порівняння. Збільшення його концентрації до 0,5% сприяє значному зростанню сили, необхідної для розділу двох поверхонь від 5380 до 6158 Па. Подальше збільшення концентрації до 1% не приводить до значного підвищення ступеня адгезії.

Отже, на підставі проведених досліджень до складу гелю вагінального було введено натрію альгінат у концентрації 0,5%.

3.6 Вибір консерванта у складі гелю

У процесі виробництва, зберігання та користування можлива мікробна контамінація лікарського засобу, що може негативно впливати на стабільність препарату та на профіль його безпечності. Тому нами було проведене визначення та порівняння ефективності антимікробної дії консервантів у складі вагінального гелю [167, 168].

Об'єктами дослідження були зразки гелю вагінального з різними антимікробними консервантами (табл. 3.15), які не чинять подразливої дії на слизові оболонки і є безпечними для організму людини [170-172]. Вміст консервантів у складі зразків був обраний відповідно до рекомендацій виробників.

Таблиця 3.15

Дослідні зразки для мікробіологічного дослідження

№ зразка	Вид консерванта
1	Cosgard 0,5 %
2	Leucidal 2,0 %
3	Euxyl 0,7 %
4	Без консерванта

Дослідження з вибору консерванта проводились за методикою оцінки ефективності антимікробних консервантів, наведеною в ДФУ 2.0 [173].

У роботі використовували поживні середовища виробництва HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Індія), а саме: соєво-казеїновий агар і Сабурос-декстрозний агар без додавання антибіотиків. Поживні середовища були виготовлені відповідно до вимог виробника. Кожна серія перевірялась на ростові властивості [174].

Для встановлення антимікробної активності консервантів у складі гелю до кожного зразка м'якої лікарської форми, що досліджувалася, вносили суспензію із вмістом тест-мікроорганізмів із навантаженням 10^8 КУО в 1 мл. У самому зразку мікробне навантаження мало становити від 10^5 до 10^6 КУО/мл.

Зразки лікарської форми без консервантів були також інокульовані культурами мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 і залишались для визначення мікробіологічної контамінації. На 5 добу зберігання усі зразки були контаміновані та мали характерний ріст мікроорганізмів. Отже, отриманий результат показав що ця лікарська форма потребує додавання антимікробних консервантів.

Критерієм оцінки ефективності антимікробних консервантів було визначення логарифму (lg) зменшення кількості життєздатних клітин мікроорганізмів за відповідний період зберігання після контамінації зразків. При визначенні культур *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa*, за вимогами ДФУ, цей показник має складати через 2 доби не менше 2, через 7 діб – не менше 3. У подальшому (через 28 діб) число життєздатних клітин бактерій не має збільшуватись. По відношенню до життєздатних клітин грибів за 14 діб логарифм зменшення кількості життєздатних клітин має складати не менше 2, через 28 діб зберігання інокульованих зразків гелів число життєздатних клітин грибів не має збільшуватись.

Після інокуляції мікроорганізмами зразків (навантаження $10^5 - 10^6$ КУО/мл) їх ретельно перемішували для рівномірного розподілення мікроорганізмів у зразку. Потім з кожного зразка відбирали проби: відразу після контамінації та через певні інтервали часу (2, 7, 14 і 28 діб) і проводили висівання на агаризовані поживні середовища для визначення кількості життєздатних мікроорганізмів і розрахунку логарифму зменшення кількості життєздатних бактерій *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 і грибів *Candida albicans* ATCC 885-653, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Результати досліджень наведені у табл. 3.16.

За результатами даних, наведених у табл. 3.16, можна зробити висновок, що досліджувані зразки гелю вагінального з консервантами Cosgard 0,5%, Leucidal 2,0% і Euxil PE 9010 0,7% повністю відповідають вимогам ДФУ (критерій класу «А») по відношенню як до клітин

мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 і *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, так і грибів *Candida albicans* ATCC 885-653 і *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

Таблиця 3.16

**Ефективність антимікробної дії консервантів у досліджуваних зразках
гелю**

Тест-культури мікроорга- нізмів	Консервант (концент- рація)	Мікробне навантаження після інокуляції, lg КУО/мл	Lg зменшення вихідного мікробного навантаження (вимоги ДФУ/зразок)			
			2 доби	7 діб	14 діб	28 діб
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Cosgard 0,5%	5,66±0,02	2/4,39 ±0,01	3/НВ	НВ	НЗ/НВ
	Leucidal 2,0%	5,54±0,01	2/3,32 ±0,01	3/НВ	НВ	НЗ/НВ
	Eyxil PE 9010 0,7%	5,74±0,01	2/3,49 ±0,01	3/НВ	НВ	НЗ/НВ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Cosgard 0,5%	5,74±0,01	2/2,85 ±0,03	3/НВ	НВ	НЗ/НВ
	Leucidal 2,0%	5,66±0,02	2/2,43 ±0,03	3/3,57 ±0,02	НВ	НЗ/НВ
	Eyxil PE 9010 0,7%	5,74±0,01	2/2,74 ±0,02	3/4,05 ±0,03	НВ	НЗ/НВ
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	Cosgard 0,5%	5,66±0,02	2,27 ±0,02	3,57 ±0,02	2/НВ	НЗ/НВ
	Leucidal 2,0%	5,54±0,01	1,27 ±0,02	3,12 ±0,01	2/3,97 ±0,02	НЗ/НВ
	Eyxil PE 9010 0,7%	5,74±0,01	1,49 ±0,01	3,97 ±0,01	2/4,05 ±0,03	НЗ/НВ
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Cosgard 0,5%	5,36±0,02	1,49 ±0,01	3,12 ±0,02	2/НВ	НЗ/НВ
	Leucidal 2,0%	5,39±0,01	1,35 ±0,02	2,49 ±0,02	2/3,12 ±0,01	НЗ/НВ
	Eyxil PE 9010 0,7%	5,66±0,01	1,27 ±0,01	3,12 ±0,01	2/3,97 ±0,02	НЗ/НВ

Примітка: НВ – мікроорганізми не виявляються; НЗ – не спостерігається збільшення числа мікроорганізмів.

Дані табл. 3.16 свідчать про те, що після 2 діб зберігання інокульованих зразків гелів із консервантами Cosgard 0,5 %, Leucidal 2,0 % і Euxil PE 9010 0,7 % логарифм зменшення числа життєздатних мікроорганізмів для культури *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 склав $4,39 \pm 0,01$ (консервант Cosgard 0,5 %), $3,32 \pm 0,01$ (консервант Leucidal 2,0 %) і $3,49 \pm 0,01$ (консервант Euxil PE 9010 0,7 %); для культури *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 логарифм зменшення числа життєздатних мікроорганізмів для зразків гелю з консервантом Cosgard 0,5 % склав $2,85 \pm 0,03$; для зразків гелю з Leucidal 2,0 % – $2,43 \pm 0,03$ і для зразків з Euxil PE 9010 0,7 % – $2,74 \pm 0,02$. Усі отримані значення логарифму були не менше 2,0, що відповідає вимогам ДФУ.

На 7 добу життєздатні клітини мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 у зразках гелів із консервантами Cosgard 0,5 %, Leucidal 2,0 % і Euxil PE 9010 0,7 % не виділялися (за вимогами ДФУ логарифм зменшення має бути не менше 3,0). Тоді як логарифм зменшення числа життєздатних клітин *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 у зразках з консервантом Leucidal 2,0% дорівнював $3,57 \pm 0,02$, у зразках з Euxil PE 9010 0,7 % – $4,05 \pm 0,03$; життєздатні клітини бактерій *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 у зразках гелів з консервантами Cosgard 0,5% не виділялися. Усі отримані значення логарифму були не менше 3,0, що відповідає вимогам ДФУ.

На 14 та 28 добу інкубації в зразках гелів з консервантами Corgard 0,5%, Leucidal 2,0%, Euxil PE 9010 0,7% життєздатні мікроорганізми бактерій *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 і *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 не були виявлені.

Для клітин грибів *Candida albicans* ATCC 885-653 на 14 добу Lg зменшення числа життєздатних клітин у зразках гелів з консервантами Leucidal 2,0 % і Euxil PE 9010 0,7 % склав $3,97 \pm 0,02$ і $4,05 \pm 0,03$ відповідно. Поряд з цим у зразках гелю з Cosgard 0,5% життєздатні клітини грибів *Candida albicans* ATCC 885-653 не виявлялися. Для культури *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 на 14 добу Lg зменшення числа життєздатних клітин

у зразках з консервантами Leucidal 2,0 % і Euxil PE 9010 0,7 % показник L_g склав $3,12 \pm 0,01$ і $3,97 \pm 0,02$ відповідно, а у зразках гелю з консервантом Cosgard 0,5 % життєздатні клітини не були виявлені. Усі отримані значення логарифму були не менше 2,0, що відповідає вимогам ДФУ. На 28 добу зберігання інокульованих зразків гелів з усіма консервантами життєздатні клітини грибів *Candida albicans* ATCC 885-653 і *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 не виділялися в жодному із зразків з консервантами Cosgard 0,5%, Leucidal 2,0 % і Euxil PE 9010 0,7 %.

При виконанні експерименту було встановлено, що всі досліджувані консерванти відповідають вимогам ДФУ та можуть використовуватись у виробництві м'яких лікарських форм, отже, й у складі гелю вагінального з ресвератролом та кислотою гіалуроновою. Але найкращими антимікробними показниками володіє зразок гелю з консервантом Cosgard у концентрації 0,5%.

Отже, проведені дослідження дозволили обрати склад гелю вагінального під умовною назвою «Вагітрол» [175]:

Речовина	Вміст, г
Екстракт ресвератролу	0,5
Кислота гіалуронова	0,5
Аристофлекс AVC	1,5
Пропіленгліколь	15,0
Натрію альгінат	0,5
Косгард	0,5
Вода очищена	до 100,0

Висновки до розділу 3

1. Вивчено структуру і тенденції розвитку українського ринку лікарських засобів для профілактики та лікування гіпоестрогенових станів у жінок з метою визначення маркетингових можливостей для вітчизняних розробників. Ринок негормональних препаратів останнім часом поповнюється препаратами місцевої дії, у складі яких найбільше поширені складові рослинного походження, а також гіалуронова, молочна, аскорбінова кислоти, вітаміни. Цей сегмент ринку представлений незначним асортиментом вітчизняних засобів і є перспективним.

2. Досліджено фізико-хімічні властивості екстракту ресвератролу та кислоти гіалуронової. Встановлено, що оптимальним розчинником екстракту ресвератролу у складі гелю є пропіленгліколь, кислоти гіалуронової – вода очищена.

3. Вивчено реологічні параметри зразків гелю вагінального з різними гелеутворювачами: Aristoflex AVC, Sepimax Zen, Sepinov EMT 10, гідроксіетилцелюлоза, Карбопол Ultrez 21 та Methocel. Установлено, що зразок на основі Aristoflex AVC має найбільший показник в'язкості руйнованої структури та період релаксації, на відміну від інших зразків, що дозволило обрати його як гелеутворювач у складі гелю вагінального. Установлена оптимальна концентрація аристофлексу – 1,5 %. Такий вміст гелеутворювача забезпечує стабільну коагуляційну структуру з псевдопластичним типом плинності, що обумовлює добрі споживчі та біофармацевтичні властивості препарату.

4. Досліджено вплив альгілату натрію, метилцелюлози, Methocel та OraRez® W-100L16 на мукоадгезивні властивості гелю. Шляхом аналізу текстурних властивостей (сил зворотної екструзії, намазуваності), визначення ступеня адгезії, показників фіксації на поверхні, швидкості розподілу плями встановлено, що максимальні біоадгезивні характеристики має натрію альгілат у кількості 1,5 %.

5. Проведено біофармацевтичні дослідження методом рівноважного діалізу крізь напівпроникну мембрану з метою визначення концентрації пропіленгліколю у складі гелю вагінального. Установлено, що оптимальна концентрація ПГ, яка сприяє максимальному вивільненню активної речовини – екстракту ресвератролу становить 15% від загальної маси зразка. Доведено, що такий вміст пропіленгліколю сприяє захисту отриманого препарату від висихання при зберіганні та застосуванні.

6. Проведено дослідження з вибору антимікробного консерванта у складі гелю. За результатами встановлено, що ефективність антимікробної дії консерванта Cosgard у концентрації 0,5 % є вищою порівняно зі зразками гелів із консервантами Leucidal 2,0 % і Euxil PE 9010 0,7 %, що сприятиме стабільності розробленого гелю у процесі його зберігання.

7. На підставі проведених досліджень розроблено склад гелю вагінального з екстрактом ресвератролу та кислотою гіалуроною під умовною назвою «Вагітрол».

Результати досліджень за розділом наведено у таких публікаціях:

1. Іванюк О. І., Ярних Т. Г., Євтушенко О. М. Огляд ринку препаратів для профілактики та лікування урогенітальних симптомів у пре- та постменопаузальному періоді. *Соціальна фармація в охороні здоров'я*. 2019. Т.5, № 4. С. 66-78.

2. Yarnykh T. G., Ivaniuk O. I., Kovalevska I. V., Kukhtenko H. P., Kutsenko S. A. Rheology-based substantiation of a gel-former choice for vaginal gel. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018. Vol. 10, № 11. P. 2825-2828.

3. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G., Kovalevska I. V. Determination of the bioadhesion indicators of vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid. *EUREKA: Health Sciences*. 2019. Vol. 2. P. 33-39.

4. Yarnykh T. G., Ivaniuk O. I. Study of the hyaluronic acid solubility for development of the vaginal gel composition. *Укр. біофармац. журн.* 2017. № 6 (53). P. 19-23.

5. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G., Hrudko V. O., Kovalevska I. V. Determination of vaginal gel composition on the basis of biopharmaceutical and rheological researches. *Annals of Mechnikov Institute*. 2018. № 4. P. 43-47.

6. Ivaniuk O. I., Strilets O. P., Yarnykh T. G. Choice of the preservative in the composition of vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid for treatment of urogenital symptoms in the climax period. *Annals of Mechnikov Institute*. 2019. № 3. P. 70-74.

7. Рубан О. І., Ярних Т. Г. Вивчення розчинності кислоти гіалуронової з метою визначення шляху її введення до складу гелю вагінального. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології*: зб. наук. пр. Харків : НФаУ, 2017. Вип. 2. : Сучасні аспекти створення екстемпоральних алопатичних, гомеопатичних і косметичних лікарських засобів : матеріали І Міжнар. наук.-практ. конф., 3–4 берез. Харків, 2017 р. С. 172-174.

8. Ruban O. I., Yarnykh T. G. Study of the rheological properties of the vaginal gel with hyaluronic acid. *Topical issues of new drugs development : Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student*, April 20, 2017. Kharkiv : Publishing Office NUPh, 2017. Vol. 1. P. 282.

9. Іванюк О. І., Ярних Т. Г. Вивчення розчинності ресвератролу для вибору технології введення до складу гелю вагінального. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії* : матеріали ІІІ Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 14-15 листоп. 2017 р. Харків : НФаУ, 2017. С 94.

10. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G. The research of extrication resveratrol by an equilibrium dialysis in the composition of the vaginal gel. *Topical issues of new drugs development : abstracts of XXV international scientific and practical*

conference of young scientists and student, April 18-20, 2018. Kharkiv : NUPh, 2018. P. 139-140.

11. Іванюк О. І., Ярних Т. Г. Обґрунтування вмісту пропіленгліколю у складі гелю вагінального. *Proceedings of the 3rd Internstional scientific congress of scientists of Europe*. Premier Publishing s.r.o. Vienna, 2019. P. 1067-1069.

12. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G. The choice of mucoadhesive in the composition of vaginal gel. *Topical issues of new medicines development : Abstracts of XXVI International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student*, Kharkiv, April 10-12, 2019. Kharkiv : NUPh, 2019. P. 113.

13. Іванюк О. І., Ярних Т. Г., Стрілець О. П. Вивчення антимікробної активності консервантів у складі гелю вагінального. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії* : матеріали IV Міжнар. наук.–практ. інтернет-конф., м. Харків, 14-15 листоп. 2019 р. Харків: НФаУ. 2019. С. 97-98.

РОЗДІЛ 4

ТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПРОЦЕС ОТРИМАННЯ ГЕЛЮ ВАГІНАЛЬНОГО. РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ.

4.1 Технологічний процес виготовлення гелю під умовною назвою «Вагітрол»

Технологія гелю «Вагітрол» складається з таких стадій: приготування водного розчину гіалуронової кислоти, приготування розчину екстракту ресвератролу, приготування гелевої основи, виготовлення та гомогенізація гелю, фасування в полімерні контейнери, пакування у пачки та групову тару (рис. 4.1).

Технологічний процес виробництва вагінального гелю виконується за стандартною схемою: стадія допоміжних робіт; стадія основного технологічного процесу; стадія пакування, маркування і відвантаження на склад готової продукції.

При розробці технології гелю були використанні результати попередньо проведених експериментальних досліджень його складових.

Стадія 1. Відважування компонентів.

Для приготування гелю проводять підготовку сировини, що необхідна у процесі виробництва. Спочатку проводять вхідний контроль сировини та доставляють її на транспортних візках до місця відважування. Відважують кислоту гіалуронову, екстракт ресвератролу, натрію альгінат, Aristoflex AVC, пропіленгліколь та консервант Cosgard на вагах у збірники і передають на наступні стадії. Воду очищену відміряють мірником.

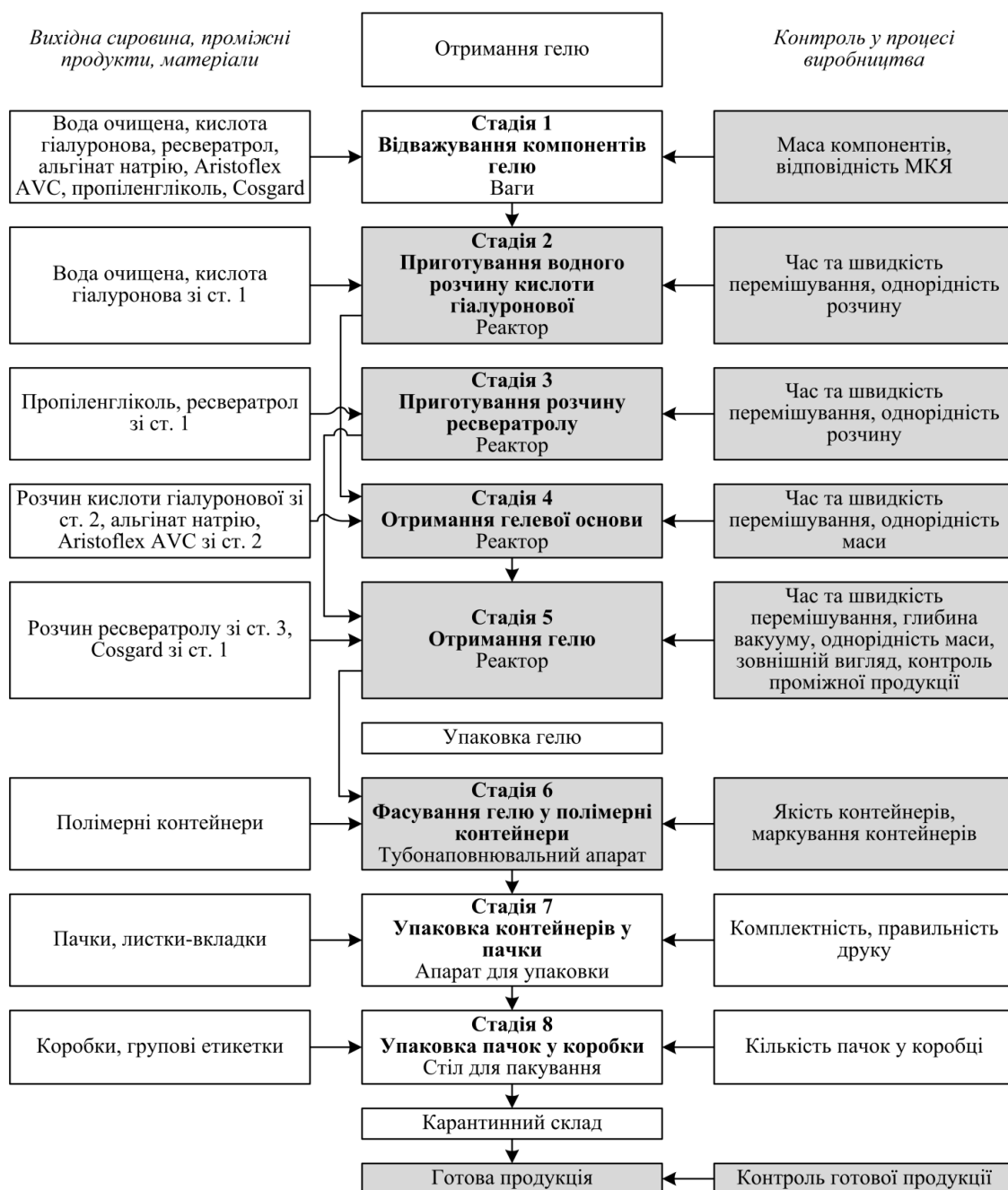


Рис. 4.1 Технологічна схема виробництва гелю «Вагітрол»

Стадія 2. Приготування водного розчину кислоти гіалуронової.

Відміряну кількість води очищеної завантажують у реактор та додають попередньо відважену кислоту гіалуронову. Залишають на 2 години для набухання, після чого перемішують лопатевою мішалкою зі швидкістю 70 об/хв до повного розчинення гіалуронової кислоти. До реактору додають розчин консерванту у воді.

Стадія 3. Приготування розчину ресвератролу.

В окремому змішувачі необхідну кількість екстракту ресвератролу додають до пропіленгліколю та перемішують за допомогою лопатевої мішалки зі швидкістю 100 об/хв до повного розчинення екстракту.

Стадія 4: Отримання гелевої основи.

У реактор до розчину кислоти гіалуронової зі стадії 2 додають необхідну кількість альгінату натрію, залишають для набухання на 1 годину, після перемішують до однорідності розчину. Далі додають Aristoflex AVC, залишають для набухання на 1 годину. Після перемішують за допомогою лопатевої мішалки зі швидкістю 80 об/хв і вакууму до отримання однорідного гелю.

Стадія 5. Отримання гелю.

У реактор-гомогенізатор з попередньо отриманою гелевою основою зі стадії 3 додають розчин ресвератролу в пропіленгліколі зі стадії 4 та консервант Cosgard. Перемішують за допомогою лопатевої мішалки зі швидкістю 80 об/хв і вакууму упродовж 30 хвилин. Після гомогенізації гелю проводять проміжний контроль продукту, для цього відбирають контрольні проби з різних ділянок реактора. Результати контролю мають відповідати вимогам МКЯ.

Стадія 6. Фасування гелю у полімерні контейнери.

Отриманий гель перекачують у бункер тубонаповнювального автомата та фасують у полімерні контейнери по 5,0 г. Проводять контроль точності дозування та правильності маркування контейнерів (номер серії і термін придатності).

Стадія 7. Упакування контейнерів у пачки.

Контейнери з інструкцією до застосування пакують у пачки по 10 од. на автоматі пакування. Контролюють комплектність упаковки (контейнери з гелем, інструкція до застосування) температура попереднього нагрівання, температуру зварювання, якість зварювання між чарунками, правильність просічки куточка і перфорації між чарунками, довжину стрічки.

Стадія 8. Упакування пачок у коробки.

На пакувальному столі проводять пакування пачок у коробки. Серію готової продукції формують із розрахунку одного завантаження реактора.

Серію готової продукції, на яку виданий аналітичний паспорт, відправляють на склад готової продукції. Проводять контроль готової продукції.

Для масштабування розробленої лабораторної технології гелю вагінального у промислове виробництво визначено критичні параметри й умови технологічного процесу, що дозволить отримати готову продукцію відповідної якості згідно з вимогами НД.

Критичні параметри виробничого процесу наведено у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

**Критичні параметри виробничого процесу виготовлення гелю
«Вагітрол»**

Стадія	Контрольований параметр	Значення
1	2	3
Відважування компонентів гелю	Маса АФІ та допоміжних речовин	Згідно з виробничою рецептурою
Приготування водного розчину кислоти гіалуронової	Час набухання, хв	120
	Швидкість перемішування, об/хв	70
	Повнота розчинення АФІ	Однорідний прозорий розчин
Приготування розчину екстракту ресвератролу	Швидкість перемішування, об/хв	100
	Час процесу, хв	20
	Повнота розчинення	Однорідний розчин
Отримання гелевої основи	Час набухання натрію альгілату, хв	60
	Час набухання Aristoflex AVC, хв	60
	Швидкість перемішування, об/хв	80
	Однорідність гелевої основи	Однорідна маса
Отримання гелю	Швидкість перемішування, об/хв	80
	Час гомогенізації, хв	30
	Проміжний контроль	Згідно з виробничою рецептурою
Фасування гелю у контейнери	Маса вмісту контейнера, г	5
	Правильність маркування	Візуально

Упакування контейнерів у пачки Упакування пачок у коробки	Температура попереднього нагрівання, °С	70-90
	Температура зварювання, °С	110-140
	Якість зварювання між чарунками, правильність просічки куточка і перфорації між чарунками, довжина стрічки	Візуально

4.2 Розробка методик ідентифікації та кількісного визначення діючих речовин

Ідентифікація та кількісне визначення екстракту ресвератролу

Випробування проводили методом рідинної хроматографії відповідно до вимог ДФУ, 2.2.29.

Хроматографували розчин порівняння та отримували 5 хроматограм. Об'єм інжекції – 5 мкл. Для площі піка екстракту ресвератролу з отриманих хроматограм розчину порівняння розраховували відносне стандартне відхилення (RSD).

Поперемінно хроматографували розчинник, випробовуваний розчин, розчин порівняння, отримуючи число паралельних хроматограм для кожного з розчинів не менше, ніж при перевірці придатності хроматографічної системи в таких умовах:

- колонка заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р (наприклад, InfinityLab Poroshell 120 Bonus-RP, 2.1 x 50 mm, 2.7 μ m, Narrow Bore LC column (699768-901)) або аналогічна, для якої виконуються вимоги розділу «Придатність хроматографічної системи»;
- швидкість рухомої фази – 1 мл/хв;
- температура термостата колонки – 30 °С;
- рухома фаза А: 0,005М розчин форміату амонію у воді Р, дегазований будь-яким зручним способом;

- рухома фаза В: 0,005М розчин формиату амонію у суміші ацетонітрил
- Р – вода Р (90 : 10), дегазований будьяким зручним способом;
- режим елюювання: градієнтний від 5 до 100% рухомої фази В за 30 хв;
- об'єм інжекції – 5 мкл;
- детектор – мас-спектрометр (Agilent 6420 Triple Quad);
- настройки детектора:
- тип іонізації: позитивна, електроспрей (+ESI);
- режим вимірювання: накопичення іонів з масою 229 а.е.;
- напруга на фрагментаторі – 50 В;
- температура азоту – 350 °С;
- витрата азоту – 10 мл/хв;
- тиск на небулайзері – 35 PSI;
- тиск на капілярі – 4 кВ.

За розробленою методикою був досліджений кількісний вміст ресвератролу у складі гелю [176]. На рис. 4.2 та 4.3 наведені хроматограми розчину стандартного зразка і випробовуваного розчину, отриманих для молекулярного іона з масою 229. Дані, отримані при хроматографуванні, наведені у табл. 4.2.

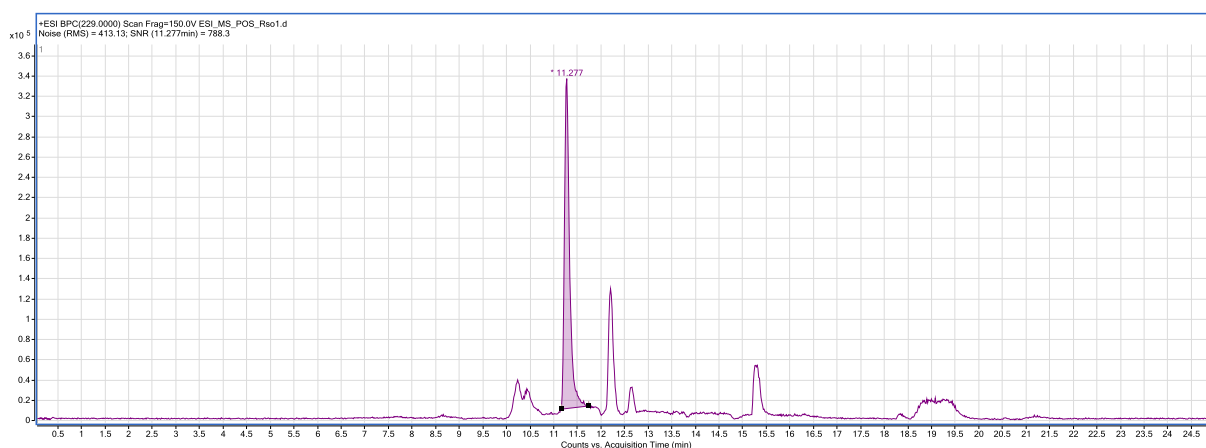


Рис. 4.2 Хроматограма випробовуваного розчину для іона з молекулярною масою 229

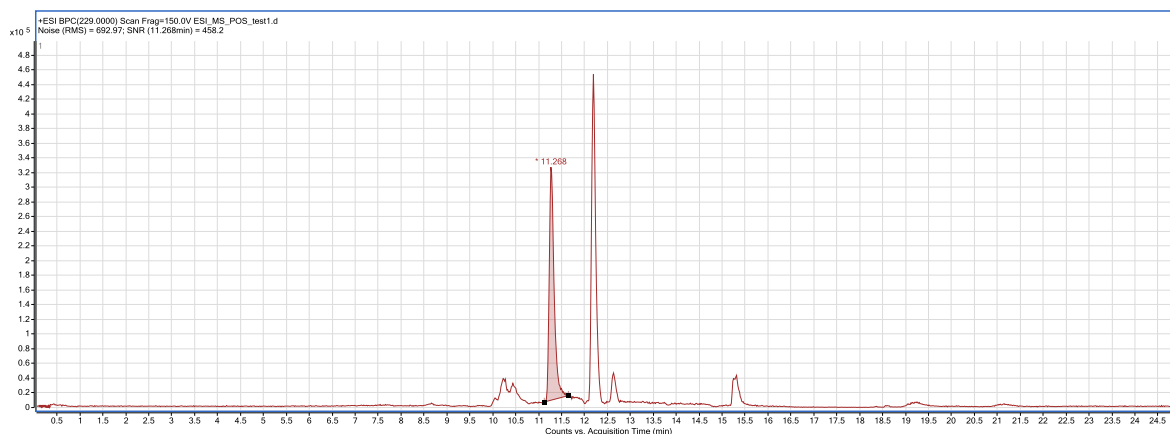


Рис. 4.3 Хроматограма розчину порівняння для іона з молекулярною масою 229

Таблиця 4.2

Дані, отримані при хроматографуванні випробовуваного розчину та розчину порівняння для іона з молекулярною масою 229

	Маса наважки, г	Середнє значення площі піку ресвератролу	P, %	X, %
СЗ ресвератрол	0,0701	2360892,2	99	—
Препарат	1,0021	2305623,6	—	0,34

Вміст ресвератролу (X) в препараті у відсотках обчислювали за формулою:

$$x = \frac{2305623,6 \times 0,0701 \times 99}{2305623,6 \times 1,0021 \times 20} = 0,34 \% \quad (4.1)$$

У результаті проведених досліджень було виявлено, що кількісний вміст ресвератролу в досліджуваному препараті був на рівні 0,34%. Враховуючи, що вміст ресвератролу в екстракті ресвератролу складає 66%, це відповідає вимогам на препарат.

Перед валідацією методики проводили перевірку придатності хроматографічної системи, результати наведені в табл. 4.3.

Виконання вимог тесту для перевірки придатності хроматографічної системи

Параметр	Вимоги	Знайдено
Ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком ресвератролу з хроматограми розчину порівняння	Не менше 1000	3827
Коефіцієнт симетрії піка ресвератролу, розрахований за піком ресвератролу з хроматограми розчину порівняння	Не більше 2,0	1,81
Відносне стандартне відхилення для площ піків ресвератролу, розраховане з хроматограм розчину порівняння за результатом 5 інжекцій	Не більше 1,0 %	0,2%

Випробування з валідації проводили для методики кількісного визначення ресвератролу в препараті, яка може застосовуватись для контролю якості лікарського засобу. Для розробленої методики розраховували величину повної невизначеності результатів аналізу, що складається з невизначеності пробопідготовки та невизначеності кінцевої аналітичної операції, і порівнювали з максимально допустимою. Максимально допустима повна відносна невизначеність методики аналізу ГЛЗ $\Delta_{AS}\%$ пов'язана з допуском вмісту аналізованої речовини згідно зі специфікацією (В).

У разі гелю з екстрактом ресвератролу кількісний вміст ресвератролу має бути в межах $\pm 5\%$ (згідно з вимогами проєкту МКЯ ЛЗ на лікарський препарат), тому: $\max \Delta_{AS} \leq 1,6 \%$.

Прогноз невизначеності пробопідготовки розраховували на основі загальних вимог ДФУ до лабораторного обладнання (табл. 4.4).

Розрахунок невизначеності пробопідготовки для аналізу ресвератролу

 (Δ_{sp})

Операція пробопідготовки	Значення	Невизначеність, (Δ) , %
<i>Випробовуваний розчин</i>		
Наважка (м)	1000 мг	0,020
Доведення до об'єму	100 мл	0,12
<i>Розчин порівняння</i>		
Наважка (м)	70 мг	0,286
Доведення до об'єму	200 мл	0,1
Аліквота	2 мл	0,61
Доведення до об'єму	20 мл	0,28
<i>Повна невизначеність пробопідготовки $\Delta_{sp}\%$</i>		0,75
<i>Невизначеність кінцевої аналітичної операції Δ_{FAO} (рідинна хроматографія)</i>		1,35
<i>Повна невизначеність методики аналізу $\Delta_{AS}\%$</i> $\Delta_{AS}\% = \sqrt{(\Delta_{sp}\%)^2 + (\Delta_{FAO}\%)^2}$		1,54

Визначення невизначеності кінцевої аналітичної операції Δ_{FAO} проводять для випробовуваного розчину і розчину порівняння. При розрахунку довірчих інтервалів використовують однобічний коефіцієнт Стюдента для ймовірності 95% і відповідне число ступенів свободи. Довірчі інтервали для розчину порівняння і випробовуваного розчину розраховують для середнього з 5 результатів (максимальне число вимірювань згідно з МКЯ):

$$\Delta_{FAO} = \frac{\sqrt{2}}{\sqrt{5}} \times t(95\%, n - 1) \times RSD. \quad (4.2)$$

Множник $\sqrt{2}$ враховує прогнозовану рівність величин $\Delta_{FAO}(BP)$ і $\Delta_{FAO}(PP)$.

Згідно з вимогами придатності хроматографічної системи методики визначення відносне стандартне відхилення п'яти паралельних визначень має бути не більше 1,0%. При $n = 5$, $t(95\%, n-1) = 2,1318$:

$$\Delta_{FAO} = \frac{\sqrt{2}}{\sqrt{5}} \times 2,1318 \times 1,00\% = 1,35. \quad (4.3)$$

Повна невизначеність методики аналізу $\Delta_{AS}\%$:

$$\Delta_{AS} = \sqrt{(\Delta_{sp})^2 + (\Delta_{FAO})^2} = 1,54.$$

Отже, розрахована повна невизначеність методики аналізу $\Delta_{AS}\%$ менше $\max \Delta_{AS}$ ($1,54\% < \max \Delta_{AS} = 1,6\%$), що відповідає вимогам до цього параметра. Тобто невизначеність пробопідготовки й аналізу в цілому мають забезпечити достатню точність вимірювання.

Методика кількісного визначення має бути лінійною в межах діапазону застосування, який має перекривати можливі значення концентрацій діючої речовини. ДФУ встановлює діапазон застосування методик кількісного визначення 80-120%.

Для підтвердження лінійності методики було приготовано 9 модельних розчинів, концентрація яких змінюється рівномірно в межах діапазону застосування (крок – 5%).

Розрахунки та критерії наведені для нормалізованих величин стандартного розчину (табл. 4.5): $X_i = C_i/C_{st} \cdot 100$ та $Y_i = S_i/S_{st} \cdot 100$

Таблиця 4.5

Розрахунок параметрів лінійності методики кількісного визначення стандартного розчину ресвератролу згідно з проєктом МКЯ ЛЗ

№	C, %	C_i	$C_{i/st}$	Середнє значення площі піка	$S_{i/st}$
1	80	0,028	80,0	1889342,5	80,01
2	85	0,030	85,0	2007182,2	85,00
3	90	0,032	90,0	2125385,2	90,00
4	95	0,033	95,0	2243342,4	95,00
5	100	0,035	100,0	2360892,2	99,98
6	105	0,037	105,0	2480139,2	105,03
7	110	0,039	110,0	2597359,6	109,99
8	115	0,040	115,0	2714871,9	114,97
9	120	0,042	120,0	2832841,4	119,96
Стандарт		0,035		2361413,1	

На рис. 4.4 наведено графік лінійної залежності аналітичного сигналу від фактичної концентрації розчину, побудований у нормалізованих координатах, виходячи з наведених у табл. 4.5 даних.

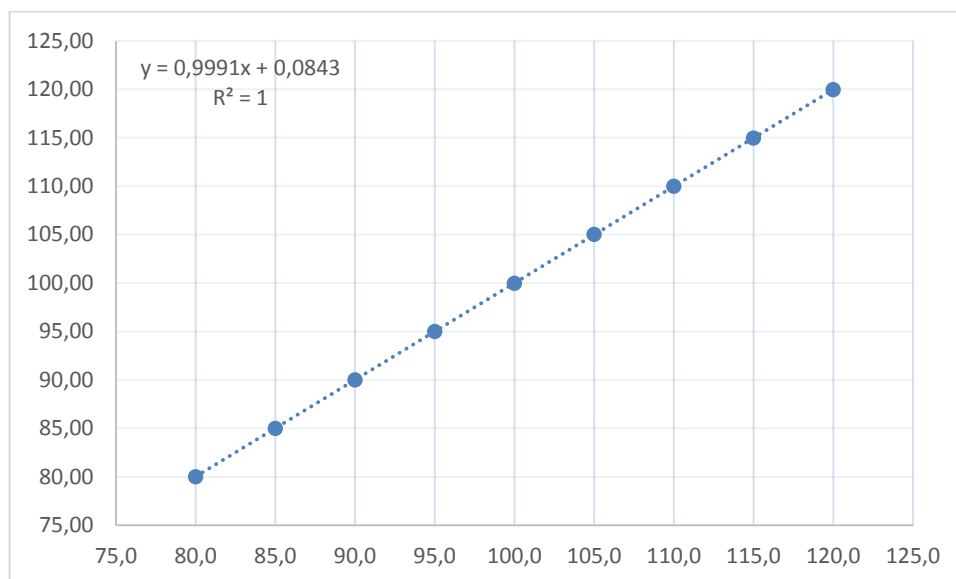


Рис. 4.4 Графік лінійної залежності $Y_i = b \cdot X_i + a$ для стандартного розчину ресвератролу

Критерії прийнятності наведені в табл. 4.6.

Таблиця 4.6

**Дані перевірки лінійності методики кількісного визначення
ресвератролу**

з/п	Параметр	Вимоги	Отримане значення	Виконання критерію
1	$ a $	$\leq 2,6$	0,084	Виконується
2	S_0	$\leq 0,84$	0,152	Виконується
3	r	$> 0,9981$	1,0000	Виконується

Отримані результати підтверджують, що методика кількісного визначення ресвератролу в досліджуваному препараті в діапазоні концентрацій від 80 до 120% є лінійною.

Для підтвердження правильності в межах діапазону використання аналітичної методики, відповідно до рекомендацій ДФУ 2.0, використовували результати хроматографування, отримані при дослідженні лінійності методики.

Результати визначення параметрів правильності і розрахунків критеріїв прийнятності наведені в табл. 4.7.

Відповідно до результатів дослідження методика кількісного визначення ресвератролу задовольняє критерії прийнятності валідаційного показника «Правильність» за обома показниками.

Прецизійність досліджувалася на випробовуваних розчинах, приготовлених для визначення критерію «Правильність». Методика характеризується достатньою збіжністю, оскільки знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини (0,04%), що менше критичного значення для збіжності результатів (1,6%) і задовольняє критерії прийнятності валідаційного показника «Прецизійність».

Таблиця 4.7

**Розрахунок параметрів правильності стандартного розчину
ресвератролу**

Уведено у % до концентрації розчину порівняння $(C_i/C_{st}) \cdot 100\%$	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння $(A_i/A_{st}) \cdot 100\%$	Знайдено у % до уведеного $(A_i/A_{st}) \cdot 100 / (C_i/C_{st})$
80	80,01	100,01
85	85,00	100,00
90	90,00	100,01
95	95,00	100,00
100	99,98	99,98
105	105,03	100,03
110	109,99	99,99
115	114,97	99,97
120	119,96	99,97
$Z_{сер}$		99,99
Відносне стандартне відхилення, $s_z\%$		0,02
Відносний довірчий інтервал $\Delta_z = t(95\%, 8) \cdot s_z = 1.8595 \cdot s_z =$		0,04
Критичне значення для збіжності результатів $\delta\% \leq$		1.6
Систематична похибка $\delta\% = Z_{сер} - 100 $		0.01
Критерій статистичної незначущості $\delta \leq \Delta_z/3 = 0,04/3 = 0,01$ ($0,01 \leq 0,01$); Якщо не виконується, то критерій практичної незначущості, $\delta \leq 0,512$ ($0,01 \leq 0,512$)		Виконується Виконується

Внутрішньолабораторну прецизійність підтверджували результатами аналізу, які отримували для однієї серії препарату в різні дні, використовуючи різний мірний посуд. Підтверджували однорідність дисперсій і рівність середніх значень двох вибірок. Під вибірками мали на увазі результати, отримані в різні дні. Результати наведені в табл. 4.8.

Таблиця 4.8

Розрахунок параметрів внутрішньолабораторної прецизійності

	1-й день	2-й день
1	34,12	34,09
2	34,09	34,09
3	34,11	34,12
4	34,10	34,10
5	34,12	34,11
Дисперсія	0,0003	0,0003
Середнє Z	34,11	34,10
Загальне середнє		34,11
RSD, %		0,04
Відносне стандартне відхилення		0,01
Довірчий інтервал, ($\Delta_{\text{intra}} = t(95\%, n-1) * \text{RSD}, \%$)		0,08

За отриманими даними, методика кількісного визначення ресвератролу відповідає вимогам критерію прийнятності тесту «Внутрішньолабораторна прецизійність», оскільки довірчий інтервал ($\Delta_{\text{intra}} = 0,08$) менше критичного значення для збіжності результатів (1,6%). Тобто всі розраховані параметри відповідають необхідним валідаційним критеріям. Методика може бути використана для кількісного визначення ресвератролу в досліджуваному препараті.

Розроблена HPLC-версія методики може використовуватися не тільки для кількісного визначення ресвератролу, але і для його ідентифікації. На рис. 4.5–4.6 наведені типові мас-спектри випробуваного розчину і розчину стандартного зразка, де присутній пік з масою 229, а також хроматограми повного іонного потоку для цих розчинів (рис. 4.7–4.8).

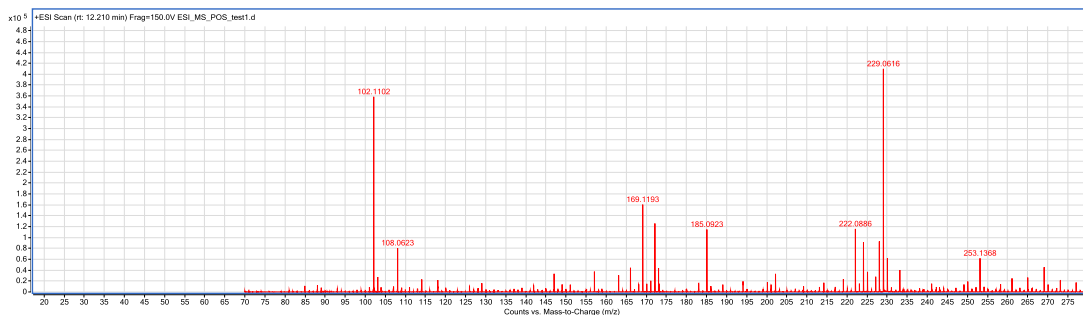


Рис. 4.5 Мас-спектри випробовуваного розчину

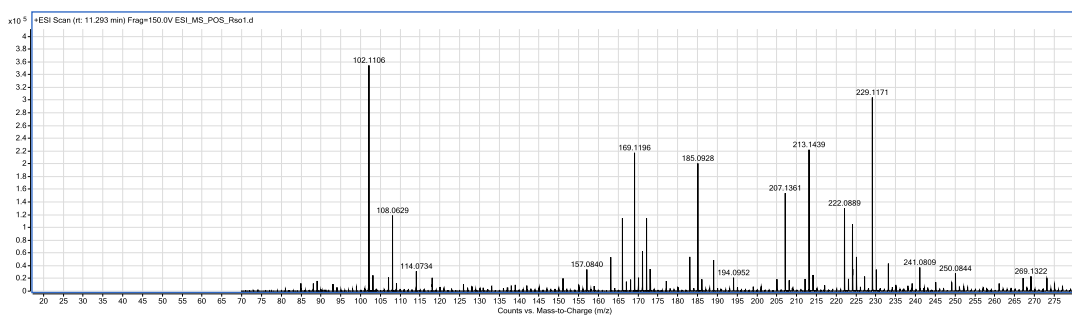


Рис. 4.6 Мас-спектри розчину порівняння

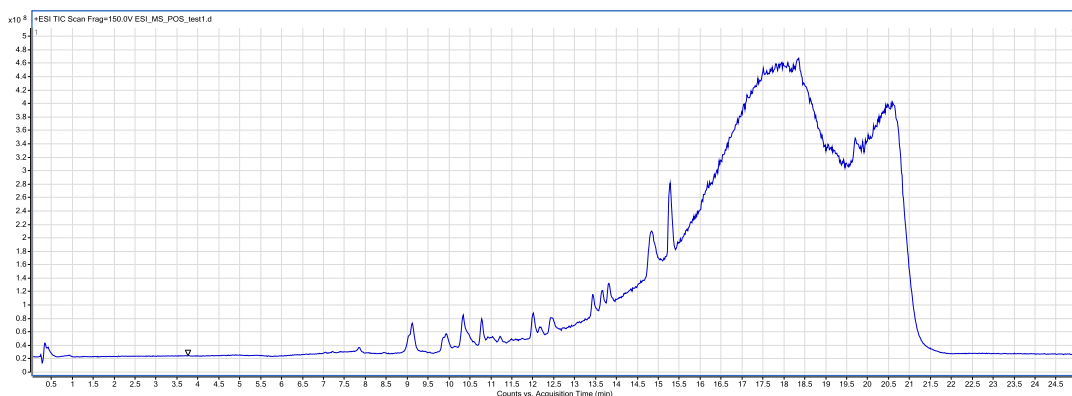


Рис. 4.7 Хроматограма повного іонного потоку випробовуваного розчину

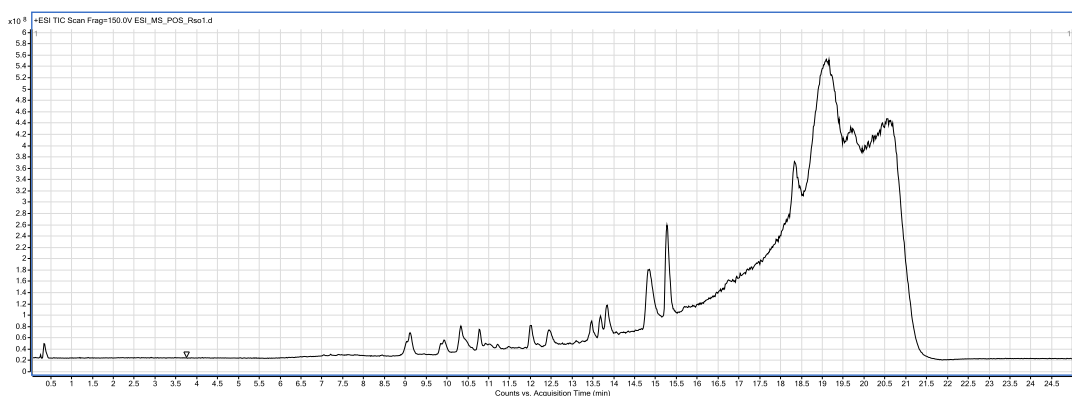


Рис. 4.8 Хроматограма повного іонного потоку розчину порівняння

Як видно з наведених результатів аналізу на хроматограмі випробовуваного розчину і розчину порівняння (рис. 4.5–4.6) наявний характерний пік, що відповідає іону з молекулярною масою 229.

Ідентифікація та кількісне визначення кислоти гіалуронової

Для ідентифікації та визначення кількісного вмісту кислоти гіалуронової в гелі використовували метод вискоефективної рідинної хроматографії.

Випробовуваний розчин та розчин порівняння готували відповідно до методики, описаної в розділі 2.

Поперемінно хроматографували розчинник, випробовуваний розчин, розчин порівняння, отримуючи число паралельних хроматограм для кожного з розчинів не менше, ніж при перевірці придатності хроматографічної системи, в таких умовах:

- колонка заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії *P*, (InfinityLab Poroshell 120 Bonus-RP, 2.1 x 50 mm, 2.7 μ m, Narrow Bore LC column (699768-901));

- швидкість рухомої фази – 1 мл/хв;

- температура термостата колонки – 30 С ;

- рухома фаза А: 0,005М розчин форміату амонію у воді *P*, дегазований будь-яким зручним способом;

- рухома фаза В: 0,005М розчин форміату амонію в суміші ацетонітрил Р – вода *P* (90:10), дегазований будь-яким зручним способом;

- режим елюювання: градієнтний від 5 до 100% рухомої фази В за 30 хв;

- об'єм інжекції – 5 мкл;

- детектор – мас-спектрометр (Agilent 6420 Triple Quad);

- настройки детектора:

- тип іонізації: позитивна, електроспрей (+ESI);

- режим вимірювання: накопичення іонів з масою 402 а.е.;

- напруга на фрагментаторі – 10 В;

- температура азоту – 350 °C;
- витрата азоту – 10 мл/хв;
- тиск на небулайзері – 35 PSI;
- тиск на капілярі – 4 кВ.

Результати аналізу гелю за кількісним вмістом гіалуронової кислоти наведені в табл. 4.9 і на рис. 4.9–4.10.

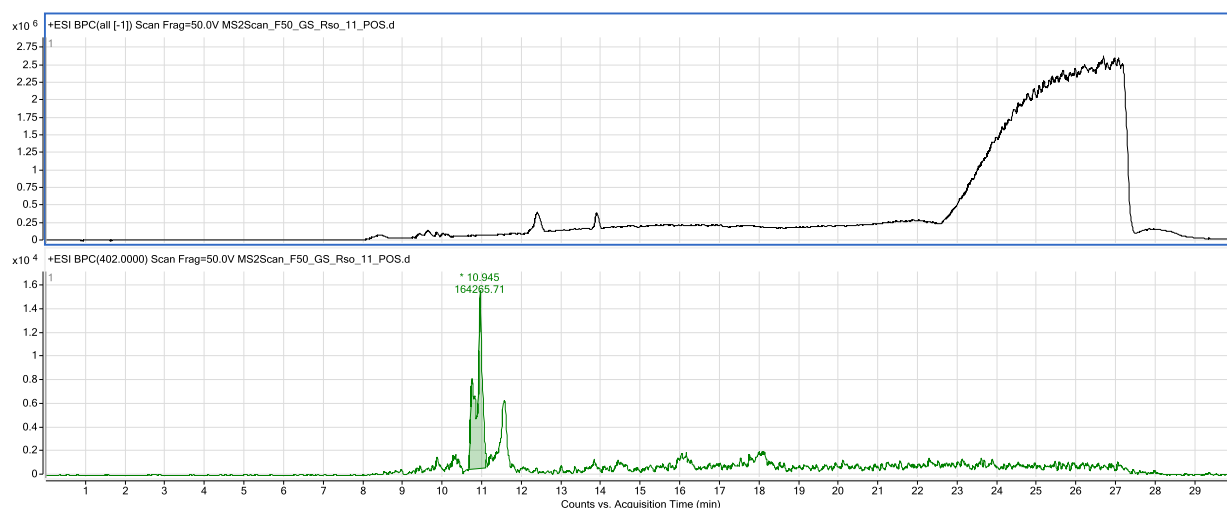


Рис. 4.9 Хроматограма розчину порівняння повного іонного потоку (зверху) і розчину порівняння для іона з молекулярною масою 402 (знизу)

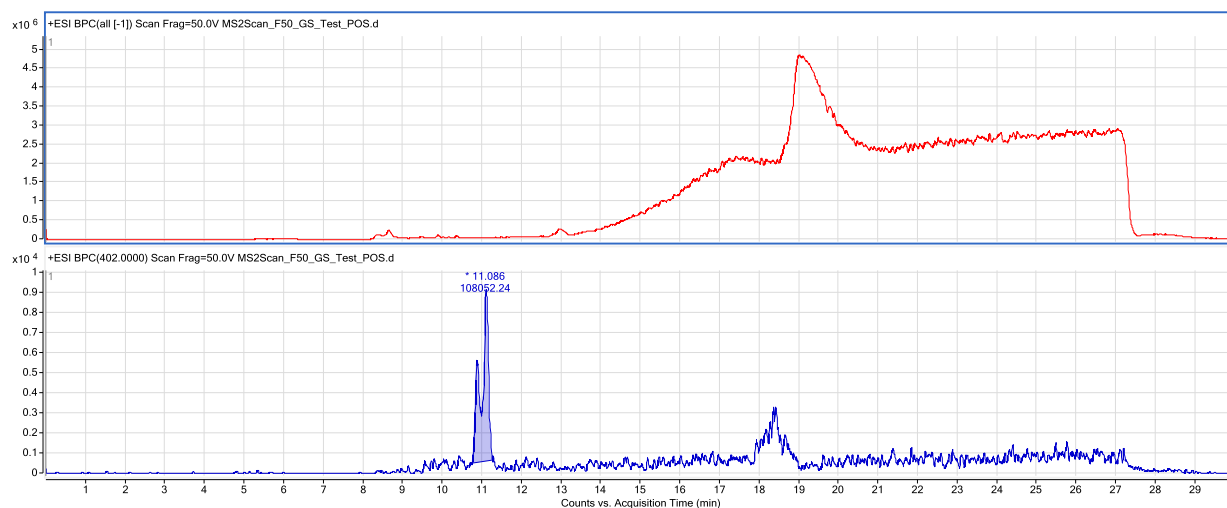


Рис. 4.10 Хроматограма випробовуваного розчину повного іонного потоку (зверху) і випробовуваного розчину для іона з молекулярною масою 402 (знизу)

Як видно з результатів дослідження, час утримування піка кислоти гіалуронової на хроматограмі розчину порівняння іона з молекулярною

масою 402 і час утримування піка кислоти гіалуронової на хроматограмі випробовуваного розчину іона з молекулярною масою 402 практично ідентичні – 11 хв, що дозволяє ідентифікувати цю речовину в досліджуваному препараті.

Таблиця 4.9

Дані отримані при хроматографуванні випробовуваного розчину та розчину порівняння для іона з молекулярною масою 402

	<i>Розчин порівняння</i>	<i>Випробовуваний розчин</i>
Значення площі піка	158293	1467977
	156921	1459385
	158153	1464756
	157611	1462662
	155932	1467580
Середнє значення площі піка	157382	1464472

Відповідно до отриманих результатів хроматографування вміст гіалуронової кислоти складає:

$$X = \frac{1464472 \times 0,0101 \times 1 \times 100 \times 100}{157382 \times 2,0031 \times 100 \times 10} = 0,47\%$$

Вміст гіалуронової кислоти відповідає вимогам, оскільки отриманий результат 0,47% знаходиться в регламентованих межах – від 0,45 до 0,55%.

Результати аналізу можуть вважатися достовірними, якщо виконуються вимоги тесту «Придатність хроматографічної системи» (табл. 4.10.).

Усі вимоги тесту для перевірки придатності хроматографічної системи виконуються, тому результати аналізу вмісту гіалуронової кислоти можна вважати достовірними.

Виконання вимог тесту для перевірки придатності хроматографічної системи

Параметр	Вимоги	Знайдено
Ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком гіалуронату з хроматограми <i>розчину порівняння</i>	Не менше 5000	6039
Коефіцієнт симетрії піка гіалуронату, розрахована за піком гіалуронату з хроматограми <i>розчину порівняння</i>	Не більше 1,5	1,17
Відносне стандартне відхилення для площ піків гіалуронату, розраховане з хроматограм <i>розчину порівняння</i> за результатом 5 інжекцій	Не більше 2,0 %	0,6%

Ідентифікація та кількісне визначення вмісту пропіленгліколю у складі гелю

Ідентифікацію та визначення кількісного вмісту пропіленгліколю в гелі проводили методом газової хроматографії з полуменево-іонізаційним детектором.

Випробовуваний розчин та розчин порівняння готували відповідно до методики, описаної в розділі 2.

Хроматографували випробовуваний розчин та розчин порівняння отримуючи для кожного 5 хроматограм за таких умов:

- колонка капілярна кварцова, розміром 50 м x 0,32 мм із нанесеним шаром нерухомої фази – поліетиленгліколь, модифікований нітротерефталевою кислотою (FFAP), товщина шару – 1 мкм (CP-Wax, Chrompack);
- температура колонки програмується від 40 С (затримка 1 хвилина) до 220 С (затримка 5 хвилин) зі швидкістю зміни температури 25 С/хв;
- температура інжектору – 230 С, режим з розщепленням потоку в співвідношенні 10:1;
- температура детектора – 290 С;
- швидкість газу-носія (гелій) – 5,0 мл/хв.

На рис.4.11–4.12 наведені типові хроматограми випробовуваного розчину та розчину порівняння, отримані під час дослідження кількісного вмісту пропіленгліколю в гелі під умовною назвою «Вагітрол».

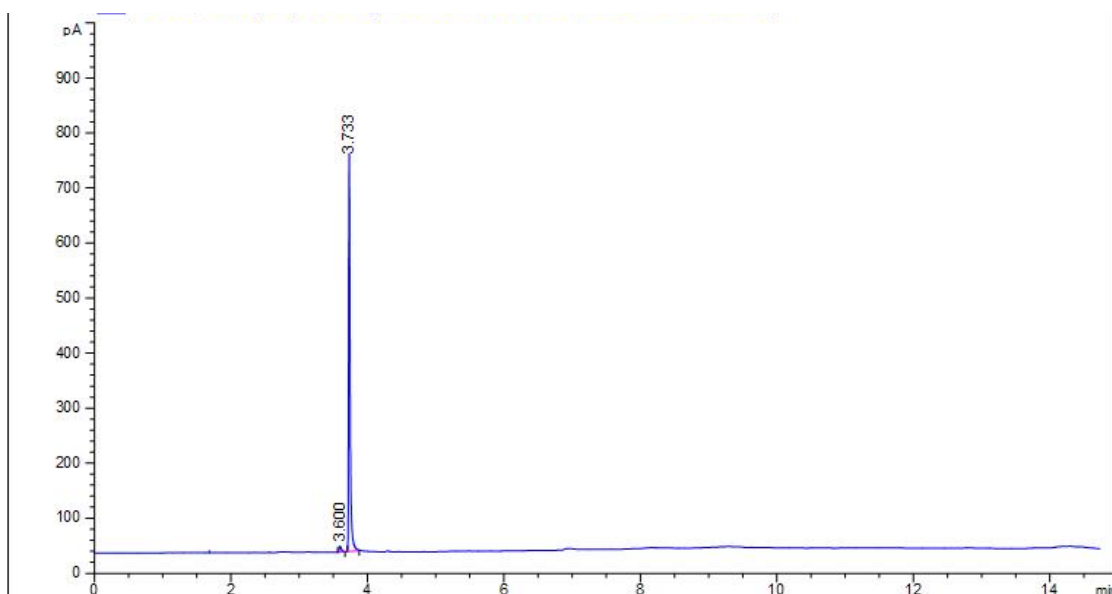


Рис. 4.11. Хроматограма розчину порівня

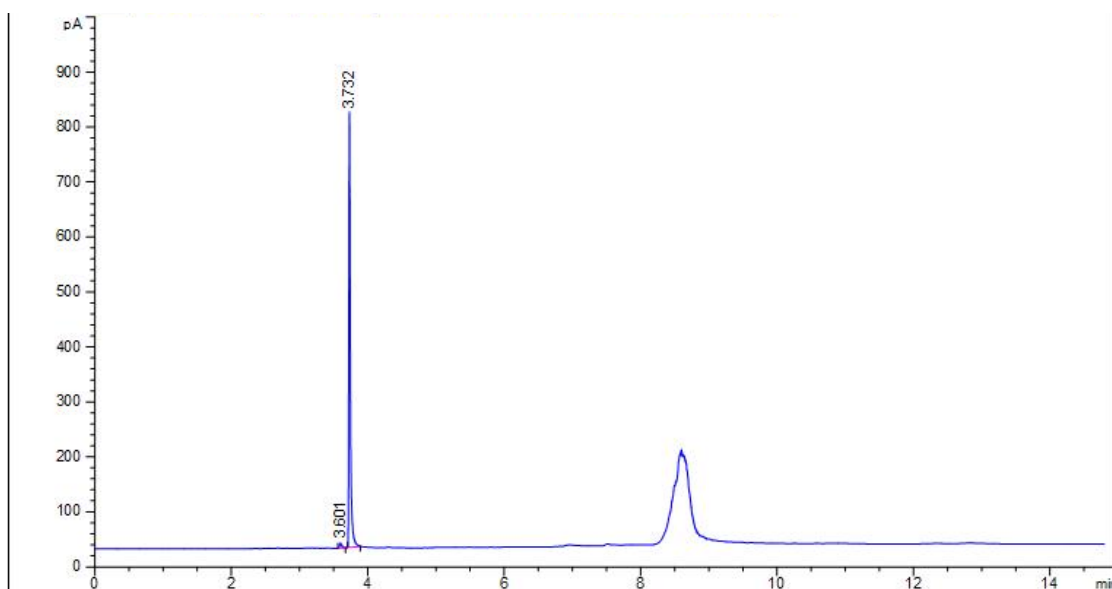


Рис. 4.12. Хроматограма випробовуваного розчину

На хроматограмі випробовуваного розчину наявний неідентифікований пік з часом утримування близько 8,5 хв. Враховуючи значний час утримування порівняно з основними речовинами, можна зауважити, пік не впливає на результати кількісного визначення пропіленгліколю і може належати іншим компонентам препарату.

Результати, отримані при хроматографуванні випробовуваного розчину та розчину порівняння, наведені в табл.4.11.

Таблиця 4.11

Дані, отримані при хроматографуванні випробовуваного розчину та розчину порівняння при аналізі кількісного вмісту пропіленгліколю

	<i>Розчин порівняння</i>	<i>Випробовуваний розчин</i>
Значення площі піка	1099,12640	1218,93850
	1104,73921	1217,01374
	1101,83927	1218,01820
	1102,11843	1217,00383
	1102,53069	1221,60998
Середнє значення площі піка	1102,07080	1218,51685

Вміст пропіленгліколю відповідає вимогам (від 14,25 до 15,75%) і був визначений на рівні:

$$X = \frac{1218,51685 \times 0,55982 \times 99,5}{1102,0708 \times 0,7945 \times 5} = 15,50\%$$

Вимоги тесту для перевірки придатності хроматографічної системи виконуються повною мірою і наведені в табл. 4.12. Тобто результати аналізу вмісту пропіленгліколю є достовірними.

Таблиця 4.12

Виконання вимог тесту для перевірки придатності хроматографічної системи

Параметр	Вимоги	Знайдено
Ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком гіалуронату з хроматограми <i>розчину порівняння</i>	Не менше 2000	134030
Коефіцієнт розділення для піка н-бутанолу і пропіленгліколю, розрахований за хроматограмами <i>випробовуваного розчину</i>	Не менше 2,0	2,6
Коефіцієнт розділення для піка н-бутанолу і пропіленгліколю, розрахований за хроматограмами <i>розчину порівняння</i>	Не менше 2,0	2,7
Відносне стандартне відхилення для площ піків гіалуронату, розраховане з хроматограм <i>розчину порівняння</i> за результатом 5 інжекцій	Не більше 2,0 %	0,2%

4.3 Вивчення стабільності гелю «Вагітрол» у процесі зберігання

Стабільність є одним з головних показників якості розробленого препарату. Вивчення стабільності препарату при зберіганні дозволяє визначити вплив факторів зовнішнього середовища, виду пакування на показники якості, що закладені у проєкт МКЯ, і термін зберігання. Для визначення стабільності необхідно визначити показники якості гелю, що розробляється: опис, ідентифікація, мікробіологічна чистота, значення рН тощо. Результати досліджень наведені у табл. 4.13.

Опис. Гель буро-жовтого кольору зі слабким специфічним запахом, однорідної консистенції. На зовнішній вигляд має відповідати вимогам ДФУ 2 вид.

Ідентифікація. Наявність ресвератролу та гіалуронової кислоти в препараті перевіряється методом ВЕРХ. На хроматограмах випробовуваного розчину гелю час утримування двох основних піків має співпадати з часом утримування цих піків на хроматограмі розчинів порівняння з точністю $\pm 2\%$. (ДФУ 2 вид., 2.2.29)

Таблиця 4.13

Специфікація на гель вагінальний під умовною назвою «Вагітрол»

Показник	Допустимі межі	Методи контролю
ВЛАСТИВОСТІ		
Опис	Однорідна гелеподібна маса буро-жовтого кольору зі слабким специфічним запахом, однорідної консистенції.	Органолептичний ДФУ, вид. 2
ІДЕНТИФІКАЦІЯ		
Ресвератрол	Час утримування ресвератролу на хроматограмі випробовуваного розчину, отриманого за розділом «Кількісне визначення» має відповідати часу утримування СЗ ресвератролу на хроматограмах розчину порівняння	ВЕРХ ДФУ, вид. 2, Т. 1, п. 2.2.29
Кислота гіалуронова	Час утримування натрію гіалуронату на хроматограмі випробовуваного розчину, отриманого за розділом «Кількісне визначення», має відповідати часу утримування СЗ на хроматограмах розчину порівняння	ВЕРХ ДФУ, вид. 2, Т. 1, п. 2.2.29

Продовження табл. 4.13

Показник	Допустимі межі	Методи контролю
Пропіленгліколь	Час утримування пропіленгліколю на хроматографі випробовуваного розчину має відповідати часу утримування розчину порівняння	ВЕГХ ДФУ, вид. 2, Т. 1. п. 2.2.28
ВИПРОБУВАННЯ		
Мікробіологічна чистота	Загальне число аеробних мікроорганізмів в 1 г не більше 10^3 . У препараті допускається загальне число дріжджових і плісневих грибів в 1 г не більше 10^2 . Не допускається наявність бактерій родини Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa та Staphylococcus aureus.	ДФУ, вид. 2, Т. 1, п. 5.1.4.
Однорідність	Гель має бути однорідним	ДФУ, вид. 2, Т.1
pH	Від 4,0 до 4,5	ДФУ, вид. 2, Т.1, п.2.2.3.
Маса вмісту упаковки	Маса вмісту кожного окремого пакування має бути від 4,75 до 5,25 г ($\pm 5\%$)	Відповідно до ДСТУ 64-492-85
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ		
Вміст ресвератролу	У межах від 30,6 до 37,4 мг в 1 г	ВЕРХ ДФУ, вид. 2, Т.1, п. 2.2.29
Вміст кислоти гіалуронової	У межах від 45,0 до 55,0 мг в 1 г	ВЕРХ ДФУ, вид. 2, Т.1, п. 2.2.29
Вміст пропіленгліколю	У межах від 142,5 до 157,5 мг в 1 г	ВЕГХ ДФУ, вид. 2, Т.1. п. 2.2.28.

Однорідність. Гель має бути однорідним. Визначення проводять за методикою ДФУ.

pH. Величину pH гелю вимірюють згідно з ДФУ 2 вид., п. 2.2.3, потенціометрично. pH препарату має бути від 4,0 до 5,5.

Маса вмісту упаковки. Враховуючи особливості застосування препарату, маса вмісту однієї туби має бути не більше 5,0 г. Згідно з ДСТУ 64-492-85 маса вмісту однієї туби має бути в інтервалі $\pm 5\%$ від номінальної; середня маса вмісту 10 туб має бути в інтервалі $\pm 1,3\%$ від номінальної.

Випробування проводились наступним чином:

– десять туб без бушонів разом із вмістом 5,0 г зважують, кожну окремо, з точністю до 0,01 г;

– туби ретельно звільняють від вмісту, зробивши на них подовжній розріз ножицями, промивши кожну тубу гарячою водою;

– старанно видаляють залишки води фільтрувальним папером і знову зважують.

Маса вмісту кожної туби має бути від 4,75 до 5,25 г, середня маса вмісту десяти туб має бути від 4,75 до 5,25 г.

Мікробіологічна чистота. Випробування проводять відповідно до вимог ДФУ 2 вид., п. 5.1.4.

У препараті допускається загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів: не більше 100 мікроорганізмів (бактерій і грибів сумарно) в 1 г. Не допускається наявність ентеробактерій і деяких інших грамнегативних бактерій в 1 г. Не допускається наявність *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г.

Кількісне визначення. Визначення кількісного вмісту ресвератролу, гіалуронової кислоти запропоновано проводити одночасно методом ВЕРХ, пропіленгліколю – методом ВЕГХ. Методики й умови хроматографування описані у 2 розділі.

При дослідженні розробленого препарату одним із важливих показників є герметичність контейнера, що ґрунтується на важливості недопущення кисню до упаковки, який може спричинити як мікробну контамінацію препарату, так і хімічні перетворення його компонентів. Результати дослідження показали, що жодна з 10 туб не давала патьоків на фільтрувальному папері.

Із метою вивчення терміну придатності гелю «Вагітрол» було виготовлено 5 серій препарату в полімерних контейнерах по 5 мл та закладено на зберігання при температурі 8–15 С (прохолодне місце) і 15–25 С (кімнатна температура). Контроль проводили свіжовиготовленого гелю та кожні 3 місяці протягом 27 місяців за показниками, які наведено у специфікації на розроблений препарат (табл. 4.14, 4.15).

За результатами, наведеними у табл. 4.14, встановлено, що протягом усього терміну зберігання при температурах 8–15 С і 15–25 С усі показники якості гелю не виходили за допустимі межі.

У процесі зберігання колір, запах, однорідність гелю не змінювалися. Доведено також, що кількісний вміст діючих речовин у гелі протягом терміну зберігання, який вивчався, залишався в допустимих межах.

Згідно з наведеними показниками, гель вагінальний відповідає вимогам ДФУ та специфікації упродовж усього терміну зберігання незалежно від температурного режиму.

Отже, результати проведених досліджень дозволи розробити промислову технологію гелю «Вагітрол», дослідити стабільність біологічних, фармакотехнологічних, фізико-хімічних показників гелю та встановити термін його придатності. За допомогою сучасних методів хімічних досліджень були розроблені методики ідентифікації та кількісного визначення діючих речовин.

Результати вивчення стабільності гелю «Вагітрол» у процесі зберігання при $t = 8 - 15^\circ\text{C}$

[illegible]

Результати вивчення стабільності гелю «Вагітрол» у процесі зберігання при $t = 15\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$

[illegible]

Висновки до розділу 4

1. Розроблено технологічний процес виготовлення гелю під умовною назвою «Вагітрол», який складається зі стадій приготування водного розчину кислоти гіалуронової, приготування розчину екстракту ресвератролу в ПГ, приготування гелевої основи, виготовлення та гомогенізації гелю, фасування в полімерні контейнери, пакування у пачки та групову тару. Визначено технологічні параметри його отримання.

2. Розроблено методику кількісного та якісного визначення ресвератролу у складі гелю методом ВЕРХ. Установлено, що вміст ресвератролу в препараті знаходиться у межах 30,6-37,4 мг/г. Запропоновано використання ВЕРХ для ідентифікації та кількісного визначення кислоти гіалуронової (45,0-55,0 мг/г). Методом газової хроматографії з полуменево-іонізаційним детектором встановлено вміст і кількість пропіленгліколю в препараті – 142,5-157,5 мг/г.

3. Проведено стандартизацію методики визначення ресвератролу методом ВЕРХ (валідаційні дослідження) з використанням критеріїв прийнятності для допусків вмісту $\pm 10,0\%$ за вимогами ДФУ й встановлено специфічність, лінійність, прецизійність (збіжність) та правильність запропонованої методики.

4. Розроблено специфікацію на гель «Вагітрол», яка включає ідентифікацію ресвератролу, кислоти гіалуронової, пропіленгліколю, їх кількісне визначення, мікробіологічну чистоту, однорідність, рівень рН та масу вмісту упаковки.

5. Досліджено стабільність розробленого препарату при двох температурних режимах зберігання за всіма показниками якості й встановлено термін придатності препарату – 2 роки, 3 міс.

Результати досліджень за розділом наведено у таких публікаціях:

1. Іванюк О. І., Ханін В. А., Ярних Т. Г. Визначення кількісного вмісту ресвератролу в гелі методом ВЕРХ. *Сучасні аспекти створення екстемпоральних алопатичних, гомеопатичних та косметичних лікарських засобів* : матеріали Міжнар. наук.-практ. дистанційної конф. м. Харків, 20 бер. 2020 р. Харків : НФаУ, 2020. С. 80–81.

2. Ярних Т. Г., Іванюк О. І. Розробка технології вагінального гелю з ресвератролом та кислотою гіалуроновою : інформ. лист № 255-2019. Київ, 2019. 4 с. (Протокол ПК «Фармація» № 106 від 26.03.2019 р.).

РОЗДІЛ 5

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

5.1 Фармакологічний скринінг з вибору концентрації екстракту ресвератролу у складі гелю вагінального

Фармакологічні дослідження з вибору концентрації екстракту ресвератролу у складі гелю, що розробляється, проводили у Національному медичному університеті імені О. О. Богомольця на кафедрі фармакології під керівництвом д.мед.н., проф. Г. В. Зайченко.

Для досліджень були виготовлені зразки, що містили екстракт ресвератролу у кількості 0,5, 1, 2, 3%, кислоту гіалуронову – 0,5%, аристофлекс – 1,5%, пропіленгліколь – 15% та воду очищену – до 100%.

Препаратом порівняння був обраний вагінальний гель «Гінодек», до складу якого входить декаметоксин, кислота гіалуронова та допоміжні речовини.

Дослідження проведені на 42 аутбридних білих нелінійних самках щурів, масою 193-295 г віком 6-8 міс. Тварини були вирощені у розпліднику віварію НМУ імені О.О. Богомольця. Щури утримувались у стандартних умовах віварію: температура – 20-25°C, відносна вологість – 50-55%, природне освітлення, раціон, рекомендований для цих видів тварин, питний режим «ad libitum». При проведенні експериментів дотримувались «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджуються з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1985).

Для дослідження фармакологічного впливу нових вагінальних гелів комбінованого складу тварин випадковим чином розподіляли на

експериментальні групи, в кожній з яких було по 6 самок. Для моделювання у тварин гіпоестрогенного стану, який супроводжується симптомами, подібними до симптомів МС у жінок, видаляли основну гормонопродукувальну залозу – яєчники. На 35 день експерименту вже на фоні гіпоестрогенії, що розвивалася, вводили досліджувальні тест-зразки вагінальних гелів комбінованого складу один раз на добу впродовж 28 днів.

З огляду на те, що гіпоестрогеновий стан – це складний симптомокомплекс, який включає не тільки зміни гормонального фону, а й широкий спектр змін в організмі, фармакологічну ефективність досліджуваних препаратів визначали за широким спектром показників.

У період менопаузи спостерігаються атрофічні зміни слизової оболонки піхви, що обумовлено дефіцитом естрогенів. Це призводить до збільшення величини значень вагінального рН. У табл. 5.1 наведені результати дослідження впливу досліджуваних гелів на рН вагінального секрету оварієктомованих самок щурів.

Таблиця 5.1

Вплив досліджених тест-зразків гелів з ресвератролом та гіалуроновою кислотою на рН вагінального секрету оварієктомованих самок щурів

Експериментальна група	Показники рН
Група 1. Інтактний контроль (ІК)	$4,13 \pm 0,08$
Група 2. Контрольна патологія (КП)	$7,0 \pm 0,0^{**}$
Група 3. КП + ресвератрол 0,5%	$4,37 \pm 0,13^{*}$
Група 4. КП + ресвератрол 1%	$5,67 \pm 0,13^{*}$
Група 5. КП + ресвератрол 2%	$5,28 \pm 0,20^{*}$
Група 6. КП + ресвератрол 3%	$6,25 \pm 0,11^{**}$
Група 7. КП + гель «Гінодек®» (Г)	$4,07 \pm 0,07^{*}$

Примітка: * – різниця не є статистично значущою, $p > 0,05$. ** – різниця є статистично достовірною на рівні значущості, $p < 0,01$.

При вимірюванні рН вагінального секрету після лікування через 28 діб у оварієктомованих самок щурів встановлено, що показник рН зменшився з 7,0 до 4,07 од. Були отримані такі результати: величина рН секрету в групах самок зі

збереженими яєчниками та самок з видаленими яєчниками також змінилася на відмітках 4,0 та 6,5 од. відповідно. При лікуванні самок щурів гелем «Гінодек®» спостерігалася повноцінна нормалізація рН вагінального секрету і цей показник відповідав даним тварин групи ІК. Застосування гелю з екстрактом ресвератролу 0,5% позитивно впливало на кислотність вагінального секрету, тобто середнє значення рН зменшувалось порівняно з даними у самок групи КП, але все ж таки не досягало значень ІК. Це можна пояснити порушенням місцевого імунітету та змінами нормоценозу піхви (зменшення кількості *Lactobacillus* spp., збільшення кількості вірулентних штамів бактерій або грибів).

Загалом, гель «Гінодек®» та гель з екстрактом ресвератролу (0,5%) виявляли достатню ефективність за всіма вищенаведеними показниками, що наближалися до показників тварин групи ІК. Зі збільшенням концентрації ресвератролу ефективність гелю суттєво не змінювалася.

Одними з ранніх симптомів МС є вазомоторні порушення, зокрема «припливи жару», збільшена пітливість, головний біль, гіпотонія або гіпертонія [177]. В експерименті для виявлення таких вазомоторних реакцій після видалення яєчників та лікування досліджуваними препаратами вимірювали температуру шкіри біля кореня хвоста. Цей показник вважається еквівалентом симптому «припливів жару» у жінок [178].

У інтактних самок щурів температура шкіри за час спостереження суттєво не змінювалась. При порівнянні груп ІК та КП + Р – 3%, 2% виявлена різниця на рівні значущості $p < 0,001$, що було еквівалентом «припливів жару». У самок з груп КП + Р – 0,5%, КП + Р – 1%, КП, КП + гель «Гінодек®» різниця не була статистично значущою, $p > 0,05$ (табл. 5.2).

Отримані дані свідчать, що досліджувальні гелі з ресвератролом та кислотою гіалуроновою у більшій концентрації (2 та 3%) сприяли прояву

вазомоторної реакції у вигляді «припливів жару» у самок щурів із гіпоестрогенією порівняно з групою ІК.

Таблиця 5.2

Динаміка температури тіла ($^{\circ}\text{C}$) біля кореня хвоста оварієктомованих самок до та після лікування вагінальними гелями з ресвератролом та гіалуроновою кислотою, ($\bar{x} \pm S_x$, $n = 6$)

Експериментальні групи	Вихідна t тіла	t тіла наприкінці 1-го тижня	t тіла наприкінці 2-го тижня	t тіла наприкінці 3-го тижня	t тіла наприкінці 4-го тижня
Інтактний контроль (ІК)	$32,88 \pm 0,19$	$33,08 \pm 0,08$	$32,78 \pm 0,30$	$31,72 \pm 1,44$	$32,77 \pm 0,06$
Контрольна патологія (КП)	$33,75 \pm 0,23$	$34,05 \pm 0,33^{**}$	$34,0 \pm 0,16^{**}$	$33,82 \pm 0,22^{**}$	$34,18 \pm 0,16^{**}$
КП + гель із ресвератролом 0,5%	$33,1$	$33,4 \pm 0,33^{*}$	$33,75 \pm 0,23^{*}$	$34,07 \pm 0,28^{*}$	$33,05 \pm 0,11^{*}$
КП + гель із ресвератролом 1%	$33,12 \pm 0,32^{*}$	$33,57 \pm 0,27^{*}$	$33,83 \pm 0,46^{*}$	$34,05 \pm 0,33^{*}$	$33,18 \pm 0,14^{*}$
КП + гель із ресвератролом 2%	$32,78 \pm 0,31^{*}$	$33,58 \pm 0,20^{*}$	$33,45 \pm 0,31^{*}$	$33,82 \pm 0,25^{*}$	$33,15 \pm 0,15^{*}$
КП + гель із ресвератролом 3%	$33,03 \pm 0,26^{*}$	$33,48 \pm 0,42^{*}$	$33,25 \pm 0,43^{*}$	$33,68 \pm 0,27^{*}$	$33,18 \pm 0,23^{*}$
КП + гель «Гінодек®» (Г)	$32,8 \pm 0,16^{*}$	$33,47 \pm 0,16^{*}$	$33,18 \pm 0,29^{*}$	$33,68 \pm 0,27^{*}$	$33,27 \pm 0,17^{*}$

Примітка: * – різниця не є статистично значущою, $p > 0,05$; ** – різниця є статистично достовірною на рівні значущості, $p < 0,01$.

Важлива роль у симптоматиці клімактеричних розладів, які характеризуються повним припиненням функції яєчників і різким дефіцитом естрогенів, належить психоемоційним розладам [179]. Тому скринінгові дослідження були також проведені з використанням тестів «піднесений

хрестоподібний лабіринт», «відкрите поле» та «екстраполяційне вивільнення», які були використані для оцінки поведінкових реакцій.

Відмічено поліпшення локомоторної активності та зменшення тривожності, показники яких не відрізнялись від таких у ІК, де лікування проводили вагінальним гелем «Гінодек®». На фоні введення гелю «Гінодек®» час, який щури витрачали на вирішення завдання, вірогідно зменшився порівняно з групою тварин КП. Дані табл. 5.2 свідчать, що у тварин ІК латентний період входу в темний рукав та кількість переходів між рукавами не відрізнялись від даних груп, що отримували вагінальний гель з ресвератролом та кислотою гіалуроною 0,5, 1, 2, 3%. Після застосування гелю у щурів зменшувалися прояви тривожності, на що вказує статистично достовірне збільшення показника латентного періоду їх входу в темний рукав лабіринту та часу перебування у світлих рукавах до рівня групи ІК.

Вплив зразків гелів вагінальних з екстрактом ресвератролу та кислотою гіалуроною на гормональний стан оварієктомованих самок щурів. Для вивчення впливу вагінальних гелів на рівень гормонів у крові щурів нами були досліджені рівні естрогену, прогестерону та тестостерону при використанні ресвератролу з різною концентрацією.

Найбільш характерні зміни, які спостерігаються після хірургічного видалення яєчників, стосуються рівня статевих гормонів (естрадіолу, прогестерону і тестостерону) у крові. У зв'язку з цим було досліджено вплив нових вагінальних гелів на гормональний профіль оварієктомованих самок щурів. Зважаючи на те, що гормональні порушення є первинними у розвитку запальних процесів у піхві, а також впливають на її резистентність до інфекції [180], було досліджено вміст естрадіолу, прогестерону і тестостерону в сироватці крові самок експериментальних груп (табл. 5.3).

Вміст статевих гормонів у сироватці крові у оварієктомованих самок щурів після лікування вагінальними гелями з ресвератролом та гіалуроновою кислотою, ($\bar{x} \pm S$, $n = 6$)

Експериментальні групи	Естрадіол, нмоль/л	Прогестерон, нмоль/л	Тестостерон нмоль/л
Інтактний контроль (ІК)	0,42±0,02	50,88±2,58	2,66±0,14
Контрольна патологія (КП)	0,18±0,01**	11,84±0,54**	1,20±0,04**
КП + гель із ресвератролом 0,5%	0,42±0,02*	41,06±1,93*	2,74±1,22*
КП + гель із ресвератролом 1%	0,42±0,02*	42,44±2,45*	2,70±1,15*
КП + гель із ресвератролом 2%	0,41±0,02*	40,28±1,50*	2,73±1,10*
КП + гель із ресвератролом 3%	0,28±0,01*	34,16±1,15*	1,53±0,02*
КП + гель «Гінодек®» (Г)	0,19±0,01**	11,80±0,43**	1,14±0,03**

Примітка: * – різниця не є статистично значущою, $p > 0,05$; ** – різниця є статистично достовірною на рівні значущості, $p < 0,01$.

Як видно з наведених у табл. 5.3 даних, на фоні двосторонньої оварієктомії рівень естрогену достовірно знизився порівняно з ІК, що прямо пов'язано з оперативним втручанням і різким зниженням естрогенів. На особливу увагу заслуговує те, що застосування ресвератролу в мінімальних концентраціях 0,5% нормалізувало рівень естрадіолу порівняно з контрольованою патологією. Підвищення концентрації ресвератролу практично не впливало на рівень естрадіолу в крові, оскільки його рівень знаходився на рівні інтактних щурів.

Підбиваючи проміжні підсумки вже на цьому етапі дослідження, слід звернути увагу на те, що оптимальною концентрацією вмісту ресвератролу можна вважати 0,5%.

Після лікування гелем «Гінодек®» вміст естрадіолу суттєвим чином не змінювався та наближався до значень оварієктомованих щурів з групи КП.

Аналогічна динаміка спостерігалася і при вивченні сироваткового рівня іншого статевих гормону гестагену – прогестерону. Застосування тест-зразка з ресвератролом у концентрації 0,5% сприяло відносній нормалізації рівня досліджуваного гестагену порівняно з групою щурів групи КП.

Після лікування гелем «Гінодек®» вміст статевого гормону гестагену – прогестерону суттєвим чином не змінювався та наближався до значень оварієктомованих щурів з групи КП.

У подальшому на особливу увагу заслуговує вивчення коливання рівня іншого статевого гормону – тестостерону. Так, рівень тестостерону у самок щурів з оварієктомією знижувався у 2,22 рази. Застосування тест-зразків гелів з ресвератролом та гіалуроновою кислотою сприяло нормалізації рівня цього гормону порівняно з групою тварин ІК. При цьому слід підкреслити, що, як і в попередніх випадках, оптимальна концентрація ресвератролу в гелі, що приводила до покращання гормонального балансу, становила 0,5% ресвератролу.

Після лікування гелем «Гінодек®» вміст статевого гормону тестостерону суттєвим чином не змінювався та наближався до значень оварієктомованих щурів групи КП.

Загалом, при помірній мірі відновлення гормонального фону найбільшу ефективність виявлявгель із ресвератролом (0,5%) та гіалуроновою кислотою, який за вищенаведеними показниками наближався до рівня тварин групи ІК. Збільшення концентрації ресвератролу не приводило до покращання фармакологічної дії гелів.

Отримані результати свідчать, що при застосуванні в топікальній лікарській формі досліджувані тест-зразки виявляють не тільки місцеву, а й системну дію.

Отже, результати фармакологічних досліджень дозволили встановити, що оптимальний вміст ресвератролу у складі гелю становить 0,5%, оскільки за переважною більшістю показників на моделі експериментального гіпоестрогенового стану у тварин він виявився найбільш ефективним та безпечним.

5.2 Вплив гелю під умовною назвою «Вагітрол» на мікробіоценоз вагінального секрету оварієктомованих самок щурів

Вагінальний біотоп – це ділянка середовища ендогенної мікрофлори, що характеризується однорідними умовами існування. Показано, що після білатеральної оварієктомії в посівах вагінального секрету статистично достовірно збільшується кількість умовно-патогенних мікроорганізмів, аеробних грамнегативних бактерій, кишкових паличок, стафілококів, з'являються клостридії. Установлено вірогідне зниження кількості лактобактерій, що трактували як дисбіоз піхви. Усі ці зміни вагінального біотопу вказували на суттєві зміни біоценозу піхви самок тварин (табл. 5.4).

Зміни мікробного пейзажу піхви у самок щурів при використанні комбінованого гелю виявлялися зменшенням умовно-патогенних мікроорганізмів, загальної кількості анаеробів, кишкової палички, стафілококів і вираженою колонізацією лактобактеріями. Це свідчить про поліпшення показників біотопу вагіни. Показник КУО (анаеробні бактерії) дорівнював або лише наближався у більшості мікроорганізмів до значень ІК. У період постменопаузи спостерігаються атрофічні зміни слизової оболонки піхви, що обумовлено дефіцитом естрогенів. У результаті із транссудату, що секретується слизовою оболонкою вагіни, зникає глікоген, а з вагінального секрету елімінує основний компонент, який підтримує мікробіоценоз піхви, лакто- та біфідобактерії. Це призводить до збільшення величини значень вагінального рН та посилення симптомів атрофічного вагініту. Зменшення кислотності вагінального секрету співпадає з даними літератури та пояснюється змінами гормонального фону організму самок і мікробіоценозу в піхві. Між групами оварієктомованих тварин, які в подальшому отримували лікування, статистично достовірної різниці не було.

Таблиця 5.4

**Показники стану біоценозу нижнього відділу генітального тракту самок щурів різних експериментальних груп
(КУО/г, N = 6)**

Мікроорганізми	Групи тварин					
	інтактні	контроль		гель «Вагітрол»		
	M±m	M±m	P ₁	M±m	P ₁	P ₂
Анаеробні бактерії	9,06± 0,08	9,92± 0,29	>0,05	9,02± 0,08	>0,05	<0,05
Клостридії	0,00± 0,00	6,39± 0,15	>0,05	4,72± 0,14	>0,05	<0,05
Кишкова паличка	6,79± 0,12	9,87± 0,14	>0,05	6,70± 0,13	>0,05	<0,05
Інші аеробні грам негативні бактерії	6,15± 0,06	8,17± 0,06	>0,05	6,14± 0,14	>0,05	<0,05
Стафілококі	3,20± 0,05	5,20± 0,07	>0,05	3,22± 0,10	>0,05	<0,05
Лактобактерії	10,05± 0,06	7,76± 0,28	>0,05	10,13± 0,09	>0,05	<0,05

Примітка: P₁—у порівнянні з інтактними тваринами; P₂ – у порівнянні з контрольною групою тварин.

Отримані результати свідчать, що при застосуванні в топікальній лікарській формі досліджуваний гель виявляє системну дію. Між групами оварієктомованих тварин, які в подальшому отримували лікування, статистично достовірної різниці не було.

5.3 Вплив вагінального гелю з ресвератролом на функціональний стан центральної нервової системи оварієктомованих самок щурів

Важлива роль у симптоматиці КР, які характеризуються повним припиненням функції яєчників і різким дефіцитом естрогенів, належить психоемоційним розладам. Психічні порушення (астенія, тривожність, депресія, нав'язливий страх та ін.) тією чи іншою мірою обов'язково присутні в структурі МС, а інколи і домінують. Тому доцільно було поглиблено вивчити фармакодинаміку нових вагінальних лікарських форм, зокрема гелю з ресвератролом, призначених для корекції гіпоестрогенових станів, провести дослідження його супутніх психотропних властивостей у оварієктомованих самок щурів. Тривожність – це емоційний стан, який виникає в ситуаціях невизначеної небезпеки та сприяє пристосуванню до умов довкілля, що змінюється, але є докази, що це викликає гіперреактивність до стресу з негативними наслідками для здоров'я [181]. Як у людей, так і у тварин ступінь тривожності залежить від статі та змінюється з віком [182]. При старінні тривожність зростає на тлі зменшення адаптивних резервів організму у жінок, цьому сприяє стан гіпоестрогенії [183]. Одним із визнаних тестів для дослідження стану тривожності та локомоторної активності тварин є «піднесений хрестоподібний лабіринт» [184, 185], який був використаний при вивченні поведінкових реакцій у оварієктомованих самок після курсового і/в введення досліджуваних препаратів.

Дані табл. 5.5 свідчать, що у тварин ІК латентний період входу в темний рукав та кількість переходів між рукавами не відрізнялись від даних групи ОС, що отримували крем-гель з ресвератролом 0,5, 1, 2, 3%. Після

застосування гелю з Р та ГК у щурів зменшувалися прояви тривожності, на що вказує статистично достовірне збільшення показника латентного періоду їх входу в темний рукав лабіринту та часу перебування у світлих рукавах до рівня групи ІК.

Таблиця 5.5

Показники поведінки ОС щурів у тесті «піднесений хрестоподібний лабіринт» під впливом тест-зразків вагінальних гелів з ресвератролом та кислотою гіалуроновою, ($\bar{x} \pm S_x$, $n = 6$)

Експериментальні групи	Латентний період входу в темний рукав	Час перебування у світлому рукаві	Час перебування в темному рукаві	Кількість переходів
Інтактний контроль (ІК)	14,01 $\pm$ 2,73	190,93 $\pm$ 4,46	109,17 $\pm$ 4,26	12,35 $\pm$ 0,7
Контрольна патологія (КП)	2,84 $\pm$ 0,98	99,33 $\pm$ 11,09	201,77 $\pm$ 12,06	4,16 $\pm$ 0,32
ОС, що отримували гель «Вагітрол»	18,00 $\pm$ 3,89	179,83 $\pm$ 5,69	118,17 $\pm$ 5,70	13,17 $\pm$ 0,70

Із даних табл. 5.5 видно, що у щурів після оварієктомії вірогідно знижувалась локомоторна активність: кількість пересічених квадратів зменшилась порівняно з групою ІК. Значне зниження орієнтовно-дослідницької активності щурів виявлялося у кількості заглядань в отвори і кількості вертикальних стійок ($p < 0,05$). Водночас підвищувався рівень емоційної напруги тварин, на що вказувало зростання кількості актів дефекацій та уринацій відповідно. Лікування ОС щурів вагінальним гелем «Вагітрол» сприяло нормалізації показників локомоторної, орієнтовно-дослідницької видів активності та вегетативного супроводження емоційних реакцій, показники яких досягали рівня інтактних тварин.

5.4 Вивчення токсичності препарату

У результаті проведених досліджень встановлено, що після одноразового введення самкам щурів гелю «Вагітрол» в/ш у дозі 5000 мг/кг через 1 годину частина тварин пересувалася по клітці і вмивалася. Через 3

год після введення препарату усі щури активно пересувалися по клітці, пили воду і вживали їжу. Аналогічна картина спостерігалась і у тварин при використанні референтного препарату в еквівалентній дозі. Подальше спостереження протягом 14 діб не виявило загибелі самок щурів, ознак інтоксикації та негативного впливу на стан внутрішніх органів і гонад, коефіцієнти маси тварин залишались у межах фізіологічної норми. Біохімічні дослідження показали, що одноразове введення вагінального гелю не впливає на показники, що характеризують функціональний стан печінки самок щурів: показник тимолової проби, концентрація альбуміну та загального білка знаходилися в допустимих межах фізіологічної норми щурів. Між показниками тварин, що піддавалися впливу препарату «Вагітрол» та препарату порівняння «Генодек», достовірні відмінності були відсутні.

Патоморфологічне дослідження щурів, проведене на 14 добу, не виявило ознак таких патологічних процесів, як запалення, розлад кровообігу, атрофія, гіпертрофія різних органів і систем. Розташування органів, їх зовнішній вигляд, стан паренхіматозних органів на розрізі відповідають нормі.

У результаті дослідження гострої токсичності можна зробити висновок, що досліджуваний і референтний препарати при нашкодному нанесенні в дозі 5000 мг/кг не мають токсичного впливу на організм піддослідних самок щурів. Тобто, за клінічною симптоматикою інтоксикації тварин і параметрами гострої токсичності препарат «Вагітрол» відповідає референтному препарату «Гінодек» та відноситься до практично нетоксичних речовин (V клас токсичності) за класифікацією К. К. Сидорова.

5.5 Дослідження мікробіологічної чистоти гелю «Вагітрол»

Мікробіологічну чистоту визначали за методикою, що наведена у розділі 2. Результати дослідження мікробіологічної чистоти розроблюваного вагінального гелю наведені у табл. 5.6.

У зразках гелю, що досліджувався, не виявлено бактерії родини Enterobacteriaceae, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa. Загальна кількість бактерій в 1 г препарату не перевищувала 15, грибів – 25. За ступенем мікробної контамінації гель «Вагітрол» відповідав вимогам ДФУ – 2 вид. до препаратів місцевого застосування.

Таблиця 5.6

Результати контролю мікробної контамінації гелю «Вагітрол» у процесі зберігання

№ серії	Загальне число мікроорганізмів в 1 г препарату		Мікроорганізми		
	бактерій	грибів	Entero-bacteriaceae	S. aureus	Ps. aeruginosa
Свіжевиготовлені зразки					
110319	< 10	10	Відсутність росту	Відсутність росту	Відсутність росту
Через 6 місяців зберігання					
120319	< 10	10	Відсутність росту	Відсутність росту	Відсутність росту
Через 12 місяців зберігання					
130319	10	< 20	Відсутність росту	Відсутність росту	Відсутність росту
Через 18 місяців зберігання					
170319	10	< 20	Відсутність росту	Відсутність росту	Відсутність росту
Через 24 місяці зберігання					
180319	15	< 25	Відсутність росту	Відсутність росту	Відсутність росту

Отже, проведені дослідження мікробіологічної чистоти дозволяють зробити висновок про стабільність препарату при зберіганні протягом 2 років, 3 місяців при температурі 8–25 °С.

Висновки до розділу 5

1. Результати фармакологічних досліджень дозволили встановити, що оптимальний вміст екстракту ресвератролу у складі гелю становить 0,5%, оскільки за переважною більшістю показників на моделі експериментального гіпоестрогенового стану у тварин він виявився найбільш ефективним та безпечним. Збільшення вмісту ресвератролу не приводило до покращання результатів лікування.

2. Курсове 28-денне лікування ОС щурів із застосуванням вагінальних гелів з ресвератролом та гіалуроновою кислотою приводить до відновлення фізіологічного діапазону значень кислотності вагінального секрету (показник рН достовірно знижувався ($p < 0,05$) порівняно з КП), складу біотопу піхви (зростає кількість лактобактерій), що вказує на помірне підвищення функціональної активності епітеліальних клітин вагінального епітелію.

3. Уведення гелів з ресвератролом та гіалуроновою кислотою сприяє вірогідному підвищенню (порівняно з тваринами групи КП) вмісту естрадіолу та прогестерону.

4. Лікування ОС щурів вагінальним гелем «Вагітрол» сприяло нормалізації показників локомоторної, орієнтовно-дослідницької видів активності та вегетативного супроводження емоційних реакцій, показники яких досягали рівня інтактних тварин.

5. За результатами дослідження гострої токсичності встановлено, що досліджуваний і референтний препарати при нашкірному нанесенні в дозі 5000 мг/кг не виявляли токсичного впливу на організм піддослідних щурів.

6. Результати дослідження мікробіологічної чистоти гелю «Вагітрол» свідчать про відповідність мікробіологічної чистоти препарату вимогам ДФУ протягом 2 років, 3 місяців зберігання.

Результати досліджень за розділом наведено у таких публікаціях:

1. Зайченко Г. В., Горчакова Н. О., Стрига О. А., Яковлева Н. Ю., Рубан О. І. Аспекти фармакодинаміки та клінічної фармакології гіалуронової кислоти. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип. 1 (135). С. 33–42.

2. Зайченко Г. В., Горчакова Н. О., Стрига О. А., Рубан О. І. Фармакологічне обґрунтування розробки нових лікарських препаратів на основі ресвератролу. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип. 4 (1). С. 21–30.

3. Іванюк О. І., Ярних Т. Г., Стрига О. А., Зайченко Г. В., Ковалевська І. В. Фармацевтична композиція для корекції гіпоестрогенових станів у жінок у формі гелю вагінального : пат. 139105 Україна. № у 201905153; заявл. 15.05.2019 ; опубл. 26.12.2019, Бюл. № 24. 4 с.

4. Стрига О. А., Зайченко Г. В., Іванюк О. І. Оцінка фармакологічної дії нових вагінальних гелів з ресвератролом та гіалуроновою кислотою за впливом на масу тіла оваріоектомованих щурів. *Planta+. Досягнення та перспективи* : матеріали Міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. пам'яті д-ра хім. наук, проф. Ніни Павлівни Масютіної (до 95-річчя від дня народж.), м. Київ, 20-21 лют. 2020 р. Київ : Паливода А.В., 2020. С. 231–232.

ВИСНОВКИ

На підставі проведених теоретичних та експериментальних досліджень вперше науково обґрунтовано склад і розроблено технологію та методи стандартизації нового гелю вагінального з ресвератролом та кислотою гіалуроновою.

1. Проаналізовано та узагальнено дані інформаційних джерел щодо етіопатогенетичних аспектів клімактеричних розділів, напрямків їх фармакокорекції, вимог та рекомендацій до розробки, виробництва та застосування вагінальних засобів у формі гелів. Установлено, що фізіологічними особливостями у літньому віці, які мають вплив на здоров'я та якість життя, є менопауза та дефіцит естрогенових гормонів. Найхарактернішими симптомами вікової нестачі естрогенів є вазомоторні розлади, порушення сну, психоемоційні та урогенітальні порушення. Установлено специфічні біофармацевтичні аспекти вагінальних лікарських форм, які безпосередньо впливають на терапевтичну ефективність: в'язкість та мукоадгезивні властивості.

2. Результати маркетингових досліджень свідчать, що ринок негормональних препаратів останнім часом поповнюється препаратами місцевої дії, у складі яких найбільшу поширеність мають складові рослинного походження, а також гіалуронова, молочна, аскорбінова кислоти, вітаміни. Цей сегмент ринку представлений незначним асортиментом вітчизняних засобів і є перспективним для вітчизняних виробників.

3. Досліджено фізико-хімічні властивості екстракту ресвератролу та кислоти гіалуронової. Установлено, що оптимальним розчинником екстракту ресвератролу у складі гелю є пропіленгліколь, кислоти гіалуронової – вода очищена.

4. За допомогою біофармацевтичних, структурно-механічних, технологічних та мікробіологічних досліджень встановлено тип основи-носія

та її оптимальний склад: аристофлекс AVC – 1,5%, пропіленгліколь – 15,0%, натрію альгінат – 0,5%, косгард – 0,5%, вода очищена до 100,0%.

5. На підставі фізико-хімічних, реологічних досліджень розроблено та обґрунтовано раціональну технологію виготовлення гелю «Вагітрол». Запропоновано методики ідентифікації та кількісного визначення діючих речовин у складі препарату. Визначено його органолептичні та фізико-хімічні показники, які дозволяють контролювати якість у процесі виробництва та зберігання. Визначено терміни та умови зберігання гелю «Вагітрол» – 2 роки, 3 місяці при температурі 8–25 °С.

6. Досліджено специфічну фармакологічну активність препарату. Установлено, що гель «Вагітрол» відновлює вагінальний секрет до фізіологічного стану, підвищує функціональну активність епітеліальних клітин, сприяє нормалізації вмісту естрадіолу та прогестерону, помірно впливає на функціональний стан центральної нервової системи. Доведена безпечність препарату.

7. Розроблено проєкти МКЯ і технологічного промислового регламенту на виробництво препарату «Вагітрол» й апробовано їх в умовах ВАТ «Хімфармзавод «Червона зірка». Результати дисертаційних досліджень упроваджено у навчальний процес низки закладів вищої освіти фармацевтичного (медичного) профілю України.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Демографічний щорічник «Населення України за 2018 рік». Київ : Державна служба статистики України, 2019. 188 с.
2. Лебідь В. Г., Хайменова Г. С. Особливості лікування жінок старших вікових груп, хворих на остеоартрит з коморбідною патологією. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії*. 2018. Т. 18, № 3. С. 135–140.
3. Гопчук Е. Н. Уриклар в комплексе лечения урогенитальных расстройств климактерического периода. *Здоровье женщины*. 2014. № 6. С. 122–126.
4. Factors related to age at natural menopause: longitudinal analyses from SWAN / E. B. Gold et al. *Am. J. Epidemiol.* 2013. Vol. 178. P. 70–83.
5. Національний консенсус щодо ведення пацієнток у клімактерії / Тобі де Вільєрс та ін. *Репродуктивна ендокринологія*. 2016. № 1. С. 8–25.
6. Розлади жіночого здоров'я внаслідок вікового дефіциту естрогенів та їх корекція (огляд літератури) / Г. В. Зайченко та ін. *Журнал НАМН України*. 2019. Т. 25, № 2. С. 211–221.
7. Соломенчук Т. М., Процько В. В., Восух О. В. Порівняльна клініко-анамнестична характеристика факторів ризику гострого коронарного синдрому без елевації сегмента ST у жінок в пери- та постменопаузальний періоди. *Вісник наукових досліджень*. 2017. № 4. С. 40–47.
8. Calleja-Agius J., Brincat M. P. The urogenital system and the menopause. *Climacteric*. 2015. Vol. 18 (Suppl. 1). P. 18–22.
9. Green S. M., Key B. L., McCabe R. E. Cognitive-behavioral, behavioral, and mindfulness-based therapies for menopausal depression: a review. *Maturitas*. 2015. Vol. 80. P. 37–47.
10. Kaunitz A. M., Manson J. E. Management of menopausal symptoms. *Obstet. Gynecol.* 2015. Vol. 126. P. 859–876.

11. Дубоссарська З. М. Еволюція уявлень про клімакс та його лікування. *Нова медицина*. 2012. № 5. С. 26–27.
12. Frank A., Brown L. M., Clegg D. J. The role of hypothalamic estrogen receptors in metabolic regulation. *Front. Neuroendocrinol.* 2014. Vol. 35. P. 550–557.
13. Pollycove R., Naftolin F., Simon J. A. The evolutionary origin and significance of menopause. *Menopause*. 2011. Vol. 18. P. 336–342.
14. Santoro N., Epperson C. N., Mathews S. B. Menopausal Symptoms and Their Management. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2015. Vol. 44. P. 497–515.
15. Sagdeo M. M., Arora D. Menopausal symptoms: a comparative study in rural and urban women. *JK Sci.* 2011. Vol. 13. P. 23–27.
16. Паньков О. М. Стан проблеми клімактерію: деякі патогенетичні аспекти концепції репродуктивного старіння. *Архів клінічної медицини*. 2010. № 1. С. 9–13.
17. Татарчук Т. Ф., Єфименко О. А., Дубовка К. М. Проблема клімактерію у практиці сімейного лікаря. *Репродуктивна ендокринологія*. 2012. № 4. С. 22–32.
18. Freedman R. R. Menopausal hot flashes: mechanisms, endocrinology, treatment. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2014. Vol. 142. P. 115–120.
19. Lee J., Han Y., Cho H. H., Kim M. R. Sleep Disorders and Menopause. *J. Menopausal. Med.* 2019. Vol. 25. P. 83–87.
20. Sleep in midlife women: effects of menopause, vasomotor symptoms, and depressive symptoms / L. Lampio et al. *Menopause*. 2014. Vol. 21. P. 1217–1224.
21. Балан В. Е., Ковалёва Л. А., Тихомирова Е. В. Генитоуринарный синдром в климактерии. Возможности терапии. *Медицинский алфавит*. 2016. Т. 2, № 17. С. 31–35.

22. Колотуша В. Г. Психопатологічні прояви у жінок в перименопаузальний період та можливості їх корекції негормональними методами. *Ліки України*. 2014. № 3–4. С. 16–19.

23. Effects of hormone replacement therapy on depressive and anxiety symptoms after oophorectomy / D. D. Đoković et al. *Med. Glas. (Zenica)*. 2015. Vol. 12. P. 79–85.

24. Ботоева Е. А. К вопросу о фитоэстрогенах (обзор литературы). *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2010. № 2 (72). С. 234–238.

25. Nappi R. E., Kokot-Kierepa M. Women's voices in the menopause: results from an international survey on vaginal atrophy. *Maturitas*. 2010 Vol. 67. P. 233–238.

26. Балан В. Е., Ковалёва Л. А., Злотникова Ю. П. Необходимость интимной гигиены в постменопаузе. *Медицинский алфавит*. 2016. Т. 1, № 7. С. 26–30.

27. Глазунова А. В., Юренева С. В. Вагинальная атрофия: этиологические аспекты и современные подходы терапии. *Лечащий врач*. 2014. № 3. С. 57–62.

28. Sexual function and distress in postmenopausal women with chronic insomnia: exploring the role of stress dysregulation / D. A. Kalmbach et al. *Nat. Sci. Sleep*. 2019. Vol. 11. P. 141–153.

29. Sexual function in pre- and post-menopausal women with obstructive sleep apnea syndrome / C. Stavaras et al. *Int. J. Impot. Res*. 2012. Vol. 24. P. 228–233.

30. Kingsberg S. A., Wysocki S., Magnus L., Krychman M. L. Vulvar and vaginal atrophy in postmenopausal women: findings from the REVIVE (Real women's views of treatment options for menopausal vaginal changes) survey. *J. Sex. Med*. 2013. Vol. 10. P. 1790–1799.

31. Калугина Л. В., Татарчук Т. Ф., Занько О. В. Генитоуринарный менопаузальный синдром – проблема женщин элегантного возраста и не только. *Репродуктивная эндокринология*. 2016. № 2. С. 68–74.

32. Ромащенко О. В., Мельников С. М., Білоголовська В. В., Ходжава М. М. Визначення частоти генітоуринарного менопаузального синдрому та жіночих сексуальних дисфункцій. *Урологія*. 2018. Т. 22, № 2. С. 61–65.

33. The recent review of the genitourinary syndrome of menopause / Н. К. Kim et al. *J. Menopausal. Med.* 2015. Vol. 21. P. 65–71.

34. Prossnitz E. R., Barton M. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2014. Vol. 389. P. 71–83.

35. Попков А. В. Местные эстрогены в лечении вагинальной атрофии. *Здоровье женщины*. 2019. № 5. С. 38–41.

36. Genitourinary syndrome of menopause: an overview of clinical manifestations, pathophysiology, etiology, evaluation, and management / J. Gandhi et al. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2016. Vol. 215. P. 704–711.

37. Веропотвелян П. Н., Цехмистренко И. С., Веропотвелян Н. П., Гужевская И. В. Атрофия слизистой влагалища у пациенток в постменопаузе. *Збірник наукових праць асоціації акушерів-гінекологів України*. 2014. № 1/2. С. 69–76.

38. Goldstein I., Dicks B., Kim N. N., Hartzell R. Multidisciplinary overview of vaginal atrophy and associated genitourinary symptoms in postmenopausal women. *Sex. Med.* 2013. Vol. 1. P. 44–53.

39. Human vaginal pH and microbiota: an update / K. Godha et al. *Gynecol. Endocrinol.* 2018. Vol. 34. P. 451–455.

40. Naumova I., Castelo-Branco C. Current treatment options for postmenopausal vaginal atrophy. *Int. J. Womens Health*. 2018. Vol. 10. P. 387–395.

41. Серов В. Н. Терапия урогенитальных расстройств, обусловленных дефицитом эстрогенов. *Акушерство, гинекология и репродукция*. 2010. Т. 4, № 1. С. 21–35.

42. Montoya T. I., Maldonado P. A., Acevedo J. F., Word R. A. Effect of vaginal or systemic estrogen on dynamics of collagen assembly in the rat vaginal wall. *Biol. Reprod.* 2015. Vol. 92. P. 1–9.

43. Menopausal hormone therapy and health outcomes during the intervention and extended poststopping phases of the Women's Health Initiative randomized trials / J. E. Manson et al. *JAMA.* 2013. Vol. 310. P. 1353–1368.

44. Прилепская В. Н. Генитоуринарный менопаузальный синдром – междисциплинарная проблема. *Гинекология.* 2018. № 20. С. 9–14.

45. Crandall C. J., Diamant A., Santoro N. Safety of vaginal estrogens: a systematic review. *Menopause.* 2020. Vol. 27. P. 339–360.

46. Зайченко Г. В., Карпенко Н. О., Стрига О. А., Сініцина О. С. Фармакологічний менеджмент менопаузальних розладів: фітоестрогени (огляд літератури). *Проблеми ендокринної патології.* 2018. № 4. С. 65–74.

47. Edwards D., Panay N. Treating vulvovaginal atrophy/genitourinary syndrome of menopause: how important is vaginal lubricant and moisturizer composition? *Climacteric.* 2016. Vol. 19. P. 151–161.

48. Evaluation of the efficacy and safety of hyaluronic acid vaginal gel to ease vaginal dryness: a multicenter, randomized, controlled, open-label, parallel-group, clinical trial. *J. Chen et al. J. Sex. Med.* 2013 Vol. 10. P. 1575–1584.

49. Stute P. Is vaginal hyaluronic acid as effective as vaginal estriol for vaginal dryness relief? *Arch. Gynecol. Obstet.* 2013. Vol. 288. P. 1199–1201.

50. Role of high molecular weight hyaluronic acid in postmenopausal vaginal discomfort / E. F. Grimaldi et al. *Minerva Ginecol.* 2012. Vol. 64. P. 321–329.

51. Безрукавий Є. А. Дослідження функціональних властивостей кислоти гіалуронової та її солей. *Укр. біофармац. журн.* 2013. № 3. С. 52–54.

52. Химическая модификация гиалуроновой кислоты и ее применение в медицине / Н. Н. Сигаева и др. *Вестник Башкирского университета.* 2012. Т. 17, № 3. С. 1220–1241.

53. Шинкина А. А., Шарапов В. И. Строение и применение в медицине гиалуроновой кислоты. *Научное сообщество студентов. Междисциплинарные исследования* : сб. ст. по материалам X студ. междунар. науч.-практ. конф. Новосибирск : Изд-во АНС «СибАК», 2016. № 7 (10). С. 231–237.

54. Лич І. В., Угрин А. О., Волошина І. М. Гіалуронова кислота: біосинтез та використання. *Укр. біофармац. журн.* 2019. № 2. С. 6–13.

55. Рубан Е. И. Ярных Т. Г. Гиалуроновая кислота и её роль в организме человека. *Перспективы развития биологии, медицины и фармации* : материалы IV Междунар. науч. конф. молодых ученых и студентов, г. Шымкент, 9-10 дек. 2016 г. Шымкент, 2016. С. 28–29.

56. Гладух Є. В., Безрукавий Є. А., Ніколайчук Н. О. Визначення температурних режимів виробництва м'якої лікарської форми з цинковою сіллю кислоти гіалуронової та тіотриазоліном. *Укр. біофармац. журн.* 2010. № 6. С. 8–15.

57. Кузнецова И. В., Успенская Ю. Б. Применение фитоэстрогенов у женщин в период менопаузального перехода и постменопаузе. *Здоровье женщины.* 2014. № 6. С. 113–117.

58. Lecomte S., Demay F., Ferrière F., Pakdel F. Phytochemicals Targeting Estrogen Receptors: Beneficial Rather Than Adverse Effects? *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18. P. 1–19.

59. Phytoestrogens in postmenopause: the state of the art from a chemical, pharmacological and regulatory perspective / E. Poluzzi et al. *Curr. Med. Chem.* 2014. Vol. 21. P. 417–436.

60. Zhao E., Mu Q. Phytoestrogen biological actions on Mammalian reproductive system and cancer growth. *Sci. Pharm.* 2011. Vol. 79. P. 1–20.

61. Rietjens I. M. C. M., Louisse J., Beekmann K. The potential health effects of dietary phytoestrogens. *Br. J. Pharmacol.* 2017. Vol. 174. P. 1263–1280.

62. Impact of Phytoestrogens on Serum Lipids in Postmenopausal Women / M. Terzic et al. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2012. Vol. 72. P. 527–531.

63. Desmawati D., Sulastri D. Phytoestrogens and their health effect. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* 2019. Vol. 7. P. 495–499.
64. Recent advances in the anti-aging effects of phytoestrogens on collagen, water content, and oxidative stress / T. Liu et al. *Phytother. Res.* 2020. Vol. 34. P. 435–447.
65. Ghazanfarpour M., Latifnejad Roudsari R., Treglia G., Sadeghi R. Topical administration of isoflavones for treatment of vaginal symptoms in postmenopausal women: A systematic review of randomised controlled trials. *J. Obstet. Gynaecol.* 2015. Vol. 35. P. 783–787.
66. Effect of *Foeniculum vulgare* (fennel) vaginal cream on vaginal atrophy in postmenopausal women: a double blind randomized placebo-controlled trial / M. Yaralizadeh et al. *Maturitas.* 2016. Vol. 84. P. 75–80.
67. Preliminary data on the effectiveness of resveratrol in a new formulation in treatment of hot flushes / L. Leo et al. *Minerva Ginecol.* 2015. Vol. 67. P. 475–483.
68. Rayalam S., Della-Fera M. A., Baile C. A. Synergism between resveratrol and other phytochemicals: implications for obesity and osteoporosis. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011. Vol. 55. P. 1177–1785.
69. Thaung Zaw J. J., Howe P. R. C., Wong R. H. X. Sustained Cerebrovascular and Cognitive Benefits of Resveratrol in Postmenopausal Women. *Nutrients.* 2020. Vol. 12. P. 1–14.
70. Wong R. H. X., Evans H. M., Howe P. R. C. Resveratrol supplementation reduces pain experience by postmenopausal women. *Menopause.* 2017 Vol. 24. Vol. 916–922.
71. Permeation profiles of resveratrol cream delivered through porcine vaginal mucosa: Evaluation of different HPLC stationary phases / H. C. Polonini et al. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2015. Vol. 1002. P. 8–12.
72. Van der Bijl P., van Eyk A. D. Comparative in vitro permeability of human vaginal, small intestinal and colonic mucosa. *Int. J. Pharm.* 2003. Vol. 261. P. 147–152.

73. De Araújo Pereira R. R., Bruschi M. L. Vaginal mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2012. Vol. 38. P. 643–652.
74. Hussain A., Ahsan F. The vagina as a route for systemic drug delivery. *J. Control. Release.* 2005. Vol. 103. P. 301–313.
75. Patel A., Patel J. Vagina as an application site for drug delivery. *Indian Journal of Novel Drug delivery.* 2012. Vol. 4. P. 17–23.
76. Харенко Е. А., Ларионова Н. И., Демина Н. Б. Мукоадгезивные лекарственные формы (обзор). *Химико-фармацевтический журнал.* 2009. Т. 43, № 4. С. 21–29.
77. Agarwal S., Aggarwal S. Mucoadhesive polymeric platform for drug delivery; a comprehensive review. *Curr. Drug Deliv.* 2015. Vol. 12. P. 139–156.
78. Boddupalli B. M., Mohammed Z. N. K., Nath R. A., Banji D. Mucoadhesive drug delivery system: an overview. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2010. Vol. 1. P. 381–387.
79. Методы анализа мукоадгезии: от фундаментальных исследований к практическому применению в разработке лекарственных форм / Е. А. Киржанова и др. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2014. № 3. С. 58–72.
80. Dalal P. K., Agarwal M. Postmenopausal syndrome. *Indian J. Psychiatry.* 2015 Vol. 57 (Suppl 2). P. S222–S232.
81. Chatterjee B., Amalina N., Sengupta P., Mandal U. K. Mucoadhesive polymers and their mode of action: a recent update. *J. Appl. Pharm.* 2017. Vol. 7. P. 195–203.
82. Salamat-Miller N., Chittchang M., Johnston T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005 Vol. 57. P. 1666–1691.
83. Ромащенко О. В., Григоренко В. М., Білоголовська В. В., Бабич О. В. Профілактика та лікування проявів генітоуринарного менопаузального синдрому у жінок із використанням терапевтичної методики на основі

плазми, збагаченої тромбоцитами. *Медичні аспекти здоров'я жінки*. 2019. № 4–5. С. 21–28.

84. Andrews G. P., Laverty T. P., Jones D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009. Vol. 71. P. 505–518.

85. Anil A., Sudheer P. Mucoadhesive polymers: a review. *J. Pharm. Res.* 2018. Vol. 17. P. 47–55.

86. Carvalho F. C., Bruschi M. L., Evangelista R. C., Gremião M. P. D. Mucoadhesive drug delivery systems. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2010. Vol. 46. P. 1–17.

87. Khutoryanskiy V. V. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. *Macromol. Biosci.* 2011. Vol. 11. P. 748–764.

88. Mucoadhesive drug delivery systems / R. Shaikh et al. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 2011. Vol. 3. P. 89–100.

89. Acartürk F. Mucoadhesive Vaginal Drug Delivery Systems. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 2009. Vol. 3. P. 193–205.

90. Management of symptomatic vulvovaginal atrophy: 2013 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*. 2013. Vol. 20, № 9. P. 888–902.

91. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery / C. M. Caramella et al. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015. Vol. 92. P. 39–52.

92. Rheological Analysis and Mucoadhesion: A 30 Year-Old and Still Active Combination / S. Rossi et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018. Vol. 156. P. 232–238.

93. Vaginal gel drug delivery systems: understanding rheological characteristics and performance / T. Yu et al. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2011. Vol. 8. P. 1309–1322.

94. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «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.

95. Гергель Є. М. Дослідження макро- і мікроелементного складу рослин родини маслинкові (Elaeagnaceae juss.). *Фітотерапія*. 2013. № 1. С. 58-61.
96. Ковалевська І.В. Визначення фізико-хімічних характеристик кверцетину. *Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики*. 2014. №1. С. 13-15.
97. Анурова М. Н., Кашперко А. С., Бахрушина Е. О. Вопросы моделирования слизистой оболочки влагалища для определения биоадгезии вагинальных гелей методом потока in vitro. *The Journal of scientific articles "Health and Education Millennium"*. 2018. Vol. 20, № 5. P. 99–102.
98. Tamagawa H., Takahashi Y. Adhesion force behavior between two gels attached with an electrolytic polymer liquid. *Mater. Chem. Phys.* 2008. № 107. P. 164–170.
99. Mucoadhesive drug delivery systems / R. Shaikh et al. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011. № 3. P. 89–100.
100. Lee J. W., Park Robinson J. H. Bioadhesive-based dosage forms: the next generation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000. Vol. 89. P. 850–866.
101. Шматенко В. В. Обґрунтування складу основи з метою створення м'якого лікарського засобу для лікування ранового процесу. *Вісник Фармації*. 2014. № 2(78). С. 20-23.
102. Мнушко З. Н., Пестун И. В. Теория и практика маркетинговых исследований в фармации : монографія. Харьков : Изд-во НФаУ, 2008. 308 с.
103. База даних «Моріон» URL: <https://pharmbase.com.ua/ru/optovye-predlozheniya/> (дата звернення: 20.09.2016).
104. Державний реєстр лікарських засобів України. URL: <http://www.drlz.com.ua/> (дата звернення: 10.01.2017).
105. Компендиум: лекарственные препараты. URL: <http://compendium.com.ua/> (дата звернення: 10.10.2016).
106. Залізняк В. О. Сучасні погляди на замісну гормональну терапію в пери- та постменопаузі : навч. посіб. для самостійної роботи студентів V-VI

курсів медичного факультету та лікарів-інтернів акушерів-гінекологів. Запоріжжя : ЗДМУ, 2016. 82 с.

107. Іванюк О. І., Ярних Т. Г., Євтушенко О. М. Огляд ринку препаратів для профілактики та лікування урогенітальних симптомів у пре- та постменопаузальному періоді. *Соціальна фармація в охороні здоров'я*. 2019. Т.5, № 4. С. 66-78.

108. Роговская С. И., Семенова Е. Н. Новые подходы к проблеме сухости влагалища у женщин. *Слово про здоров'я*. 2016. № 4. URL: <https://ozdorovie.com.ua/novyie-podhodyi-k-probleme-suhosti-vlagalishha-u-zhenshhin/> (дата обращения: 28.10.2020).

109. Ермакова Е. И. Генитоуринарный менопаузальный синдром: диагностика и принципы лечения. *Медицинский Совет*. 2019. № 13. С. 106–111.

110. Бриф-анализ фармрынка: итоги ноября 2016. *Еженедельник Аптека*. 2016. № 1067(46). URL: <http://www.apteka.ua/article/397246>]. (дата звернення: 10.10.2016).

111. Al-Baghdadi O. Topical estrogen therapy in the management postmenopausal vaginal atrophy: an up-to-date overview. *Climacteric*. 2009. Vol. 12, № 2. P. 91–105.

112. Sinha A and Ewies AAA. Non-hormonal topical treatment of vulvovaginal atrophy: an up-to-date overview. *Climacteric*. 2013. Vol. 16. P. 305–312.

113. Балан В. Е. Урогенитальные расстройства в климактерии : автореф. дис. докт. мед. наук. Москва, 1998. С. 40.

114. Балан В. Е., Журавель А. С., Злотникова Ю. П. Возможности негормональной терапии вагинальной атрофии. *Газета для практикующих гинекологов «Женская консультация»*. 2015. № 1. С. 13–14.

115. Griebing T. L, Liao Z., Smith P. G. Systemic and topical hormone therapies reduce vaginal innervation density in postmenopausal women. *Menopause*. 2012. Vol. 19. P. 630–635.

116. Frank S. M., Ziegler C., Kokot-Kierepa M., Maamari R. Vaginal Health: Insights, Views & Attitudes (VIVA) survey. Canadian cohort. *Menopause Int.* 2013. Vol. 19, № 1. P. 20–27.
117. Pastore L. M., Carter R. A., Hulka B. S., Wells E. Self-reported urogenital symptoms in postmenopausal women: Women's Health Initiative. *Maturitas.* 2004. Vol. 49. P. 292–303.
118. Main social aspects of affects the formation of adequate knowledge about reproductive health in adolescence girls / Z. A. Shkiryak-Nyzhnyk et al. *Репродуктивна ендокринологія.* 2015. № 6. С. 28–32.
119. Baber R. J., Panay N., Fenton A. Rekomendatsii mezhdunarodnogo obshchestva po menopauze v otnoshenii zdorov'ya zhenshchin zrelogo vozrasta i menopauzal'noy gormonal'noy terapii. *Climacteric.* 2016. Vol. 19. P. 109–150.
120. Santoro N., Epperson C. N., Mathews S. B. Menopausal symptoms and their management. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 2015. Vol. 44, № 3. P. 497–515.
121. Thompson J., Ritenbaugh C., Nichter M. Why women choose compounded bioidentical hormone therapy: lessons from a qualitative study of menopausal decision-making. *BMC Womens Health.* 2017. Vol. 17. P. 97.
122. Изучение элементного состава плодов калины обыкновенной и рябины обыкновенной различными современными методами / В. Ю. Андреева и др. *Химия растительного сырья.* 2016. № 1. С. 177–180.
123. Дослідження макро- і мікроелементного складу сировини *Geum urbanum* L. / С. А. Козира та ін. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики.* 2011. Т. 24, № 3. С. 36–37.
124. Іванюк О. І., Ярних Т. Г. Вивчення розчинності ресвератролу для вибору технології введення до складу гелю вагінального. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії* : матеріали III Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 14-15 листоп. 2017 р. Харків : НФаУ, 2017. С. 94.

125. Yarnykh T.G., Ivaniuk O.I. Study of the hyaluronic acid solubility for development of the vaginal gel composition. *Ukrains'kij biõfarmaceutiĉnij žurnal*. 2017. № 6(53). P. 19–23.

126. Рубан О. І., Ярних Т. Г. Вивчення розчинності кислоти гіалуронової з метою визначення шляху її введення до складу гелю вагінального. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології* : зб. наук. пр. Вип. 2. : Сучасні аспекти створення екстемпоральних алопатичних, гомеопатичних і косметичних лікарських засобів : матеріали І Міжнар. наук.-практ. конф., 3-4 берез. 2017 р. Харків :НФаУ, 2017. С. 172–174.

127. Бесман И. В., Рудакова Е. Б. Врачебная тактика при осложненной форме климактерического синдрома у женщин в перименопаузе. *Омский научный вестник*. 2010. № 1 (94). С. 10–13.

128. Биофармацевтические аспекты разработки новой лекарственной формы для лечения атрофического вагинита / М. Н. Анурова и др. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2019. № 2. С.11–15.

129. Головкін В. В., Борищук В. О., Кот Т. А. Вагінальні лікарські форми. Повідомлення III. Розробка вагінального гелю з куріозином. *Фармац. журн*. 2000. № 5. С. 51–54.

130. Гордеева Г. Д., Товстановская В. А., Тер-Тумасова А. Г. Фитоэстрогены и их влияние на здоровье женщины в период климактерия (Обзор литературы). *Здоровье женщины*. 2017. № 10. С. 128–132.

131. Гримберг Н. К. Применение препарата "Овестин" в гинекологической практике. *Здравоохранение Дальнего Востока*. 2003. № 4. С. 29–31.

132. Демидова М. А., Новицкая А. Р., Малыгин А. С. Сравнительный анализ средств заместительной гормонотерапии, применяемых в менопаузе и климактерическом периоде. *Верхневолжский медицинский журнал*. 2012. Т. 10, № 3. С. 21–26.

133. Ельчанинов Д. В. Атерогенные нарушения у женщин с климактерическим синдромом в ранний период постменопаузы и их динамика на фоне лечения фитогормонами. *Здоровье женщины*. 2012. № 10. С. 130–132.

134. Зайдиева Я. З. Заместительная гормонотерапия. *Фармакология и клиническое применение*. Москва, 2001. 50 с.

135. Костромина А. А., Радзинский В. Е., Хамошина М. Б., Союнов М. А. Факторы риска развития климактерического синдрома тяжелой степени: клинико-статистическое исследование. *Доктор. Ру*. 2017. № 9 (138). С. 12–16.

136. Грук Е. 10 фактов о гиалуроновой кислоте. *Косметические средства*. 2016. № 4. С. 80–83.

137. Гладышев В. В., Кучина Г. К., Бурлака Б. С., Бирюк И. А. Исследование реологических свойств мягкой назальной лекарственной формы дилтиазема. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2013. № 1 (11). С. 69–72.

138. Давтян Л. Л., Ващук В. А., Поліщук Ю. П. Реологічні дослідження як основа технологічного процесу у разі створення нового лікарського засобу. *Фармацевтичний журнал*. 2013. № 4. С. 54–58.

139. Основные положения теории регулирования, определения структурно–механических показателей и деформационных характеристик мягких лекарственных и косметических форм / А. И. Тихонов и др. *Косметологія: сьогодні та майбутнє* : матеріали наук.–практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 15 листоп. 2013 р. Харків : НФаУ, 2013. С. 30–35.

140. Полова Ж. Н. Обоснование состава крема антимикробного действия на основании реологических исследований. *Вестник ЮКГФА. Хабаршысы*. 2017. № 1 (78). С. 153–157.

141. Баранова И. И., Запорожская С. Н. Сравнительная характеристика реопараметров гелеобразователей различного происхождения. *Запорожский мед. журн.* 2008. № 4. С. 81–84.

142. Лебединец В. А., Баранова И. И., Грубник И. М. Изучение ряда реопараметров гелевой основы с гидроксипропилцеллюлозой. *Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики* : зб. наук. ст. 2010. № 1, вип. 23. С. 55–57.

143. Кухтенко Г. П., Ляпунова О. О., Лисокобилка О. А. Вивчення структурно-механічних властивостей крему на основі емульсії і роду. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2012. № 3 (10). С. 83–87.

144. Goodwin J. W., Hughes R. W. Rheology for Chemists: An Introduction. Cambridge : Royal Society for Chemistry 2000. 290 p.

145. Mezger T. G. The Rheology Handbook. Hanover : Vincentz Network 2014. 432 p.

146. Anne M., Nicholas B., Wyatt M., Lindsey M. Polymer Gel Rheology and Adhesion. *Rheology*. 2012. Vol. 23. P. 59-80.

147. Tunick M. H. Small-strain dynamic rheology of food protein networks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. Vol. 59. P. 1481-1486.

148. Lemuel M. D., Tianying L. Absolute viscosities of vegetable oils at different temperatures and shear rate range of 64.5 to 4835 s⁻¹. *Journal of Food Processing*. 2014. Vol. 10. P. 163–168.

149. Rowe R. C., Sadeghnejad G. R. The rheological properties of microcrystalline cellulose powder/water mixes – measurement using a mixer torque rheometer. *Int J Pharm*. 1987. Vol. 38. P. 227–229.

150. Ferreira J. M., Olhero S. M. Influence of particle size distribution on rheology and particle packing of silica-based suspensions. *Powder Technology*. 2003. Vol. 139. P. 69–75.

151. Ruban O. I., Yarnykh T. G. Study of the rheological properties of the vaginal gel with hyaluronic acid. *Topical issues of new drugs development* : Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student, April 20, 2017. Kharkiv : Publishing Office NUPh, 2017. Vol. 1. P. 282.

152. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G. The research of extrication resveratrol by an equilibrium dialysis in the composition of the vaginal gel. *Topical issues of new drugs development : abstracts of XXV international scientific and practical conference of young scientists and student*, April 18-20, 2018. Kharkiv : NUPh, 2018. P. 139–140.

153. Коритнюк Р. С., Загорій Г. В., Тарасенко В. О., Укадіке Ч. Технологічна та фізико-хімічна характеристика гелів. *Фармацевтичний журнал*. 2012. № 3. С. 38–42.

154. Допоміжні речовини в технології ліків: вплив на технологічні, споживчі, економічні характеристики і терапевтичну ефективність : навч. посіб. для студентів вищ. фармацев. навч. закл. / авт.-уклад. : І. М. Перцев та ін. ; за ред. І. М. Перцева. Харків : Золоті сторінки, 2010. 600 с.

155. Іванюк О. І., Ярних Т. Г. Обґрунтування вмісту пропіленгліколю у складі гелю вагінального. *Proceedings of the 3rd International scientific congress of scientists of Europe*. Premier Publishing s.r.o. Vienna, 2019. P. 1067-1069.

156. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G., Hrudko V. O., Kovalevska I. V. Determination of vaginal gel composition on the basis of biopharmaceutical and rheological researches. *Annals of Mechnikov Institute*. 2018. № 4. P. 43–47.

157. Yarnykh T. G., Ivaniuk O. I., Kovalevska I. V., Kukhtenko H. P., Kutsenko S. A. Rheology-based substantiation of a gel-former choice for vaginal gel. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018. Vol. 10 (11). P. 2825-2828.

158. Средства вагинального применения для профилактики и лечения нарушений экосистемы женских урогениталиев / Г. В. Аюпова и др. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2012. Т. 14, № 5 (2). С. 315–319.

159. Jelvehgari M., Rashidi M., Mirza mohammadi S. Adhesive and spreading properties of pharmaceutical gel composed of cellulose polymer. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2007. № 2. P. 45–58.

160. A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms / E. Russo et al. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2016. Vol. 32. P. 113–125.
161. Харенко Е. А., Ларионова Н. И., Демина Н. Б. Мукоадгезивные лекарственные формы (обзор). *Химико-фармацевтический журнал*. 2009. Т. 43, № 7. С. 17–24.
162. Saraswathi B., Balaji A., Umashankar M. S. Polymers in mucoadhesive drug delivery system-latest updates. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013. № 5. P. 423–430.
163. Acartürk F. F. Mucoadhesive vaginal drug delivery systems. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2009. № 3. P. 193–205.
164. Andrade A. Screening of mucoadhesive vaginal gel formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014. № 50. P. 931–941.
165. Mucoadhesive drug delivery systems / R. Shaikh et al. *J Pharm Bioallied Sci*. 2011. № 3. P. 89–100.
166. Mucoadhesive Polymers and Their Mode of Action: A Recent Update / B. Chatterjee et al. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2017. № 7. P. 195–203.
167. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G., Kovalevska I. V. Determination of the bioadhesion indicators of vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid. *EUREKA: Health Sciences*. 2019. Vol. 2. P. 33–39.
168. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G. The choice of mucoadhesive in the composition of vaginal gel. Topical issues of new medicines development : Abstracts of XXVI International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student, Kharkiv, April 10-12, 2019. Kharkiv : NUPh, 2019. P. 113.
169. Клінічний досвід в оптимізації репаративних процесів шийки матки після деструктивних хірургічних втручань / О.А. Таран та ін. *Здоров'я жінки*. 2019. №3. С. 38-42.

170. Walters Y., Roberts M. Dermatologic, cosmeceutic and cosmetic development. Boca Raton : CRC Press, 2008. 644 p.

171. Güven N., Kaynak Onurdağ F. Investigation of antimicrobial and antibiofilm effects of some preservatives used in drugs, cosmetics and food products. *Mikrobiyol Bul.* 2014. Vol. 48, № 1. P. 94–105.

172. Lyapunov N. A., Bezugla E. P., Zinchenko I. A., Lyapunov A. N. Semisolid drugs: pharmaceutical development and technology. *Pharmaceutical industry.* 2014. № 5 (46). P. 22–31.

173. Ivaniuk O. I., Strilets O. P., Yarnykh T. G. Choice of the preservative in the composition of vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid for treatment of urogenital symptoms in the climax period. *Annals of Mechnikov Institute.* 2019. № 3. P. 70–74.

174. Іванюк О. І., Ярних, Т. Г., Стрілець О. П. Визначення антимікробної активності консервантів у складі гелю вагінального. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії* : матеріали IV Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 14-15 листоп. 2019 р. Харків : НФаУ, 2019. С. 97–98.

175. Іванюк О. І., Ярних Т. Г., Стрига О. А., Зайченко Г. В., Ковалевська І. В. Фармацевтична композиція для корекції гіпоестрогенових станів у жінок у формі гелю вагінального : пат. 139105 Україна. № u 201905153 ; заявл. 15.05.2019 ; опубл. 26.12.2019, Бюл. № 24. 4 с.

176. Іванюк О. І., Ханін В. А., Ярних Т. Г. Визначення кількісного вмісту ресвератролу в гелі методом ВЕРХ. *Сучасні аспекти створення екстемпоральних алопатичних, гомеопатичних та косметичних лікарських засобів* : матеріали Міжнар. наук.-практ. дистанційної конф. Харків : НФаУ, 2020. С. 80–81.

177. Зайченко Г. В., Горчакова Н. О., Стрига О. А., Яковлева Н. Ю., Рубан О. І. Аспекти фармакодинаміки та клінічної фармакології гіалуронової кислоти. *Вісник проблем біології і медицини.* 2017. Вип. 1 (135). С. 33–42.

178. Зайченко Г. В., Горчакова Н. О., Стрига О. А., Рубан О. І. Фармакологічне обґрунтування розробки нових лікарських препаратів на основі ресвератролу. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип. 4 (1). С. 21–30.

179. Рубан Е. И., Ярных Т. Г. Использование экстракта брокколи для лечения гинекологических заболеваний. *Медицинская наука: достижения и перспективы* : материалы науч.–практ. конф. молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с междунар. участием, г. Душанбе, 29 апр. 2016. Душанбе, 2016. С. 359–360.

180. Стрига О. А., Зайченко Г. В., Іванюк О. І. Оцінка фармакологічної дії нових вагінальних гелів з ресвератролом та гіалуроновою кислотою за впливом на масу тіла оваріоектомованих щурів. *Planta+*. *Досягнення та перспективи* : матеріали Міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. пам'яті д-ра хім. наук, проф. Ніни Павлівни Максютіної (до 95-річчя від дня народж.), м. Київ, 20-21 лют. 2020 р. Київ : ПАЛИВОДА А.В., 2020. С. 231–232.

181. Гордеева Г. Д., Товстановская В. А., Тер-Тумасова А. Г. Фитоэстрогены и их влияние на здоровье женщины в период климактерия (Обзор литературы). *Здоровье женщины*. 2017. № 10. С. 128–132.

182. Ельчанинов Д. В. Атерогенные нарушения у женщин с климактерическим синдромом в ранний период постменопаузы и их динамика на фоне лечения фитогормонами. *Здоровье женщины*. 2012. № 10. С. 130–132.

183. Зайдиева Я. З. Заместительная гормонотерапия. Фармакология и клиническое применение. Москва, 2001. 50 с.

184. Захурдаева Л. Д. Эстрогены: биологические и фармакологические эффекты. *Мед. аспекты здоровья женщины*. 2010. № 8. С. 41–45.

185. Композиции с антибактериальной и ранозаживляющей активностью : пат. 2611046 Россия. № 2013127673 ; заявл. 04.11.11 ; опубл. 20.02.17.

186. Коротина О. Л., Юпатов Ю. Г., Железняк Н. В., Генералов И. И. Иммуотропное действие ресвератрола, ресвератрол-содержащих растительных экстрактов и этанола. *Актуальные проблемы микробиологии, вирусологии, иммунологии* : материалы юбилейной науч.–практ. конф. к 100-летию со дня рожд. проф. А. П. Красильникова и 95-летию основания каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии БГМУ. Минск, 2018. С. 95-99.

187. Косілова С. Є. Пошук нових методів лікування та профілактики атрофічного вагініту у період постменопаузи. *Здоровье женщины*. 2019. № 1. С. 110–112.

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача

Статті (Scopus / web of science)

1. Yarnykh T. G., Ivaniuk O. I., Kovalevska I. V., Kukhtenko H. P., Kutsenko S. A. Rheology-based substantiation of a gel-former choice for vaginal gel. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018. Vol. 10, № 11. P. 2825-2828. (Особистий внесок: планування та проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих результатів експерименту, підготовка статті).

Статті у фахових виданнях

2. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G., Kovalevska I. V. Determination of the bioadhesion indicators of vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid. *EUREKA: Health Sciences*. 2019. Vol. 2. P. 33-39. (Особистий внесок: планування та виконання експерименту, узагальненні результатів та підготовка статті).

3. Ivaniuk O. I., Strilets O. P., Yarnykh T. G. Choice of the preservative in the composition of vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid for treatment of urogenital symptoms in the climax period. *Annals of Mechnikov Institute*. 2019. № 3. P. 70-74. (Особистий внесок: участь у плануванні та виконанні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

4. Іванюк О. І., Ярних Т. Г., Євтушенко О. М. Огляд ринку препаратів для профілактики та лікування уrogenітальних симптомів у пре- та постменопаузальному періоді. *Соціальна фармація в охороні здоров'я*. 2019. Т.5, № 4. С. 66-78. (Особистий внесок: участь у плануванні та виконанні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

5. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G., Hrudko V. O., Kovalevska I. V. Determination of vaginal gel composition on the basis of biopharmaceutical and rheological researches. *Annals of Mechnikov Institute*. 2018. № 4. P. 43-47. (Особистий внесок: планування та виконання експерименту, узагальнення результатів та підготовка статті).

Продовж. дод. А

6. Зайченко Г. В., Горчакова Н. О., Стрига О. А., Яковлева Н. Ю., Рубан О. І. Аспекти фармакодинаміки та клінічної фармакології гіалуронової кислоти. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип. 1 (135). С. 33-42. *(Особистий внесок: участь в узагальненні результатів та підготовці статті)*.

7. Зайченко Г. В., Горчакова Н. О., Стрига О. А., Рубан О. І. Фармакологічне обґрунтування розробки нових лікарських препаратів на основі ресвератролу. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип. 4 (1). С. 21-30. *(Особистий внесок: участь в узагальненні результатів та підготовці статті)*.

8. Yarnykh T. G., Ivaniuk O. I. Study of the hyaluronic acid solubility for development of the vaginal gel composition. *Укр. біофармац. журн*. 2017. № 6 (53). Р. 19-23. *(Особистий внесок: планування та виконання експерименту, узагальнення результатів та підготовка статті)*.

Патенти:

9. Іванюк О. І., Ярних Т. Г., Стрига О. А., Зайченко Г. В., Ковалевська І. В. Фармацевтична композиція для корекції гіпоестрогенових станів у жінок у формі гелю вагінального : пат. 139105 Україна. №u 201905153; заявл. 15.05.2019; опубл. 26.12.2019, Бюл. № 24. 4 с. *(Особистий внесок: участь у патентному пошуку, плануванні та виконанні експериментальних досліджень, узагальнення результатів, оформлення заявки на патент на корисну модель)*.

Тези доповідей конференцій:

10. Рубан Е. И. Ярных Т. Г. Гиалуроновая кислота и её роль в организме человека. *Перспективы развития биологии, медицины и фармации* : материалы IV Междунар. науч. конф. молодых ученых и студентов, г. Шымкент, 9-10 дек. 2016 г. Шымкент, 2016. С. 28-29.

11. Рубан О. І., Ярних Т. Г. Вивчення розчинності кислоти гіалуронової з метою визначення шляху її введення до складу гелю вагінального. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології* : зб. наук. пр. Харків : НФаУ, 2017. Вип. 2. : Сучасні аспекти створення екстемпоральних

алопатичних, гомеопатичних і косметичних лікарських засобів : матеріали I Міжнар. наук.-практ. конф., 3–4 берез. Харків, 2017 р. С. 172-174.

12. Ruban O. I., Yarnykh T. G. Study of the rheological properties of the vaginal gel with hyaluronic acid. *Topical issues of new drugs development : Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student*, April 20, 2017. Kharkiv : Publishing Office NUPh, 2017. Vol. 1. P. 282.

13. Іванюк О. І., Ярних Т. Г. Вивчення розчинності ресвератролу для вибору технології введення до складу гелю вагінального. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії* : матеріали III Міжнар. наук.–практ. інтернет-конф., м. Харків, 14-15 листоп. 2017 р. Харків : НФаУ, 2017. С 94.

14. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G. The research of extrication resveratrol by an equilibrium dialysis in the composition of the vaginal gel. *Topical issues of new drugs development : abstracts of XXV international scientific and practical conference of young scientists and student*, April 18-20, 2018. Kharkiv : NUPh, 2018. P. 139-140.

15. Іванюк О. І., Ярних Т. Г. Обґрунтування вмісту пропіленгліколю у складі гелю вагінального. *Proceedings of the 3rd International scientific congress of scientists of Europe*. Premier Publishing s.r.o. Vienna, 2019. P. 1067-1069.

16. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G. The choice of mucoadhesive in the composition of vaginal gel. *Topical issues of new medicines development : Abstracts of XXVI International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student*, Kharkiv, April 10-12, 2019. Kharkiv : NUPh, 2019. P. 113.

17. Іванюк О. І., Ярних Т. Г., Стрілець О. П. Вивчення антимікробної активності консервантів у складі гелю вагінального. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії* : матеріали IV Міжнар. наук.–практ. інтернет-конф., м. Харків, 14-15 листоп. 2019 р. Харків: НФаУ. 2019. С. 97-98.

18. Стрига О. А., Зайченко Г. В., Іванюк О. І. Оцінка фармакологічної дії нових вагінальних гелів з ресвератролом та гіалуроновою кислотою за впливом

Продовж. дод. А

на масу тіла оваріоектомованих щурів. *Planta+*. *Досягнення та перспективи* : матеріали Міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. пам'яті д-ра хім. наук, проф. Ніни Павлівни Масютіної (до 95-річчя від дня народж.), м. Київ, 20-21 лют. 2020 р. Київ : ПАЛИВОДА А.В., 2020. С. 231-232.

19. Іванюк О. І., Ханін В. А., Ярних Т. Г. Визначення кількісного вмісту ресвератролу в гелі методом ВЕРХ. *Сучасні аспекти створення екстемпоральних алопатичних, гомеопатичних та косметичних лікарських засобів* : матеріали Міжнар. наук.-практ. дистанційної конф. м. Харків, 20 бер. 2020 р. Харків : НФаУ, 2020. С. 80-81.

Інформаційні листи:

20. Ярних Т. Г., Іванюк О. І. Розробка технології вагінального гелю з ресвератролом та кислотою гіалуроновою : інформ. лист № 255-2019. Київ, 2019. 4 с. (Протокол ПК «Фармація» № 106 від 26.03.2019 р.).

Апробація результатів дисертації

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

1. IV Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (Шимкент, 2016 р.);

2. I Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні аспекти створення екстемпоральних алопатичних, гомеопатичних і косметичних лікарських засобів» (Харків, 2017 р.);

3. XXIV International scientific and practical conference of young scientists and student «Topical issues of new drugs development» (Харків, 2017 р.);

4. XXV International scientific and practical conference of young scientists and student «Topical issues of new drugs development» (Харків, 2018 р.);

5. III Internstional scientific congress of scientists of Europe «Premier Publishing s.r.o» (Відень, 2019);

6. XXVI International scientific and practical conference of young scientists and student «Topical issues of new medicines development» (Харків, 2019 р.);

7. Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (Харків, 2019 р.);

8. Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій пам'яті доктора хімічних наук, професора Ніни Павлівни Масютіної (до 95-річчя від дня народження) «Planta+. Досягнення та перспективи» (Київ, 2020 р.);

9. Міжнародній науково-практичній дистанційній конференції «Сучасні аспекти створення екстемпоральних алопатичних, гомеопатичних та косметичних лікарських засобів» (Харків, 2020 р.).

Додаток Б



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **139105** (13) **U**

(51) МПК (2019.01)

A61K 9/00**A61K 31/00****A61K 31/728** (2006.01)**A61P 5/30** (2006.01)**A61P 15/02** (2006.01)**A61P 15/12** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2019 05153**
 (22) Дата подання заявки: **15.05.2019**
 (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **26.12.2019**
 (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **26.12.2019, Бюл.№ 24**

(72) Винахідник(и):
Іванюк Олена Ігорівна (UA),
Ярних Тетяна Григорівна (UA),
Стрига Олена Анатоліївна (UA),
Зайченко Ганна Володимирівна (UA),
Ковалевська Інна В'ячеславівна (UA)
 (73) Власник(и):
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ,
 вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ ГІПОЕСТРОГЕНОВИХ СТАНІВ У ЖІНОК У ФОРМІ ГЕЛЮ ВАГІНАЛЬНОГО

(57) Реферат:

Фармацевтична композиція для корекції гіпоестрогенових станів у жінок у формі гелю вагінального містить активні фармацевтичні інгредієнти (АФІ) природного та синтетичного походження, гелеву основу. Як АФІ використовують ресвератрол та кислоту гіалуонову.

UA 139105 U

Додаток В

ПАТ ХФЗ «ЧЕРВОНА ЗІРКА»

«УЗГОДЖЕНО»

Голова Державної
Служби України з лікарських засобів

Наказ державної служби

Від «__» _____ 20 __ р.

№ _____

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор
ПАТ ХФЗ «Червона зірка»

Трутаєв І.В.

04 листопада 2010 р.

ТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПРОМИСЛОВИЙ РЕГЛАМЕНТ

на виробництво «Вагітрол»,

гелю вагінального з ресвератролом та кислотою гіалуроновою для лікування
гіпоестрогенових станів
в полімерних контейнерах по 5 мл № 10 в пачках

ТПР

(Чинний разом з ДВД)

Термін дії до «__» _____ 20 __ р.

УЗГОДЖЕНО

Проректор з науково-педагогічної
роботи Національного
фармацевтичного університету

проф. Загайко А. Л.

05.02.2010 р. 20 __ р.



Регламент є власністю ПАТ ХФЗ «Червона зірка» і не може бути повністю або частково відтворений, поширений без дозволу ПАТ ХФЗ «Червона зірка»

Додаток Г

«ЗАТВЕРДЖЕНО»

ПАТ ХФЗ «Червона зірка», Україна

_____ І.В. Трутаєв

«05» _____ 20 10 р.



АКТ

АПРОБАЦІЇ ТЕХНОЛОГІЇ

В УМОВАХ ПРОМИСЛОВОГО ВИРОБНИЦТВА

Даний акт складено в тому, що в умовах ПАТ ХФЗ «Червона зірка», Україна (м. Харків) було опрацьовано технологію виробництва гелю вагінального з ресвератролом та кислотою гіалуроновою для лікування гіпоестрогенових станів під умовною назвою «Вагітрол» та перевірено відтворюваність параметрів технологічного регламенту на виробництво препарату.

Директор з виробництва
ПАТ ХФЗ «Червона зірка»

_____ Г.О. Кропивка

Аспірант НФаУ

_____ О.І. Іванюк

Додаток Д**ЗАТВЕРДЖУЮ**

Наказ Міністерства охорони
здоров'я України

№ _____

Реєстраційне посвідчення

№ _____

Заявник: ПАТ ХФЗ «Червона зірка», Україна

Виробник: ПАТ ХФЗ «Червона зірка», Україна

МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

(проект)

VAGITROL

ВАГІТРОЛ

гель вагінальний з ресвератролом та кислотою гіалуроновою для лікування
гіпоестрогенових станів
в полімерних контейнерах по 5 мл № 10 в пачках

Продовж. дод. Д

УПАКОВКА

По 10 полімерних контейнерів разом з інструкцією для медичного застосування із паперу етикеткового за ГОСТ 7625-86 поміщають у пачку з картону хромерзац за ГОСТ 1301-81 або 12303-80.

Групова і транспортна тара відповідно до ГОСТ 12301-2006.

МАРКУВАННЯ

На упаковці українською мовою вказують: «Україна», ПАТ ХФЗ «Червона зірка», товарний знак, назву препарату (додатково англійською мовою), кількість контейнерів в упаковці, номер реєстраційного посвідчення, номер серії, термін придатності.

На пачках та етикетках групової тари українською мовою вказують: «Україна», ПАТ ХФЗ «Червона зірка», товарний знак та адресу виробника, назву препарату (додатково англійською мовою), кількість контейнерів в упаковці, вміст діючих речовин в одному контейнері в міліграмах, «Застосовувати за призначенням лікаря», умови зберігання, номер реєстраційного посвідчення, номер серії, термін придатності, штриховий код.

Додатково на пачці вказують: перелік допоміжних речовин, «Зберігати в недоступному для дітей місці», «не застосовувати після закінчення терміну придатності», умови відпуску – «Без рецепта».

Транспортне маркування відповідно до ГОСТ 14192-96, ДСТУ ISO 780-2001.

ЗБЕРІГАННЯ

В сухому, захищеному від світла місці при температурі 15-25°C.

ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

2 роки.

Директор

ПАТ ХФЗ «Червона зірка»



І. В. Трутаєв

І. В. Трутаєв 20 *но* р.

Додаток Е

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Директор Інституту підвищення
кваліфікації спеціалістів фармації НФаУ

Лариса ГАЛІЙ

20 10 р.

М.П.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Наукове та експериментальне обґрунтування створення м'якого вагінального лікарського засобу з екстрактом ресвератролу та кислотою гіалуроною

(назва пропозиції для впровадження)

2. Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.
Автори: асп. Іванюк О.І., д. фарм. н., проф. Ярних Т.Г.

(установа-розробник, адреса, П.І.Б. авторів)

3. Джерела інформації:

1. Yarnykh T. G., Ivaniuk O. I., Kovalevska I. V., Kukhtenko H. P., Kutsenko S. A. Rheology-based substantiation of a gel-former choice for vaginal gel. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2018. Vol. 10, № 11. P. 2825-2828. (Scopus)
2. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G., Kovalevska I. V. Determination of the bioadhesion indicators of vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid. EUREKA: Health Sciences. 2019. Vol. 2. P. 33-39.
3. Yarnykh T. G., Ivaniuk O. I. Study of the hyaluronic acid solubility for development of the vaginal gel composition. Укр. біофармац. журн. 2017. № 6 (53). P. 19-23.
4. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G., Hrudko V. O., Kovalevska I. V. Determination of vaginal gel composition on the basis of biopharmaceutical and rheological researches. Annals of Mechnikov Institute. 2018. № 4. P. 43-47.

(назва, рік видання, вихідні дані тощо)

4. Рекомендовано впровадити до використання у навчальному процесі кафедри загальної фармації та безпеки ліків інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації.

5. Термін впровадження: з січня 2021 р.

6. Ефективність впровадження відповідно до критеріїв, що викладені в джерелах інформації: Результати дослідження технології виготовлення м'яких лікарських форм, що наведені у вищевказаних джерелах, впроваджені до навчального процесу курсу «Фармацевтична технологія» для провізорів-інтернів.

7. Зауваження, пропозиції: немає.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри загальної фармації
та безпеки ліків ІПКСФ НФаУ
д. фарм. н., проф.

Людмила ШУЛЬГА

Продовж. дод. Е

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з науково-педагогічної роботи
Національного фармацевтичного університету
д. фарм. н., проф. Володимирова І. М.
« 8 » вересня 2019 року



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Наукове та експериментальне обґрунтування створення м'якого вагінального лікарського засобу з екстрактом ресвератролу та кислотою гіалуроною.
(назва пропозиції для впровадження)
2. Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. Автори: асп. Іванюк О.І., д. фарм. н., проф. Ярних Т.Г.
(установа-розробник, адреса, П.І.Б. авторів)
3. Джерело інформації.
 1. Yarnykh T. G., Ivaniuk O. I., Kovalevska I. V., Kukhtenko H. P., Kutsenko S. A. Rheology-based substantiation of a gel-former choice for vaginal gel. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018. Vol. 10, № 11. P. 2825-2828. (Scopus)
 2. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G., Kovalevska I. V. Determination of the bioadhesion indicators of vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid. *EUREKA: Health Sciences*. 2019. Vol. 2. P. 33-39.
 3. Yarnykh T. G., Ivaniuk O. I. Study of the hyaluronic acid solubility for development of the vaginal gel composition. *Укр. біофармац. журн*. 2017. № 6 (53). P. 19-23.
 4. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G., Hrudko V. O., Kovalevska I. V. Determination of vaginal gel composition on the basis of biopharmaceutical and rheological researches. *Annals of Mechnikov Institute*. 2018. № 4. P. 43-47
(назва, рік видання, вихідні дані тощо)
4. Рекомендовано впровадити до використання у навчальному процесі кафедри аптечної технології ліків Національного фармацевтичного університету.
5. Термін впровадження: _____ 20__ року
6. Ефективність впровадження відповідно до критеріїв, що викладені в джерелі інформації: Результати дослідження технології виготовлення м'яких лікарських форм, що наведені у вищевказаних джерелах, впроваджені до навчального процесу курсу технології ліків
7. Зауваження, пропозиції. Немає.

Зав. кафедри аптечної технології ліків
д.фарм.н., проф.

 Л.І. Вишневська

Продовж. дод. Е

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор
з науково-педагогічної роботи
Львівського національного
медичного університету
імені Данила Галицького
чл. кор. НАМН України М.Р.Тжегоцький

«26» 02 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: Наукове та експериментальне обґрунтування створення м'якого вагінального лікарського засобу з екстрактом ресвератролу та кислотою гіалуроною.

2. Установа, її адреса, виконавці: Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. Виконавці: асп. Іванюк О.І., д. фарм. н., проф. Ярних Т.Г.

3. Джерела інформації:

3.1. Yarnykh T., Ivaniuk O. Study of the hyaluronic acid solubility for development of the vaginal gel composition // Ukraïns'kij biofarmaceutičnij žurnal. 2017. № 6(53). P. 19-23.

3.2. Determination of vaginal gel composition on the basis of biopharmaceutical and rheological researches / O.I. Ivaniuk, T.G. Yarnykh, V.O. Hrudko, I.V. Kovalevska // Annals of Mechnikov Institute. 2018. № 4. P. 43-47.

3.3. Ivaniuk O.I., Strilets O.P., Yarnykh T.G. Choice of the preservative in the composition of vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid for treatment of urogenital symptoms in the climax period // Annals of Mechnikov Institute. 2019. № 3. P. 70-74.

4. Впроваджено: в навчальний процес на кафедрі технології ліків і біофармації Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, у лекційний курс при вивченні теми «М'які лікарські засоби».

5. Термін впровадження: з 9.01. 2020 р.

6. Ефективність впровадження:

Показники	За даними	
	розробників	установи, що впроваджує
Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним в джерелі інформації. Результати наукових досліджень включено у навчальний процес кафедри.		

Відповідальні за впровадження:

Доцент кафедри технології ліків і біофармації
ЛНМУ імені Данила Галицького



К.Ф. Ващенко

Завідувач кафедри технології ліків і біофармації
ЛНМУ імені Данила Галицького, доцент



С.Б. Білоус

Продовж. дод. Е

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи та інновацій
НМУ імені О.О. Богомольця,
професор Земсков С.В.

« 25 »

2024 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Наукове та експериментальне обґрунтування створення вагінального лікарського засобу з екстрактом ресвератролу та кислотою гіалуроновою.

2. **Установа, її адреса, виконавці:** Національний фармацевтичний університет, 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. Виконавці: асп. Іванюк О.І., д. фарм. н., проф. Ярних Т.Г.

3. **Джерела інформації:**

3.1. Yarnykh T., Ivaniuk O. Study of the hyaluronic acid solubility for development of the vaginal gel composition // *Ukrains'kij biofarmaceutichnij zhurnal*. 2017. № 6(53). P. 19-23.

3.2. Ivaniuk O.I. Determination of vaginal gel composition on the basis of biopharmaceutical and rheological researches /O.I. Ivaniuk, T.G. Yarnykh, V.O. Hrudko, I.V. Kovalevska // *Annals of Mechnikov Institute*. 2018. № 4. P. 43-47.

3.3. Ivaniuk O.I., Strilets O.P., Yarnykh T.G. Choice of the preservative in the composition of vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid for treatment of urogenital symptoms in the climax period // *Annals of Mechnikov Institute*. 2019. № 3. P. 70-74.

3.4. Ivaniuk O. I., Yarnykh T. G., Hrudko V. O., Kovalevska I. V. Determination of vaginal gel composition on the basis of biopharmaceutical and rheological researches. *Annals of Mechnikov Institute*. 2018. № 4. P. 43-47.

4. **Ким і коли впроваджено:**

Кафедра аптечної та промислової технології ліків Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

5. **Впроваджено:**

У навчальний процес кафедри аптечної та промислової технології ліків при вивченні теми з промислової технології лікарських засобів: «М'які лікарські засоби» згідно протоколу № 6 засідання кафедри від «19» жовтня 2020 р. Термін впровадження: 2020 рік.

6. **Ефективність впровадження:**

Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним у джерелах інформації. Результати наукових досліджень включено у навчальний процес кафедри.

Завідувачка кафедри аптечної та промислової
технології ліків,
д.фарм.н., професор

Ж.М. Полова

Відповідальний за навчально-методичну роботу
кафедри аптечної та промислової
технології ліків, к.фарм.н.

О.М. Глущенко

Відповідальний за впровадження, к.фарм.н.

Н.О. Козіко

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з науково-педагогічної
роботи Запорізького державного
медичного університету,
доктор медичних наук, професор

В. А. Візір

2020 року

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. Найменування пропозиції для впровадження: Наукове та експериментальне обґрунтування створення м'якого вагінального лікарського засобу з екстрактом ресвератролу та кислотою гіалуроною.

2. Установа, її адреса, виконавці: Національний фармацевтичний університет, м. Харків. Автори: асп. Іванюк О.І., д. фарм. н., проф. Ярних Т.Г.

3. Джерела інформації:

3.1. Yarnykh T. G., Ivaniuk O. I. Study of the hyaluronic acid solubility for development of the vaginal gel composition. Укр. біофармац. журн. 2017. № 6 (53). Р. 19-23.

3.2. Ivaniuk O.I. Determination of vaginal gel composition on the basis of biopharmaceutical and rheological researches /O.I. Ivaniuk, T.G. Yarnykh, V.O. Hrudko, I.V. Kovalevska // Annals of Mechnikov Institute. 2018. № 4. Р. 43-47.

3.3. Ivaniuk O.I., Yarnykh T.G., Kovalevska I.V. Determination of the bioadhesion indicators of vaginal gel with resveratrol and hyaluronic acid. EUREKA: Health Sciences. 2019. Vol. 2. Р. 33-39.

Впроваджено: У навчальний процес кафедри технології ліків при вивченні теми з промислової технології лікарських засобів «Виробництво м'яких лікарських засобів» згідно протоколу № 6 засідання кафедри від 03 08 2020 р.

Термін впровадження: вересень 2020

Ефективність впровадження: Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведеним у джерелах інформації. Результати наукових досліджень включено у навчально-педагогічний процес кафедри технології ліків.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри технології ліків,
доктор фармацевтичних наук,
професор

В. В. Гладішев