

Міністерство охорони здоров'я України  
Запорізький державний медичний університет

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

БУРЛАКА БОГДАН СЕРГІЙОВИЧ

УДК 615.31:615.21'451]-047.37

## ДИСЕРТАЦІЯ

### ТЕОРЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ СКЛАДУ І ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ІНТРАНАЗАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТИВНОЇ ДІЇ

15.00.01 – технологія ліків, організація фармацевтичної справи  
та судова фармація  
22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело  
\_\_\_\_\_ Б. С. Бурлака

Науковий консультант Беленічев Ігор Федорович, доктор біологічних наук,  
професор

Запоріжжя – 2021

## АНОТАЦІЯ

*Бурлака Б. С.* Теоретичне обґрунтування складу і експериментальні дослідження інтраназальних лікарських форм церебропротективної дії. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.01 – технологія ліків, організація фармацевтичної справи та судова фармація (226 – Фармація). – Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2021.

Дисертація присвячена вирішенню актуальної проблеми фармації – розробці інтраназальних лікарських форм церебропротективної дії, в якій запропоновано теоретичну концепцію комплексного методологічного підходу з використанням інформаційної технології, на базі якої створені рідкі гелі з активними фармацевтичними інгредієнтами пептидної природи – етиловим естером N-фенілацетил-1-пролілгліцину (Ноопепт) та IL-1Ra (РАІЛ) і, в результаті доклінічних досліджень, показано їх висока специфічну (ноотропну, протишемічну, нейропротективну) активність та безпечність, обґрунтовано їх застосування в терапії захворювань мозку дегенеративного та судинного генезу.

Проаналізовано та систематизовано літературні дані щодо патогенетичних механізмів виникнення порушення мозкового кровообігу та сучасних напрямків лікування церебральної ішемії. Охарактеризовано використання назального шляху введення лікарських засобів для місцевого та системного застосування, а також видів асортименту упаковки назальних лікарських форм.

Проведено маркетингове дослідження вітчизняного ринку інтраназальних лікарських засобів для місцевого і системного застосування. Встановлено, що станом на початок 2016 р., серед зареєстрованих інтраназальних препаратів переважна більшість – 94,7% препарати для місцевого застосування. Частка

системних інтраназальних засобів становить тільки 5,3%. Аналізом конкурентоспроможності показано, що найбільша конкуренція спостерігається у інтраназальних місцевих засобів та практично відсутня конкуренція у інтраназальних системних. Розраховані коефіцієнти доступності по групам лікарських засобів N06BX свідчать про низьку доступність препаратів, що зумовлює необхідність у створенні нових вітчизняних лікарських засобів для забезпечення населення ефективними та доступними ліками.

Розроблено теоретичні основи для нової інформаційної технології, а саме комплексна методологія підходу створення інтраназальних рідких гелів з активнопдіючими сполуками пептидної природи з покращеними церебропротективними властивостями та високим рівнем безпечності при системному застосуванні.

Створено нову інформаційну технологію для *in silico* обґрунтування раціональних складів інтраназальних лікарських форм церебропротективної дії та розроблено експертну систему «ExpSys Nasalia», застосування яких дозволило спрогнозувати склад розроблених назальних рідких гелів та встановити фактори, які впливають на нейродоступність. Встановлено, що на етапі фармацевтичної розробки з метою оптимізації рецептури нових назальних засобів та ресурсозбереження активних фармацевтичних інгредієнтів і допоміжних речовин доцільно використовувати *in silico* прогнозування проникності діючих речовин через гематоенцефалічний бар'єр, а також застосовувати *in silico* прогнозування відсутності фармацевтичної несумісності інгредієнтів.

На підставі *in silico* прогнозування складу та комплексних фізико-хімічних, фармакотехнологічних та біофармацевтичних досліджень теоретично та експериментально опрацьована розробка назального препарату церебропротективної дії на прикладі низькомолекулярного пептиду – активного фармацевтичного інгредієнту етилового естеру N-фенілацетил-1-пролілгліцину. Встановлено, що від мукоадгезивних полімерів гідрофільних основ, спирти для зволоження, енхансер адсорбції значимо впливають на вивільнення

етилового естеру N-фенілацетил-1-пролілгліцину з гелевих назальних форм. Теоретичними, *in silico*, та експериментальними термогравіметричними дослідженнями встановлено, що розроблена назальна форма з N-фенілацетил-1-пролілгліцином є механічною сумішшю діючої та допоміжних речовин, інгредієнти якої не взаємодіють між собою. Термогравіметричні характеристики інгредієнтів розробленої назальної лікарської форми з N-фенілацетил-1-пролілгліцином, свідчать, що технологічний процес виготовлення доцільно проводити з урахуванням термолабільних сполук, а саме консервант доцільно вводити при температурі не вище 40 °С.

Результати фармацевтичної розробки опрацьованого інтраназального засобу з етиловим естером N-фенілацетил-1-пролілгліцину викладено в інформаційному листі Укрмедпатентінформ МОЗ України з проблеми «Фармація» «Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір N-фенілацетил-1-пролілгліцину в умовах аптеки» та апробовано в умовах екстемпорального виробництва низки аптечних закладів.

За допомогою *in silico* прогнозування складу та комплексних фізико-хімічних, фармакотехнологічних та біофармацевтичних досліджень теоретично та експериментально опрацьовано розробку назального препарату церебропротективної дії на прикладі високомолекулярного пептиду – IL-1Ra. В результаті досліджень виявлено, що оптимальне вивільнення IL-1Ra з назальних композицій, забезпечують допоміжні речовини – гідрофільний мукоадгезивний компонент натрій карбоксиметилцелюлоза з додаванням спирту-зволожувача D-пантенолу. З метою стабілізації інтраназального рідкого гелю до складу рецептури доцільно додавати фосфатний буферний розчин та трилон Б.

Теоретичними *in silico* та експериментальними термогравіметричними дослідженнями встановлено, що розроблена назальна форма з IL-1Ra є механічною сумішшю діючої та допоміжних речовин, інгредієнти якої не взаємодіють між собою та можуть поєднуватись в одній лікарській формі. Враховуючи термогравіметричні характеристики інгредієнтів назальної

лікарської форми з ІІ-1Ra, виявлено, що технологічний процес виготовлення доцільно проводити з урахуванням термолабільних сполук, а саме консервант доцільно вводити при температурі не вище 40 °С, а потім при охолодженні до 20 °С додавати ІІ-1Ra.

Технологію розробленого рідкого назального гелю з ІІ-1Ra враховано в технологічних схемах виготовлення та апробовано в умовах промислового виробництва ТОВ «Мобіль Медікал» (м. Київ). Опрацьовані контрольні точки технологічного процесу дозволяють виготовляти лікарський засіб з прогнозованою якістю відповідно до рекомендацій ІСНQ8.

Проаналізований асортимент упаковок та характер природи рідких назальних мукоадгезивних гелів, спонукав до розробки нового пристрою – назальної насадки стерильної для одноразового застосування, для доставки мукоадгезивних рідких назальних гелів в носову порожнину. Розроблено конструкторську документацію на назальну одноразову насадку за допомогою засобу автоматизованого проектування, яка містить креслення складових частин виробу, а також інших даних необхідних для його виготовлення та контролю. Отримано лабораторний зразок спроектованої назальної одноразової насадки на принтері тривимірного друку, що дозволило підтвердити можливість збирання деталей назальної насадки, зовнішню герметичність пристрою, герметичність конусного з'єднання при введенні дослідних назальних гелів з одноразових шприців типу Луер. На отриману назальну насадку для одноразового застосування розроблено нормативно-технічну документацію у вигляді технічних умов з метою виготовлення готового виробу в умовах промислового виробництва.

Проведеними токсикологічними дослідженнями встановлено, що розроблені за допомогою нової інформаційної технології інтраназальні форми з етиловим естером N-фенілацетіл-1-пролілгліцину (Ноопепт) та ІІ-1Ra (РАІЛ) при інтраназальному введенні в максимально допустимому об'ємі відносяться до VI класу токсичності (відносно нешкідливі речовини) і не проявляють місцево-подразнюючої і алергізуючої дії.

Вивчення загальнотоксичної дії розроблених рідких гелів з IL-1Ra і ноопептом (інтраназально протягом 90-днів в максимально допустимому об'ємі, 0,4 мл) показало, що зазначені лікарські форми не мають негативного впливу на інтегральні показники експериментальних тварин (маса тіла, температура, рухова і дослідницька активність, тривожність), на серцево-судинну систему, на показники периферичної крові (кількість еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів, швидкість осідання еритроцитів, вміст гемоглобіну, резистентність еритроцитів), на показники функції нирок і печінки і не викликають токсичних змін гістоструктури внутрішніх органів (мозок, печінка, легені, шлунок, селезінка, наднирники, сім'яники) експериментальних тварин.

Дослідження специфічної активності розробленого гелю з ноопептом (10 мг/кг) на моделі з експериментальним алергічним енцефамієлітом у щурів виявило зниження тривожності, підсилення медикаментозного сну, активізацію орієнтовно-дослідницької активності, зменшувало ступінь неврологічних порушень і покращувало пам'ять експериментальних тварин, а також приводило до підвищення щільності нейронів на 19%, збільшення в них концентрації РНК на 21% і зниження частки апоптичних нейронів на 44,6%, а також підвищення HSP<sub>70</sub> на 50% і 64% відповідно в мітохондріях та цитозолі нейронів головного мозку. Введення розробленого гелю з ноопептом (10 мг/кг) щурам після загальної анестезії достовірно зменшувало кетамін-індуковані когнітивно-мнестичні порушення – зниження тривожності, страху та збудливості і зменшення помилок робочої (в 6,5 раз) і референтної (в 3 рази) пам'яті.

Курсове інтраназальне введення гелю PAІЛ (1 мг/кг) щурам після двосторонньої перев'язки загальних сонних артерій призводило до нормалізації тіол-дисульфідної системи головного мозку – підвищення на 100% рівня глутатіону відновленого, активності ГР на 96,1%, ГПР на 68,1%, а GST на 137,7% на фоні зниження рівня нітротирозину в цитозольних фракціях головного мозку і підвищення концентрації HSP<sub>70</sub> в цитоплазмі і мітохондріях

головного мозку на 98,4% і на 142,8% відповідно, в порівнянні з показниками контролю на 18 добу експерименту.

Розроблений гель РАІЛ знижував важку неврологічну симптоматику (на 20% на 4 добу та на 30% на 18 добу), летальність на 30% і зменшував когнітивно-мнестичні порушення у експериментальних тварин на 18 добу після оклюзії сонних артерій.

Створений гель РАІЛ приводив до нормалізації нітродергічної системи головного мозку – зниження активності NOS нітритів, ніротирозину, а також до зниження експресії іNOS в цитоплазмі, мітохондріях головного мозку на 47,7% і на 52,9%, відповідно, і експресії мРНК іNOS в СА1 гіпокампі на 94,3% в порівнянні з групою контролю на 4-у добу після оклюзії сонних артерій.

РАІЛ приводив до нормалізації тіол-дисульфідної системи головного мозку – підвищення рівня відновлених тіольних на 216% і зниження окиснених форм на 68%, підвищення в 2,6 раз відновленого глутатіону і HSP<sub>70</sub>, активності ГР, ГПР, GST на фоні зниження рівня гомоцистеїну і ніротирозину в цитоплазмі головного мозку тварин на 4-у добу після оклюзії сонних артерій.

Уведення інтраназально розробленого гелю РАІЛ щурам з двосторонньою перяв'язкою загальних сонних артерій призводило до покращення енергетичного обміну головного мозку – підвищення рівня АТФ на 60%, малату на 32% на фоні зниження лактату на 42% і нормалізації функції мітохондрій (зниження швидкості відкриття пори на 70% і підвищення потенціалу мембрани на 138%) на 4-у добу експерименту.

Уведення інтраназального гелю РАІЛ (1 мг/кг), щурам після загальної анестезії, достовірно зменшувало кетамін-індукований нейроапоптоз – знижувало експресію c-fos і підвищувало концентрацію антиапоптичного білку bcl-2.

Розроблені інтраназальні рідкі гелі ноопепту і РАІЛ за основними показниками церебропротективної дії достовірно перевершували референс-препарати Цереброкурин, Цитиколін і Пірацетам.

*Ключові слова:* експертна система, інтраназальні лікарські форми, технологія виготовлення, склад, гель, допоміжні речовини, специфікація.

## ANNOTATION

*Burlaka B. S.* Theoretical substantiation of the composition and experimental studies of intranasal dosage forms with cerebroprotective effect. – Qualifying scientific work on the rights of manuscript.

Thesis for the scientific degree of a Doctor of Pharmacy: Specialty 15.00.01 Technology of Drugs, Pharmaceutical Business Organization and Forensic Pharmacy (226 – Pharmacy). – Zaporizhzhia State Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhzhia, 2021.

The dissertation is devoted to finding a solution to the urgent problem of pharmacy –development of intranasal dosage forms with cerebroprotective effect. The thesis suggests a theoretical concept of the complex methodological approach with the use of information technology, based on which liquid gels with active pharmaceutical ingredients of peptide nature – N-Phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester (Noopept) and IL-1Ra (RAIL) – have been created. As a result of preclinical studies, their high specific (nootropic, antiischemic, neuroprotective) activity and safety have been shown, as well as their use in the therapy of brain diseases of degenerative and vascular origin has been substantiated.

Literature data on pathogenetic mechanisms of cerebrovascular disorders and modern directions of treatment of cerebral ischemia have been analyzed and systematized. The use of the nasal route of administration of drugs for local and systemic use, as well as the types of packaging range of nasal dosage forms, have been characterized. A marketing study of the domestic market of intranasal drugs for local and systemic use has been conducted. It has been established that at the beginning of 2016 the vast majority of registered intranasal drugs – 94.7% – were drugs for topical use. The share of systemic intranasal drugs was only 5.3%. Competitiveness analysis has shown that the greatest competition is observed in



intranasal topical drugs while a competition in intranasal systemic drugs is practically absent. The calculated availability coefficients, by groups of drugs N06BX, indicate the low availability of drugs, which necessitates the creation of new domestic medications to provide the population with effective and affordable drugs.

Theoretical basis for the new information technology has been developed, namely the complex methodological approach to creation of the intranasal liquid gels with active compounds of peptide nature demonstrating improved cerebroprotective properties and a high level of safety for systemic use. The new information technology for *in silico* substantiation of rational compositions of the intranasal dosage forms with cerebroprotective effect and the expert system «ExpSys Nasalia» have been designed, the application of which allowed to predict the composition of the developed nasal liquid gels and to establish factors influencing neuroavailability. It has been found that at the stage of pharmaceutical development, in order to optimize the formulation of the new nasal drugs and resource conservation of active pharmaceutical ingredients and excipients, it is advisable to use *in silico* prediction of permeability of active substances through the blood-brain barrier and the absence of pharmaceutical incompatibility of ingredients.

Based on *in silico* prediction of the composition and complex physicochemical, pharmacotechnological and biopharmaceutical studies, the development of a nasal drug with cerebroprotective effect on the example of low molecular weight peptide – active pharmaceutical ingredient N-Phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester – has been theoretically and experimentally investigated. It has been found that the type of mucoadhesive polymers of hydrophilic bases, alcohols for moistening, adsorption enhancer significantly affect the release of N-Phenylacetyl-L-prolylglycine from nasal gel forms. Theoretical *in silico* and experimental thermogravimetric studies have shown that the developed nasal form with N-Phenylacetyl-L-prolylglycine is a mechanical mixture of active substance and excipients, the ingredients of which do not interact with each other. Thermogravimetric characteristics of the ingredients of the developed nasal dosage form with N-Phenylacetyl-L-prolylglycine indicate that the manufacturing process should be carried out taking into account thermolabile

compounds, namely the preservative should be administered at a temperature not exceeding 40 °C.

The results of pharmaceutical development of the intranasal drug with N-Phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester are presented in the information letter of Ukrmedpatentinform of the Ministry of Health of Ukraine on the issue of «Pharmacy» «Manufacturing of an intranasal gel with active substance N-Phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester in pharmacy conditions» and tested in the conditions of extemporaneous preparation in a number of drugstores.

With the help of *in silico* composition prediction and complex physicochemical, pharmacotechnological and biopharmaceutical research, the development of a cerebroprotective nasal dosage form on the example of a high molecular weight peptide – IL-1Ra – has been theoretically and experimentally investigated. As a result of the research, it has been found that the optimal release of IL-1Ra from nasal compositions is provided by excipients – hydrophilic mucoadhesive component sodium carboxymethylcellulose with the addition of humectant alcohol D-panthenol. In order to stabilize the intranasal liquid gel, it is advisable to add phosphate buffer solution and Trilon B to the formulation.

Theoretical *in silico* and experimental thermogravimetric studies have shown that the developed nasal form with IL-1Ra is a mechanical mixture of active ingredient and excipients, the ingredients of which do not interact with each other and can be combined in one dosage form. Given the thermogravimetric characteristics of the ingredients of the nasal dosage form with IL-1Ra, it has been found that the manufacturing process should be carried out taking into account thermolabile compounds, namely, the preservative should be administered at a temperature not exceeding 40 °C, with addition of the IL-1Ra when cooled to 20 °C.

The technology of the developed liquid nasal gel with IL-1Ra has been taken into account in the technological schemes of manufacturing and has been tested in the conditions of industrial production of «Mobile Medical» Ltd. (Kyiv). The developed control points of the technological process allow to manufacture a drug with the predicted quality in accordance with the recommendations of ICHQ8.

The analyses of the range of packages and the nature of liquid nasal mucoadhesive gels have prompted the development of a new device – a sterile disposable nasal nozzle for delivery of mucoadhesive liquid nasal gels into the nasal cavity. Design documentation for a disposable nasal nozzle using automated design tool has been developed, which contains drawings of the components of the product, as well as other data necessary for its manufacture and control. A laboratory sample of the nasal nozzle has been obtained with the help of a three-dimensional modeling, which allowed to confirm the possibility of assembling the parts of the nasal nozzle, the external tightness of the device, the tightness of the conical connection with the administration of the experimental nasal gels using disposable Luer lock syringes. For the disposable nasal nozzle the regulatory and technical documentation has been developed in the form of technical conditions for the purpose of manufacturing the finished product in the conditions of industrial production.

Toxicological studies have shown that the intranasal forms containing N-Phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester (Noopept) and IL-1Ra (RAIL), developed with the help of the new information technology with intranasal administration in maximum allowable volume, belong to class VI according to the classification of substances toxicity by K. K. Sidorov – harmless substances – and do not demonstrate local irritating and allergenic effects.

The study of general toxic effect of the developed liquid gels with IL-1Ra and Noopept (administered intranasally for 90 days, in the maximum allowable volume, 0.4 ml) has shown that these dosage forms do not have a negative effect on the integrated indicators of experimental animals (body weight, temperature, motor and research activity, anxiety), on cardiovascular system, on peripheral blood parameters (number of erythrocytes, leukocytes, platelets, erythrocyte sedimentation rate, hemoglobin content, erythrocyte resistance), on renal and hepatic functions and do not cause toxic changes of histostructures of internal organs (brain, liver, lungs, stomach, spleen, adrenal glands, testes) of experimental animals.

The study of specific activity of the developed gel containing Noopept (10 mg/kg), in a model with induced experimental allergic encephalomyelitis in rats, led

to anxiety reduction, enhanced drug sleep, activated orienting-research activity, reduced the degree of neurological disorders and improved animal memory, as well as led to an increase in neuronal density by 19%, an increase in RNA concentration by 21% and a decrease in the proportion of apoptotic neurons by 44.6%, and an increase in HSP<sub>70</sub> by 50% and 64%, respectively, in the mitochondria and cytosol of brain neurons. Administration of the developed gel containing Noopept (10 mg/kg) to rats, after general anesthesia, significantly reduced ketamine-induced cognitive-mnemonic disorders – reduction of anxiety, fear and excitability, reduction of errors of working (by 6.5 times) and reference (by 3 times) memory.

Course intranasal administration of RAIL gel (1 mg/kg) to rats, after bilateral ligation of common carotid arteries, led to the normalization of the thiol-disulfide system of the brain – an increase by 100% in the level of reduced glutathione, by 96.1% in GH activity, by 68.1% in GPR and by 137.7% in GST against the background decrease in nitrotyrosine levels in the cytosolic fractions of the brain and an increase in the concentration of HSP<sub>70</sub> in the cytoplasm and mitochondria of the brain by 98.4% and 142.8%, respectively, compared with control on the 18th day of the experiment.

The developed RAIL gel reduced severe neurological symptoms (by 20% on day 4 and by 30% on day 18), mortality (by 30%) and cognitive-mnemonic disorders in experimental animals by day 18 after carotid artery occlusion.

The developed RAIL nasal gel led to the normalization of the nitroxydergic system of the brain – a decrease in the activity of NOS nitrites, nitrotyrosine, as well as to a decrease in iNOS expression in the cytoplasm of brain mitochondria by 47.7% and 52.9%, respectively, and iNOS mRNA expression in CA1 hippocampus by 94.3% compared with the control group on the 4th day after occlusion of the carotid arteries.

The developed RAIL nasal gel led to the normalization of the thiol-disulfide system of the brain – an increase in the level of reduced thiol forms by 216% and a decrease in oxidized forms by 68%, a 2.6-fold increase in reduced glutathione and HSP<sub>70</sub>, GH, GPR, and GST activity against the background decrease in levels of

homocysteine and nitrotyrosine in the cytoplasm of the brain of animals on the 4th day after occlusion of the carotid arteries.

The intranasal administration of the developed RAIL gel in rats with bilateral ligation of the common carotid arteries led to the improved energy metabolism of the brain - an increase in ATP by 60%, malate by 32% against the background reduction of lactate by 42% and normalization of mitochondrial function (reduction of pore opening rate by 70% and increase in the membrane potential by 138%) on the 4th day of the experiment.

Administration of intranasal RAIL gel (1 mg/kg) to rats after general anesthesia significantly reduced ketamine-induced neuroapoptosis – the c-fos expression reduction and increase in the concentration of antiapoptotic protein BCL-2 have been marked.

The developed intranasal liquid gels Noopept and RAIL, according to the main indicators of cerebroprotective action, have significantly surpassed the reference drugs Cerebrocurin, Citicoline, and Piracetam.

*Keywords:* expert system, intranasal dosage forms, manufacturing technology, composition, gel, excipients, specification.

#### *Список публікацій здобувача*

1. Бурлака Б. С. Використання сучасного програмного забезпечення в систематизації літературних даних по інтраназальним лікарським засобам. *Фармацевтичний часопис*. 2015. № 1. С. 29-31.

2. Бурлака Б. С. Перспективи створення нового інтраназального лікарського засобу на основі природної сировини для комплексної терапії алергічних ринітів. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2015. № 1. С. 35-37.

3. Бурлака Б. С., Червоненко Н. М., Беленічев І. Ф. Маркетингові дослідження вітчизняного ринку інтраназальних лікарських засобів. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2016. № 3. С. 87-90.

(Особистий внесок: формулювання мети, проведення літературного пошуку, аналіз отриманих даних, узагальнення результатів, оформлення статті).

4. Бурлака Б. С., Беленічев І. Ф., Гладишев В. В. Вивчення впливу допоміжних речовин на вивільнення ноопепту з назальної лікарської форми. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2019. Т. 12. № 3 (31). С. 304-308. (Особистий внесок: участь у постановці завдань дослідження, проведення експериментальних досліджень, аналіз отриманих даних, написання статті).

5. Бурлака Б. С., Беленічев І. Ф., Гладишев В. В. Термогравіметричні дослідження інтраназальної форми ноопепту. *Фармацевтичний журнал*. 2019. Т. 74. № 6. С. 54-61. (Особистий внесок: участь у постановці завдань дослідження, проведення експериментальних досліджень, аналіз отриманих даних, написання статті).

6. Розробка методики спектрофотометричного визначення рекомбінантного рецепторного антагоніста інтерлейкіну-1 людини в напівфабрикаті-розчині / К. П. Меведєва, Б. С. Бурлака, В. В. Бугайова, С. О. Васюк, І. Ф. Беленічев, Е. В. Супрун. *Фармацевтичний часопис*. 2019. № 4. С. 29-36. (Особистий внесок: участь у постановці завдань та експериментальних дослідженнях, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

7. Бурлака Б. С., Беленічев І. Ф., Гладишев В. В. Дослідження впливу поверхнево-активних речовин на вивільнення ноопепту з назальної лікарської форми. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2020. Т. 13. № 1 (32). С. 105-108. (Особистий внесок: участь у постановці завдань дослідження, проведення експериментальних досліджень, аналіз отриманих даних, написання статті).

8. Обґрунтування вибору допоміжних речовин для створення інтраназального гелю рецепторного антагоніста інтерлейкіна-1 $\beta$  (IL-1ra) / Б. С. Бурлака, І. Ф. Беленічев, В. В. Гладишев, Е. В. Супрун, Г. П. Лисянська. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2020. Т. 13.

№ 2 (33). С. 254-259. (Особистий внесок: участь у постановці завдань дослідження, проведення експериментальних досліджень, аналіз отриманих даних, написання статті).

9. Аналіз вітчизняного фармацевтичного ринку психостимулюючих та ноотропних засобів групи N06BX / Б. С. Бурлака, І. Ф. Беленічев, Н. М. Сінча, К. А. Сінча, Ал Зедан Фаді. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2020. № 3. С. 68-74. (Особистий внесок: участь у постановці завдань та експериментальних дослідженнях, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

10. Цінові характеристики вітчизняного фармацевтичного ринку лікарських засобів групи N06BX / Б. С. Бурлака, І. Ф. Беленічев, Н. М. Сінча, К. А. Сінча, Ал Зедан Фаді. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2020. № 4. С. 66-73. (Особистий внесок: участь у постановці завдань та експериментальних дослідженнях, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

11. Бурлака Б. С. Оптимізація складу назального лікарського засобу з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$ . *Фармацевтичний журнал*. 2021. № 1. С. 43-49.

12. Бурлака Б. С. Термогравіметричні дослідження назального засобу з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$  (IL-1ra). *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2021. № 1. С. 56-63.

13. Дослідження впливу полісорбату-80 на біофармацевтичні та реологічні властивості назальної лікарської форми з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$  (IL-1Ra) / Б. С. Бурлака., І. Ф. Беленічев, Ал Зедан Фаді, Е. В. Супрун. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. № 1 (15). С. 49-54. (Особистий внесок: участь у постановці завдань, проведення літературного пошуку та експериментальних досліджень, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

14. Burlaka B. S., Bielenichev I. F. A study on toxicity, local irritative effect of and allergic response to a novel intranasal medication containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester. *Запорожський медичний журнал*. 2021. № 1.

С. 126-131. (Особистий внесок: участь у постановці завдань та експериментальних дослідженнях, концепція та дизайн дослідження, приготування тест-зразків, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

15. Antypenko L., Burlaka B., Belenichev I. Noopept: Development and validation of UV-VIS Spectrophotometric method for the quantification of (s)-N-phenylacetyl-l-propylglycine ethyl ester in bulk drugs substance. *Pharmakeftiki*. 2016. Vol. 28 (4):161. P. 161-169. (Особистий внесок: участь у постановці завдань дослідження, проведення літературного пошуку, приготування тест-зразків, концепція та дизайн дослідження, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

16. Management of amnestic and behavioral disorders after ketamine anesthesia / I. Belenichev, B. Burlaka, A. Puzyrenko, O. Ryzhenko, M. Kurochkin, J. Yusuf. *Georgian medical news*. 2019. № 10 (294). P. 141-145. (Особистий внесок: участь у постановці завдань дослідження, приготування тест-зразків, концепція та дизайн дослідження, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

17. Neuroprotective properties of n-phenylacetyl-l-prolylglycine ethyl ester nasal gel in an experimental model of multiple sclerosis equivalent / B.S. Burlaka, I. F. Belenichev, O. O. Nefedov, O. G. Aliyeva, N. V. Bukhtiyarova. *Медичні перспективи*. 2020. № 4. С. 31-38. (Особистий внесок: участь у постановці завдань та експериментальних дослідженнях, концепція та дизайн дослідження, приготування тест-зразків, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

18. Burlaka B. S., Belenichev I. F. A study on acute toxicity, local irritative effect of and allergic response to a novel intranasal medication containing the interleukin- 1 $\beta$  receptor antagonist (il-1ra). *Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine (scientific Journal)*. 2020. Vol. 4 (1). P. 20-23. (Особистий внесок: участь у постановці завдань та експериментальних дослідженнях, концепція та дизайн дослідження, приготування тест-зразків, проведення



літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

19. The concentration of hsp70 in the cytosol and mitochondria of the brain in animals with experimental autoimmune encephalo-myelitis and after the time course of intranasally administered n-phenylacetyl-l-prolylglycine ethyl ester (noopept) / B. Burlaka, I. Belenichev, I. Samura, N. Bukhtiyarova. *Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine (scientific Journal)*. 2020. Vol. 4 (2). P. 34-38. (Особистий внесок: участь у постановці завдань та експериментальних дослідженнях, концепція та дизайн дослідження, приготування тест-зразків, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

20. Morpho-functional parameters of neurons in the sensorimotor cortex and neuroapoptosis under conditions of an induced experimental allergic encephalomyelitis in rats and a course of intranasal gel administration containing n-phenylacetyl-l-prolylglycine (Noopept) / Burlaka B. S., Bielenichev I. F., Nosach S. G., Nefedov A. A. *Journal of Education, Health and Sport*. 2021. Vol. 11 (1). P. 191-201. (Особистий внесок: участь у постановці завдань та експериментальних дослідженнях, концепція та дизайн дослідження, приготування тест-зразків, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

21. Pharmacological Correction of Thiol-Disulphide Imbalance in the Rat Brain By Intranasal form of Il-1b Antagonist in a Model of Chronic Cerebral Ischemia / I. F. Belenichev, B. S. Burlaka, N. V. Bukhtiyarova, E. G. Aliyeva, E. V. Suprun, A. M. Ishchenko, A. S. Simbirtsev. *Neurochemical Journal*. 2021. Vol. 15. №. 1. P. 30-36. (Особистий внесок: участь у постановці завдань та експериментальних дослідженнях, концепція та дизайн дослідження, приготування тест-зразків, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

22. Цитокінова терапія в комплексному лікуванні цереброваскулярних захворювань: стан, перспективи досліджень / Е. В. Супрун, І. С. Чекман, І. Ф.

Беленічев, Н. О. Горчакова, А. С. Свінціцький, М. І. Загородній, Б. С. Бурлака. *Раціональна фармакотерапія*. 2017. № 1 (42). С.19-30. (Особистий внесок: участь у постановці завдань дослідження, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

23. Спосіб фармакологічної корекції порушень когнітивних функцій центральної нервової системи і психоемоційної сфери після кетамінової анестезії в експерименті : пат. 126979 України, МПК 2018.01 А61К9//00 А61К 31//00. Беленічев І. Ф., Курочкін М. Ю., Риженко О. І., Бурлака Б. С., Бухтіярова Н. В. № 126979 ; заявл. 19.02.18, опубл. 10.07.18, Бюл. № 13. 4 с. (Особистий внесок: розробка складу і технології назального гелю, підготовка формули й опису до патенту).

24. Назальний лікарський засіб ноотропної дії : пат. 141924 України, МПК: А61К 9/00, А61К 31/00. Бурлака Б. С., Беленічев І. Ф. № 141924 ; заявл. 10.02.20, опубл. 27.04.20, Бюл. № 8. 4 с. (Особистий внесок: розробка складу і технології назального гелю, підготовка формули й опису до патенту).

25. Бурлака Б. С. Перспективи розробки інтраназальних лікарських форм нейропротективної дії. *Сучасні аспекти медицини і фармації – 2014* : збірник тез всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, 15-16 трав. 2014 р. Запоріжжя, 2014. С. 164.

26. Бурлака Б. С., Беленічев І. Ф., Гладишев В. В. Створення інтраназального лікарського засобу церебропротективної дії з похідним гліцин. *V Національний з'їзд фармакологів України* : тези доповідей, 18-20 жовтня 2017 р. Запоріжжя, 2017. С. 12. (Особистий внесок: формулювання мети, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих результатів, підготовка тез до публікації).

27. Antypenko L. M., Burlaka B. S., Belenichev I. F. Noopept: development and validation of uv-spectrophotometric. *Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів* : матеріали I Міжнар. наук.-практ. конф., 30-31 берез. 2017 р. Х. : НфаУ, 2017. Т. 2. С. 6. (Особистий

внесок: формулювання мети, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих результатів, підготовка тез до публікації).

28. Беленичев И. Ф. Ковальчук Д. А., Бурлака Б. С. Нейропротективные эффекты интраназальной формы антагониста il-1b. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації (до 50-річчя заснування ЗДМУ) : тези доповідей, 18-25 квіт. 2018 р. Запоріжжя, 2018. С. 5.* (Особистий внесок: формулювання мети, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих результатів, підготовка тез до публікації).

29. Igor Belenichev, Bogdan Burlaka. Neuroprotective properties of intranasal drug ARIL(IL-1b antagonist) at animals with cognitive deficit, caused by ketamine anesthesia. *5th World Congress & Expo on Pharmaceutics & Drug Delivery Systems Theme : Implementing Major Initiative Studies for the Development of Pharmaceutical Community, 2020. Venue : Lisbon, Portugal, 2020. P. 39.* (Особистий внесок: формулювання мети, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих результатів, підготовка тез до публікації).

30. Бурлака Богдан. Опрацювання фармацевтичних факторів до створення алгоритмічного підходу в методології розробки назальних форм системної дії. *XXIV Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених the 24th international medical congress of students and young scientists : матеріали конгресу, 12-14 квіт. 2021 р. Т., 2021. С. 189.*

31. Бурлака Б. С., Беленичев І. Ф., Гладишев В. В. Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір n-фенілацетил-І-пролілгліцину в умовах аптеки. *Інформаційний лист про нововведення в сфері охорони здоров'я. К. : Укрмедпатентінформ, 2020. Випуск з проблеми «Фармація», № 70. 4 с.* (Особистий внесок: узагальнення даних і написання інформаційного листа).

## ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	26
ВСТУП.....	29
РОЗДІЛ 1 ДОСЯГНЕННЯ В ГАЛУЗІ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ ЦЕРЕБРО- ПРОТЕКТИВНІ ДІЇ. СУЧАСНИЙ ПОГЛЯД НА ІНТРАНАЗАЛЬНІ ЛІКАРСЬКІ ФОРМИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	39
1.1 Нейропротективні засоби в терапії церебральної ішемії.....	39
1.2 Аналіз даних літератури щодо інтраназальних лікарських форм для місцевого застосування.....	49
1.3 Аналіз даних літератури щодо інтраназальних лікарських форм для системного застосування.....	52
1.4 Характеристика видів назальної упаковки.....	62
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	66
2.1 Об'єкти дослідження.....	66
2.2 Методи дослідження.....	72
2.2.1 Фізико-хімічні, фармако-технологічні, реологічні, біофармацевтичні методи дослідження.....	72
2.2.2 Токсикологічні методи дослідження.....	74
2.2.3 Фармакологічні методи дослідження.....	81
2.2.4 Біохімічні методи дослідження.....	88
2.2.5 Гістохімічні методи дослідження.....	90
2.2.6 Гісто-морфологічні методи дослідження.....	91
2.2.7 Статистичні методи дослідження.....	93
РОЗДІЛ 3 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ЗАГАЛЬНОЇ МЕТОДОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ НАЗАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ДЛЯ ТРАНСПОРТУВАННЯ АФІ ЧЕРЕЗ НІС-МОЗОК.....	96
3.1. Вибір загальної методології досліджень.....	96

	21
3.2 Узагальнення та опрацювання інформаційних потоків по назальним лікарським формам.....	97
3.2.1 Характеристика біологічних факторів, які впливають на доставку АФІ через ніс-мозок.....	98
3.2.2 Характеристика факторів, пов'язаних з природою активних сполук, які впливають на доставку активних сполук через ніс-мозок.....	100
3.2.3 Характеристика факторів, пов'язаних з лікарською формою та технологією виготовлення, які впливають на доставку активних сполук через ніс-мозок.....	101
3.3 Фармацевтична розробка назальних лікарських форм cerebroprotective дії.....	104
3.4 Експертна система для назальних засобів системного застосування.....	106
3.4.1 Розробка моделей машинного навчання для прогнозу проникнення АФІ через ГЕБ.....	110
3.4.2 Розробка моделей машинного навчання для прогнозу виникнення фармацевтичних несумісностей в рецептурі назальної лікарської форми.....	115
3.5 Обґрунтування вибору упаковки для назальних засобів cerebroprotective дії.....	122
3.6. Розробка упаковки для транспортування рідких назальних мукоадгезивних гелів.....	132
ВИСНОВКИ.....	137
РОЗДІЛ 4 МАРКЕТИНГОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ З ВИЗНАЧЕННЯ ПЕРСПЕКТИВНОСТІ ВПРОВАДЖЕННЯ НАЗАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ СИСТЕМНОЇ ДІЇ.....	139
4.1 Маркетингові дослідження вітчизняного ринку інтраназальних лікарських засобів.....	139

4.2 Дослідження вітчизняного фармацевтичного ринку психостимулюючих та ноотропних засобів групи N06BX.....	143
4.3 Дослідження цінових характеристик вітчизняного фармацевтичного ринку лікарських засобів групи N06BX.....	149
ВИСНОВКИ.....	158
РОЗДІЛ 5 НАУКОВЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ НАЗАЛЬНИХ ЗАСОБІВ СИСТЕМНОЇ ДІЇ З ПОХІДНИМ ГЛІЦИНУ.....	160
5.1 Експериментальне обґрунтування складу, технології інтраназальної форми у вигляді гелю з похідним гліцину.....	160
5.1.1 Біофармацевтичні дослідження назального гелю з похідним гліцину.....	161
5.1.2 Обґрунтування вибору консерванту для назального гелю з похідним гліцину.....	166
5.1.3 Термогравіметричні дослідження назального гелю з похідним гліцину.....	168
5.1.4 Реологічні дослідження назального гелю з похідним гліцину.....	176
5.1.5 Технологія виготовлення назального гелю в умовах аптеки.....	178
5.1.6 Опрацювання специфікації якості та дослідження стабільності назального гелю з етиловим естером п-феніл-ацетил-1-пролілгліцину.....	180
ВИСНОВКИ.....	183
РОЗДІЛ 6 НАУКОВЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ НАЗАЛЬНИХ ЗАСОБІВ СИСТЕМНОЇ ДІЇ З РЕЦЕПТОРНИМ АНТАГОНІСТОМ ІНТЕРЛЕЙКІНА-1В (IL-1RA).....	185
6.1 Експериментальне обґрунтування складу, технології інтраназальної форми у вигляді гелю з рецепторним антагоністом інтерлейкіна-1 $\beta$ (IL-1ra).....	185

6.1.1 Обґрунтування вибору допоміжних речовин для назальної форми з ІЛ-1Ra.....	187
6.1.2 Обґрунтування вибору консерванту для назального гелю з рецепторним антагоністом інтерлейкіна-1 $\beta$ (ІЛ-1ra).....	189
6.1.3 Біофармацевтичні та термогравіметричні дослідження назального гелю з рецепторним антагоністом інтерлейкіна-1 $\beta$ (ІЛ-1Ra).....	192
6.1.4 Реологічні дослідження назального гелю з рецепторним антагоністом інтерлейкіна-1 $\beta$ (ІЛ-1Ra).....	206
6.1.5 Технологія виготовлення назального гелю в умовах промислового виробництва.....	210
6.1.6 Опрацювання специфікації якості та дослідження стабільності назального гелю з ІЛ-1Ra.....	219
ВИСНОВКИ.....	222
РОЗДІЛ 7 ДОСЛІДЖЕННЯ ДЕЯКИХ ПАРАМЕТРІВ БЕЗПЕЧНОСТІ РОЗРОБЛЕНИХ НАЗАЛЬНИХ ЗАСОБІВ.....	224
7.1 Вивчення гострої токсичності, алергізуючої та шкірно-подразнювальної активності, місцевопродразнювальної дії у назального гелю з похідним гліцину та з ІЛ-1ra.....	224
7.2 Вивчення токсикологічних характеристик назального гелю з рецепторним антагоністом інтерлейкіна-1 $\beta$ (ІЛ-1Ra) при повторних застосуваннях.....	232
7.2.1 Вплив гелю ІЛ-1ra на рухово-дослідницьку та емоційну активність тварин.....	233
7.2.2 Вплив гелю ІЛ-1ra на фізичну працездатність.....	234
7.2.3 Вплив гелю ІЛ-1ra на показники біоелектричної активності серця і артеріальний тиск у щурів.....	235
7.2.4 Вплив гелю ІЛ-1ra на склад периферичної крові.....	238
7.2.5 Вплив гелю ІЛ-1ra на біохімічні показники сироватки крові.....	240

	24
7.2.6 Вплив гелю ІЛ-1ra на показники сечі.....	243
7.2.7 Вплив гелю ІЛ-1ra на морфо-гістологічну картину органів і тканин експериментальних тварин.....	244
7.3 Вивчення токсикологічних характеристик назального гелю ноопепту при повторних застосуваннях.....	254
7.3.1 Вплив гелю з ноопептом на рухово-дослідницьку та емоційну активність тварин.....	255
7.3.2 Вплив гелю з ноопептом на фізичну працездатність.....	257
7.3.3 Вплив гелю з ноопептом на показники біоелектричної активності серця і артеріальний тиск у щурів.....	257
7.3.4 Вплив гелю з ноопептом на склад периферичної крові....	261
7.3.5 Вплив гелю з ноопептом на біохімічні показники сироватки крові.....	262
7.3.6 Вплив гелю з ноопептом на показники сечі.....	264
7.3.7 Вплив гелю з ноопептом на морфо-гістологічну картину органів і тканин експериментальних тварин.....	266
ВИСНОВКИ.....	275
РОЗДІЛ 8 ВИВЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ АКТИВНОСТІ РОЗРОБЛЕНИХ НАЗАЛЬНИХ ГЕЛІВ.....	278
8.1 Дослідження нейропротективних властивостей назального гелю з похідним гліцину.....	278
8.1.1 Дослідження нейропротективних властивостей назального гелю з похідним гліцину на експериментальній моделі розсіяного склерозу.....	278
8.2 Дослідження нейропротективних властивостей назального гелю з рецепторним антагоністом інтерлейкіна-1 $\beta$ (ІЛ-1ra, РАІЛ) в умовах порушень мозкового кровообігу за типом ішемічного інсульту.....	302



8.2.1 Дослідження нейропротективних властивостей назального гелю з рецепторним антагоністом інтерлейкіна-1 $\beta$ (IL-1ra, RAIL) в умовах хронічної церебральної ішемії.....	302
8.2.2 Дослідження нейропротективних властивостей назального гелю з рецепторним антагоністом інтерлейкіна-1 $\beta$ (IL-1ra, RAIL) в умовах гострого порушення мозкового кровообігу (гостра церебральна ішемія).....	310
8.2.3 Нейропротективна активність гелю (IL-1Ra, RAIL) при кетамін-індукованому нейроапоптозі.....	334
ВИСНОВКИ.....	342
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ.....	345
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	351
ДОДАТКИ.....	398

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АлАТ	–	аланінамінотрансфераза;
АсАТ	–	аспартатамінотрансфераза;
АЕК	–	аміноетилкарбазол;
АМРК	–	АМФ-активована протеїнкіназа;
АТ	–	артеріальний тиск;
АТФ	–	аденозинтрифосфат;
АФГ	–	альдегідфенілгідрозон;
АФІ	–	активний фармацевтичний інгредієнт;
БАУ	–	безпропелентна аерозольна упаковка;
БАР	–	біологічно активна речовина;
ВАТ	–	Відкрите акціонерне товариство;
ВООЗ	–	Всесвітня організація охорони здоров'я;
ГЕБ	–	гематоенцефалічний бар'єр;
ГПМК	–	гостре порушення мозкового кровообігу;
ГПР	–	глутатіон пероксидаза;
GST	–	глутатіон-S-трансфераза;
ГР	–	глутатіонредуктаза;
ДВНЗ	–	Державний вищий навчальний заклад;
ДЗ	–	державний заклад;
2,4-ДНФГ	–	2,4-дінітрофенілгідрозин;
ДП	–	державне підприємство;
ДР	–	допоміжна речовина(и);
ДФУ	–	Державна фармакопея України;
ЄФ	–	Європейська фармакопея;
ЕАЕ	–	експериментальний алергічний енцефаломієліт;
ЕГС	–	енцефілітогенна суміш;
ЕКГ	–	електрокардіографія;
ЗАТ	–	Закрите акціонерне товариство;

ЛЗ	– лікарський засіб;
ЛП	– лікарський препарат;
ЛФ	– лужна фосфатаза;
КМЦ	– карбоксиметилцелюлоза;
КУО	– колонієутворювальні одиниці;
КФГ	– карбоксифенілгідрозон;
КФК-мх	– креатинфосфокіназа в мітохондріях;
КФК-цт	– креатинфосфокіназа в цитоплазмі;
МДГ	– малатдегідрогеназа;
МКЯ	– методика контролю якості;
МНН	– міжнародна непатентована назва;
МОЗУ	– Міністерство охорони здоров'я України;
мРНК	– матрична рибонуклеїнова кислота;
МПЕ	– математичне планування експерименту;
МЦ	– метилцелюлоза;
МП	– метилпреднізолон;
НАДН	– нікотинамідаденіндинуклеотид;
НАД-МДГ	– НАД-залежна малатдегідрогеназа;
ПАР	– поверхнево-активні речовини;
ПААГ	– поліакриламідний гель;
ПАТ	– Публічне акціонерне товариство;
ПАФ	– повний ад'ювант Фрейнда;
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція;
ПМК	– порушення мозкового кровообігу;
ПОКД	– післяопераційна когнітивна дисфункція;
РІЗК	– фосфатидилінозитид 3-кіназа;
РС	– розсіяний склероз;
РЦ	– рецептура;
СОД	– супероксиддисмутаза;
ТДС	– тіол-дисульфідна система;

ТОВ	– Товариство з обмеженою відповідальністю;
ТР	– технологічний регламент;
УРПУ	– умовна реакція пасивного уникнення;
ФФ	– фармацевтична фабрика;
ХФЗ	– хіміко-фармацевтичний завод;
ХЦІ	– хронічна церебральна ішемія;
ЦНС	– центральна нервова система;
СА1	– зона гіпокампу;
IL-1Ra (РАІЛ)	– рецепторний антагоніст інтерлейкіна-1 $\beta$ ;
HSP <sub>70</sub>	– білок теплового шоку;
NMDA	– N-метил-D-аспартат;
NOS	– NO-синтаза;
rt-PA	– тканинний активатор плазміногену.

## ВСТУП

### **Обґрунтування вибору теми дослідження**

Початок 21 століття ознаменувався стрімким старінням населення планети, яке призводить до зростання захворювань ЦНС нейродегенеративного та судинного генезу, що обмежує соціальну активність цієї групи людей за рахунок формування когнітивно-мнестичних порушень, зниження рівня суджень та критичних можливостей, кортикального контролю, субкортикальних рівнів активності, обмежує можливості до прийняття рішень, а також призводить до апатії, бідності спонукань. Економічні втрати, включаючи вартість медичних та реабілітаційних послуг, при захворюваннях головного мозку – величезні. Особливо це спостерігається у хворих, які одужують після перенесених важких мозкових інсультів. Незважаючи на певні успіхи в галузі розробки і створення церебропротективних засобів і їх наявний чималий арсенал в практиці лікаря та провізора, актуальність даної проблеми не знижується. Все це окреслює нагальну необхідність розробки як нових оригінальних лікарських засобів з церебропротективною дією, так і створення нових лікарських форм на основі препаратів з клінічно підтвердженою церебропротективною активністю. Особливого значення набувають інтраназальні лікарські форми, які завдяки шляху введення не тільки здатні збільшити нейродоступність діючої речовини, а й посилити її специфічну (церебропротективну, протиішемічну, ноотропну, антиапоптичну) активність, що в цілому підвищує терапевтичну цінність комплексного лікування захворювань мозку.

Інтраназальне введення лікарських засобів для місцевого застосування відоме та застосовується досить давно. Серед найбільш розповсюджених прикладів є препарати судинозвужувальної, протиалергійної, протизапальної дії. Останніми десятиліттями вчені отримали позитивні результати щодо використання інтраназального шляху для системного застосування. Біодоступність системних інтраназальних препаратів різної фармакологічної дії

виявилася вищою в порівнянні з пероральним застосуванням і часто є такою, як при парентеральному введенні. При інтраназальному шляху введення діючі речовини потрапляють відразу в загальний кровообіг, на відміну від ентерального шляху, оминають пресистемну елімінацію, що попереджує передчасне руйнування препарату.

Характеризуючи властивості та характер інтраназального шляху введення лікарських засобів, розробка інтраназальних терапевтичних систем для лікування церебральних патологій, є перспективною та актуальною для фармацевтичної науки та практики.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами**

Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт кафедри технології ліків Запорізького державного медичного університету: «Дослідження біофармацевтичних, фармакокінетичних та реологічних властивостей аплікаційних лікарських форм із речовинами різної фармакологічної дії» (№ державної реєстрації 0112U005635), «Розробка складу, технології та біофармацевтичні дослідження фармакотерапевтичних систем трансмукозної доставки лікарських речовин» (№ державної реєстрації 0118U004529); кафедри фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медичного університету: «Молекулярно-біохімічні механізми формування мітохондріальної дисфункції нейронів головного мозку за умов гострої церебральної ішемії: нові мішені для нейропротекції» (№ державної реєстрації 0113U000797), «HSP70/HIF-1 $\alpha$ -опосередковані механізми ендогенної нейропротекції: розробка підходів до її фармакологічної регуляції» (№ державної реєстрації 0117U000658), «Фармакологічна модуляція глутатіон-залежних ланок регуляції та реалізації механізмів ендогенної нейропротекції та нейропластичності – новий погляд на нейропротекцію при ішемічних інсультах» (№ державної реєстрації 0120U101644). Дисертантом особисто теоретично обґрунтовано склад та проведено експериментальні дослідження інтраназальних лікарських форм церебропротективної дії.

### Мета і завдання дослідження

Метою роботи є розробка інформаційної технології комп'ютерного прогнозу на базі комплексного науково-методичного підходу та застосування її для створення інтраназальних лікарських форм церебропротективної дії з покращеними біофармацевтичними та фармако-токсикологічними характеристиками.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- проаналізувати та узагальнити дані літератури щодо застосування нейропротективних засобів та назальних лікарських форм для місцевого і системного застосування, асортименту первинних упаковок для назальних лікарських форм;
- провести маркетингові дослідження вітчизняного ринку назальних засобів, психостимулюючих та ноотропних препаратів групи N06BX, вивчити їх цінові характеристики;
- розробити теоретичні основи для нової інформаційної технології – комплексну методологію підходу розробки назальних лікарських засобів системної дії з церебропротективними властивостями;
- в рамках комплексного підходу, використовуючи алгоритми опису та виділення характеристик структури АФІ і допоміжних речовин, спираючись на технології машинного навчання, розробити стратегії, алгоритми прогнозу та програмний засіб у вигляді експертної системи для *in silico* прогнозування складу рецептури назальних лікарських форм церебропротективної дії;
- обґрунтувати за допомогою розробленої експертної системи, вибір інгредієнтів рецептури з метою створення раціональних інтраназальних лікарських форм церебропротективної дії;
- розробити склади і раціональні технології інтраназальних лікарських засобів у формі рідкого гелю, забезпечуючи оптимальні технологічні та споживчі характеристики;
- встановити фактори, які впливають на біодоступність інтраназальних лікарських форм церебропротективної дії;

– розробити технологічні схеми виробництва та нормативно-технічну документацію на ЛЗ, що досліджуються; провести вивчення їх стабільності і терміну придатності;

– розробити конструкцію упаковки для одноразового застосування для введення лікарських засобів до носової порожнини у вигляді рідких гелів. Підготувати для цього нормативно-технічну документацію.

– провести оцінку специфічної активності та безпечності розроблених інтраназальних лікарських форм церебропротективної дії.

*Об'єкт дослідження.* Комплексна методологія підходу до розробки технології інтраназальних лікарських засобів для системного застосування церебропротективної дії.

*Предмет дослідження.* Інформаційні технології, інтраназальні лікарські форми церебропротективної дії, АФІ пептидної природи; допоміжні речовини, які були використані у дослідженнях.

### **Методи дослідження**

Для вирішення поставлених завдань в роботі використали методи машинного навчання, органолептичні, технологічні, фізико-хімічні (визначення термостабільності, масової частки води й летких речовин, рН тощо), біофармацевтичні (вивчення кінетики вивільнення активної речовини), реологічні (визначення дотичної напруги зсуву, ефективної в'язкості), мікробіологічні (визначення мікробіологічної чистоти тощо) і біологічні (визначення параметрів безпечності, специфічної активності), статистичні методи досліджень, які дозволяють об'єктивно і повно оцінити якісні показники лікарських засобів, що розробляються, на підставі експериментально одержаних і статистично оброблених результатів.

### **Наукова новизна отриманих результатів**

Уперше сформовано науковий напрям щодо вирішення фундаментальної проблеми фармацевтичної розробки – розроблено комплексну методологію створення інтраназальних засобів системної дії з церебропротективною активністю у формі рідких гелів. Уперше запропоновано основні теоретичні



концепції нової методології, яка може бути основою для створення нових методів комп'ютерних систем та інформаційних технологій для розробки підходів щодо створення нових лікарських форм з покращеними фармакологічними та токсикологічними властивостями. Уперше створено нову інформаційну технологію для *in silico* обґрунтування раціональних складів інтраназальних лікарських форм церебропротективної дії та розроблено експертну систему «ExpSys Nasalia».

На базі опрацьованих датасетів сполук, з ознаками щодо проникнення через ГЕБ та можливої несумісності, вперше створено моделі для машинного навчання бінарної класифікації для прогнозу проникнення АФІ через ГЕБ та попередження виникнення фармацевтичних несумісностей у складі рецептури.

Уперше експериментально доведено високу церебропротективну активність розроблених інтраназальних засобів з похідним гліцину та рецепторним антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$  в умовах різних моделей патології ЦНС та серцево-судинної системи.

Уперше експериментально обґрунтовано високий профіль безпечності розроблених інтраназальних засобів церебропротективної дії з похідним гліцину та з рецепторним антагоністом інтерлейкіну-1 $\beta$  при повторних застосуваннях.

Наукова новизна досліджень захищена двома патентами на корисну модель № 141924 «Назальний лікарський засіб ноотропної дії», № 126979 «Спосіб фармакологічної корекції порушень когнітивних функцій центральної нервової системи і психоемоційної сфери після кетамінової анестезії в експерименті» (дод. А.1-А.2).

### **Практичне значення отриманих результатів**

Уперше для *in silico* обґрунтування раціональних складів інтраназальних лікарських форм церебропротективної дії розроблена експертна система «ExpSys Nasalia» у вигляді web додатку комп'ютерної програми з вбудованою базою даних діючих та допоміжних речовин та можливістю оновлення через мережу інтернет. Комплексний підхід до прогнозу і його складові – теоретичні концепції є методологічною основою для розробки комп'ютерних систем

прогнозу раціонального складу інтраназальних лікарських форм з церебропротективною дією. Застосування нової інформаційної технології у спрямованій розробці нових високоактивних церебропротективних лікарських засобів дозволяє істотно скоротити часові та матеріальні витрати на розробку нових інтраназальних лікарських форм. Наразі функціональні можливості експертної системи впроваджені в практику відділів розробки фармацевтичних промислових підприємств ТОВ «МОБІЛЬ МЕДІКАЛ» (акт впровадження від 05.06.2021), Фармацевтична фабрика «ВІОЛА» (акт впровадження від 06.06.2021), ТОВ «БіоТестЛаб» (акт впровадження від 09.06.2021), АТ «Фармак» (акт впровадження від 10.06.2021) (дод. Б.1-Б.4).

Уперше фармакотехнологічними дослідженнями розроблено склад мукоадгезивних інтраназальних засобів, вивчено вплив допоміжних речовин на інтенсивність вивільнення АФІ з мукоадгезивними компонентами при різних температурах. Уперше за допомогою експертної системи «ExpSys Nasalia» розроблено склад та технологію інтраназального гелю для системного застосування на основі похідного гліцину – етилового естеру N-фенілацетил-1-пролілгліцину. За результатами досліджень видано інформаційний лист № 70-2020 «Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір n-фенілацетил-1-пролілгліцину в умовах аптеки» Укрмедпатентінформ МОЗ України (дод. В).

Матеріали інформаційного листа впроваджені в практику виробничого процесу аптек з екстемпоральним виготовленням: ПрАТ «Ліки Кіровоградщини» м. Кропивницький (акт впровадження від 07.10.2020), ПКВО «Фармація» м. Миколаїв (акт впровадження від 01.12.2020), КП «Фармація» КМР м. Кривий ріг (акт впровадження від 16.12.2020), КП «Примула» м. Запоріжжя (акт впровадження від 26.01.2021), ПП «Медична Лабораторія Сіместа» м. Одеса (акт впровадження від 01.03.2021), ФОП Штучна Н. І. Аптека № 80 м. Слов'янськ (акт впровадження від 01.04.2021), Обласного комунального підприємства «Фармація» м. Дніпро (акт впровадження від

02.04.2021), Petersberg-Apotheke Heinrichstraße 56 99817 Eisenach, Німеччина (акт впровадження від 14.05.2021) (дод. Д.1-Д.8).

На створену упаковку, назальну насадку стерильну для одноразового застосування розроблено технологію виготовлення в лабораторних та промислових умовах і опрацьовано нормативно-технічну документацію – технічні умови на виготовлення назальної насадки стерильної для одноразового застосування (ТУ У 38002601:2021) і одержано Висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи Державної служби України з питань безпеки (№ 12.2-18-2/10941). Технологію промислового виготовлення виробу «Насадка назальна для одноразового застосування, стерильна» апробовано ТОВ «МОБІЛЬ МЕДІКАЛ» (акт апробації від 17.02.2021) (дод. Е.1-Е.5).

Розроблено склад та технологію назального гелю з ІЛ-1Ра в умовах промислового виробництва, проєкт ТР, який апробовано ТОВ «МОБІЛЬ МЕДІКАЛ» (акт апробації від 16.02.2021) (дод. Ж.1-Ж.4).

Результати наукових досліджень впроваджено в науково-дослідну та навчально-методичну роботу кафедри технологій фармацевтичних препаратів Національного фармацевтичного університету (акт впровадження від 15.02.2021), кафедри управління та економіки фармації з технологією ліків ТНМУ ім. І. Я. Горбачевського (акт впровадження від 16.02.2021), кафедри аптечної та промислової технології ліків Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця (акт впровадження від 16.02.2021), кафедри фармацевтичної технології і біофармації НМАПО ім. П. Л. Шупика (акт впровадження від 17.12.2020), кафедри технології ліків і біофармації Львівського національного університету ім. Данила Галицького (акт впровадження від 25.01.2021), кафедри загальної та клінічної фармації ДЗ «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» (акт впровадження від 22.01.2021), кафедри фармакології та фармакогнозії Одеського національного медичного університету (акт впровадження від 26.02.2021); лабораторії фізико-хімічної фармакології Фізико-хімічного інституту ім. О. В. Богатського НАН України (акт впровадження від

25.01.2021), відділу медичної хімії ДУ «Інституту фармакології та токсикології НАМНУ» (акт впровадження від 28.01.2021), кафедри управління і економіки фармації та фармацевтичної технології Запорізького державного медичного університету (акт впровадження від 17.05.2021) (дод. 3.1-3.10).

### **Особистий внесок здобувача**

Автором особисто здійснено аналіз літератури щодо сучасного стану використання нейропротекторних засобів для терапії цереброваскулярної ішемії, застосування місцевих та системних назальних лікарських засобів, асортименту первинної упаковки для назальних лікарських препаратів. Спроектовано та розроблено експертну систему «ExpSys Nasalia» для *in silico* прогнозу раціонального складу нових інтраназальних засобів церебропротективної дії. Розроблено упаковку у вигляді одноразової назальної насадки для введення у носову порожнину рідких назальних гелів церебропротективної дії. Проведено маркетингові дослідження вітчизняного ринку назальних засобів для місцевого та системного застосування, ноотропних засобів групи N06BX, їх цінкових характеристик. Розроблено склад, технологію отримання інтраназального засобу у формі рідкого гелю з етиловим естером N-фенілацетил-1-пролілгліцину в умовах екстемпорального виготовлення. Теоретично обґрунтовано та експериментально підтверджено оптимальний склад інтраназального засобу для системної дії з IL-1Ra. Її технологія виробництва апробована в промислових умовах. Узагальнено та статистично оброблено дані експериментальних досліджень. Розроблено нормативно-технічну документацію на назальну насадку та запропоновані ЛЗ. Проаналізовано та узагальнено результати біологічних досліджень.

Персональний внесок дисертанта в опублікованих працях зі співавторами (Беленічевим І. Ф., Гладишевим В. В., Сінчою Н. І., Сінчою К. А., Ал Зедан Фаді, Супрун Е. В., Лисянською Г. П., Нефьодовим О. О., Алієвою О. Г., Бухтіяровою Н. В., Медведевою К. П., Бугайовою В. В., Васюк С. О., Пузиренко А.М., Риженко О. І., Курочкіним М. Ю., Юсуф Ж., Антипенко Л. М., Чекманом І. С., Горчаковою Н. О., Свінціцьким А. С., Загороднім М. І.,

Ковальчук Д. А., Червоненко Н. М., Самурою І. Б., Носач С. Г., Іщенко А. М., Сімбірцевим А. С.) зазначено в тексті дисертації і в авторефераті в списку фахових публікацій.

Окреслення завдань, шляхів їх реалізації, обговорення результатів одержаних даних проведено спільно з науковим консультантом.

### **Апробація результатів дисертації**

Основні положення дисертаційної роботи представлено на таких заходах: XXIV Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених (м. Тернопіль, 2021); 5th World Congress & Expo on Pharmaceuticals & Drug Delivery Systems Theme: Implementing Major Initiative Studies for the Development of Pharmaceutical Community (Lisbon, Portugal, 2020); Актуальні питання сучасної медицини і фармації (до 50-річчя заснування ЗДМУ) (м. Запоріжжя, 2018); Ліки – людині. «Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (м. Харків, 2017); V національний з'їзд фармакологів України (м. Запоріжжя, 2017); Сучасні аспекти медицини і фармації (м. Запоріжжя, 2014).

Апробацію дисертаційної роботи проведено на спільному засіданні професорсько-викладацького складу кафедр фармацевтичного профілю Запорізького державного медичного університету 11 червня 2021.

### **Публікації**

За матеріалами дисертаційної роботи опублікована 31 наукова праця, а саме: 22 статті (із них 13 – у наукових фахових виданнях України, 8 у закордонних за напрямом дисертації, 3 з яких цитується наукометричною базою SCOPUS, 2 з яких цитується наукометричною базою Web of Science), 2 патенти на корисну модель, 6 тез доповідей, 1 інформаційний лист.

### **Обсяг і структура дисертації**

Дисертаційна робота викладена на 441 сторінці друкованого тексту і складається зі вступу, 8 розділів, загальних висновків, списку використаних літературних джерел та 9 додатків (22 акти впровадження). Обсяг основного тексту дисертації складає 292 сторінки друкованого тексту. Робота ілюстрована

111 таблицями, 92 рисунками. Список використаних джерел літератури містить 485 найменувань, із них 71 кирилицею і 414 латиницею.

## РОЗДІЛ 1

# ДОСЯГНЕННЯ В ГАЛУЗІ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТИВНОЇ ДІЇ. СУЧАСНИЙ ПОГЛЯД НА ІНТРАНАЗАЛЬНІ ЛІКАРСЬКІ ФОРМИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

### 1.1 Нейропротективні засоби в терапії церебральної ішемії

Мозок є ваговою частиною центральної нервової системи, функціонування якого забезпечує: регуляторну функцію організму, наприклад регуляцію процесів дихання, серцебиття; опрацювання різноманітної інформації, яка надходить від спеціалізованої периферичної анатомо-фізіологічної системи; функціонування когнітивних функцій, а саме мислення, пам'яті, уваги, просторової орієнтації, обробки інформації та прийняття рішень. Здійснення зазначених функцій потребує постійного надходження кисню та поживних речовин до тканин мозку, яке забезпечується інтенсивним кровопостачанням через сонні артерії [1-3].

Підтримання гомеостазу мозку здійснюється гематоенцефалічним бар'єром, основним елементом структури якого є ендотеліальні клітини з щільними контактами. ГЕБ захищає мозок від різноманітних токсичних сполук, мікроорганізмів та інших деструктивних факторів, селективно пропускає поживні речовини до тканин мозку, які необхідні для його нормального функціонування, а також в зворотному напрямку виводить продукти життєдіяльності мозку. Тому, з фармакологічної точки зору, необхідно враховувати можливість проникнення АФІ через ГЕБ для забезпечення належного терапевтичного ефекту [4, 5].

Транспортування різноманітних сполук через ГЕБ може здійснюватися пасивним, активним та везикулярним транспортом. Вважається, що проникнення через ГЕБ зворотно-пропорційно залежить від ліпофільності сполуки та її молекулярної маси. Чим менша молекулярна маса речовини та більша її ліпофільність тим краще вона буде дифундувати через клітинну

мембрану. Активний транспорт здійснює перенос сполук, використовуючи енергію від розпаду аденозинтрифосфornoї кислоти. Везикулярний транспорт дозволяє транспортувати великі молекули шляхом контактування їх з відповідним рецептором-мішенню та утворенню везикули, яка переміщується всередину клітини та вивільняє відповідну інкорпоровану сполуку [6, 7].

Порушення когнітивних функцій мозку може бути різної етіології та патогенезу і призводить до зниження пам'яті, розумової працездатності, сприйняття та обробки інформації, серед яких відомі нейродегенеративні патології (деменція, хвороба Альцгеймера, Паркінсона), судинні захворювання (інсульт, хронічна церебральна ішемія, пошкодження головного мозку травматичного характеру), комбіновані порушення, дисметаболичні енцефалопатії (гіпоксична, печінкова, ниркова, гіпоглікемічна та ін.), церебральні запалення інфекційної природи (енцефаліт, ураження вірусом імунодефіциту). Нейродегенеративні патології – це група захворювань, які виникають у значної кількості населення планети та викликають прогресуючу втрату нейронів в центральній нервовій системі. Характерним прикладом є хвороба Альцгеймера, розповсюдження якої до 2025 року очікується понад 34 мільйони випадків (Alzheimer's Association, 2017). Загалом, на сьогоднішній день, кількість людей, які живуть із деменцією у всьому світі, становить понад тридцять п'ять мільйонів випадків. А вже до 2030 року це число збільшиться в два рази [8-12].

Люди, які страждають нейродегенеративними захворюваннями, стикаються з різким зниженням якості та тривалості життя, що створює значне фінансове навантаження на систему охорони здоров'я. За даними Асоціації Альцгеймера, гроші, витрачені на хворих з хворобою Альцгеймера, у 2017 році становили близько 259 мільярдів доларів. Будь-яке терапевтичне втручання, що може затримати розвиток захворювання принаймні на рік, різко зменшить кількість очікуваних випадків. Тому виявлення нових або вдосконалення відомих напрямків лікування є актуальним та перспективним для того, щоб вилікувати цю велику групу захворювань [11, 13].



Інсульт – досить розповсюджена хвороба в світі за кількістю причин смерті та причиною інвалідизації населення. Так, станом на 2010 рік, близько десяти відсотків всіх смертей були спровоковані інсультом. Прогнозується, що до 2030 року інсульт причинить понад дванадцять мільйонів смертей. Вченими підраховано, що кожна четверта доросла людина ймовірно перенесе інсульт. Нині в світі вже є понад 80 мільйонів людей, які перенесли інсульт та отримали різку ступінь інвалідності. Серед двох типів інсульту – ішемічного та геморагічного, більш розповсюдженіший є ішемічний інсульт [14, 15].

Церебральна ішемія характеризується гострим або хронічним порушенням мозкового кровотоку. Гостре порушення мозкового кровотоку може призводити до виникнення інсульту головного мозку та обумовлене різким критичним зменшенням кровопостачання нервових тканин, що призводить до зменшення притоку кисню та поживних речовин необхідних для нормального функціонування мозку. Причинами може бути: ураження судин атеросклеротичними бляшками, які не тільки зменшують просвіт судин, але часто закупорюють їх; виникнення тромбоемболічного процесу, який виникає при порушенні серцевих скорочень, фібриляції передсердь; порушення гемодинаміки крові за рахунок її згущення [16-18].

Гостра ішемія мозку має дві важливі ділянки: ішемічне ядро (Ischemic core) та ішемічну півтінь (ischemic penumbra). Ішемічне ядро характеризується незворотною травмою та раптовим зменшенням кровотоку вже через декілька хвилин після ішемічного пошкодження, що призводить до подальшої незворотної загибелі клітин. Патологічні процеси в ішемічній півтіні можуть виникати продовж декількох годин або ж днів. Зазначені процеси супроводжуються різноманітними молекулярними подіями, такими як продукція вільних радикалів, ексайтотоксичність та надмірне надходження  $Ca^{2+}$ , що призводить до некрозу, апоптозу, деградації цитоскелетних та ядерних білків, експресії лігандів для рецепторів фагоцитарних клітин і в результаті поглинання фагоцитарними клітинами [19, 20].

Патогенетична терапія ішемічного інсульту умовно направлена на первинну та вторинну нейропротекцію. Первинна нейропротекція застосовується з метою зменшення нейротоксичних глутамат-кальцієвих патологічних процесів, які виникають приблизно протягом перших шести годин ішемії. В цей період «терапевтичного вікна» (therapeutic window) пошкодження нервових клітин мають оборотний характер, не викликаючи при цьому серйозних структурно-морфологічних змін в нервовій тканині. Тому фармакотерапевтичні засоби первинної нейропротекції застосовують не пізніше сьомої години від початку ішемічного пошкодження [21-23].

Нині для лікування гострої фази інсульту використовується тромболітична терапія, яка характеризується двома основними напрямками:

1. медикаметозний;
  - 1.1 внутрішньовенний тромболізис;
  - 1.2 внутрішньоартеріальний тромболізис;
  - 1.3 комбінований тромболізис.
  - 1.4 етапний тромболізис.
2. механічний.
  - 2.1 УЗ-деструкція тромба;
  - 2.2 аспірація тромба;
  - 2.3 механічне видалення тромба.

Серед фармакотерапевтичних засобів, які використовуються для покращення проходження крові через ішемізовані тканини мозку, наразі відомі умовно 5 поколінь тромболітиків:

- 1 покоління – активатори плазміногену (стрептокіназа, урокіназа);
- 2 покоління – фібриноселективні тромболітики (альтеплаза);
- 3 покоління – вдосконалені rt-PA та інші активатори плазміногену (тенектеплаза, ланотеплаза);
- 4 покоління – вдосконалені активатори плазміногену III покоління;
- 5 покоління – композиції різних тромболітиків.

Однак ці стратегії не здатні захистити пацієнтів від ішемічних травм. Тому лікування (вторинна нейропротекція), має надалі зосереджуватися на методах, що покращують рівень виживання нейронів навколо ішемізованої області та неврологічної функції. Вторинна нейропротекція базується на напрямках корекції деструктивних пошкоджень ішемії, нормалізації енергетичного обміну, попередженню виникнення оксидативного стресу, зменшення продукції активних радикалів, протизапальних цитокінів, підвищення кровопостачання з метою доставки поживних речовин. Враховуючи різноманіття напрямків вторинної нейропротекції, її застосовують від декількох годин від початку ішемії, та інтенсивно продовжують протягом двох тижнів для корекції наслідків ішемії та інгібування можливого розвитку енцефалопатії в постінсультний період [24-26].



Рис. 1.1. Напрямки нейропротекції при ішемічному інсульті

*Блокатори кальцієвих каналів.* Ішемічний інсульт індукує збільшення внутрішньоклітинного кальцію, який в свою чергу спричиняє каскад реакцій, деполяризацію пресинаптичних мембран та збільшення концентрації глутамінової та аспарагінової кислоти, що призводить до значного збільшення

кальцію, хлору та води. Використання антагоністів кальцієвих каналів можливо інгібуватиме внутрішній потік кальцію та нормалізуватиме кровотік в мозку. Наразі, згідно даних літератури є суперечливі дані щодо використання німодипіну та блокаторів кальцієвих каналів на розвиток ішемічного інсульту. Згідно даних дослідження [27] німодипін зменшував нервовий дефіцит та смертність спровокованою ішемією головного мозку. Подвійним сліпим рандомізованим дослідженням було встановлено, що лікування німодипіном в дозі 40 мг одноразово на добу протягом двадцяти восьми днів показувало більш високий рівень поліпшення стану у пацієнтів в порівнянні з плацебо.

Іншими комплексними рандомізованими контрольованими дослідженнями у людей з гострим ішемічним інсультом проводили порівняння впливу німодипіну, флуаризину, ірадіпіну, нікардипіну, RY108-608, фасудилу та ліфаризину на результат лікування в порівнянні з контролем. У більшій половини цих випробувань за учасниками стежили щонайменше три місяці. Встановлено, що антагоністи кальцію не виявляли впливу на первинний результат або на смерть наприкінці подальшого лікування [28].

Враховуючи особливості патофізіологічного перебігу ішемічного інсульту, а саме перспективність впливу на надлишок іонів кальцію, було висловлено гіпотезу про те, користь від застосування німодипіну нівелюється зниженням артеріального тиску, який обумовлений дією німодипіну на організм людини. Тому було проведено дослідження на 265 суб'єктах, які отримували низькі або високі дози німодипіну або плацебо. Відзначалося статистично значуще зниження систолічного та діастолічного артеріального тиску при застосуванні німодипіну, що суттєво корелювало з гіршими результатами, додатково посилюючи роль гіпотонії як рушійного чинника для поганого результату. Ймовірно, використання інших, місцевих, способів доставки, зможе зменшувати небажаний, в даному випадку, гіпотонічний ефект [29, 30].

*Антагоністи NMDA рецепторів.* Головним нейромедіатором у центральній нервовій системі дорослих є глутамат. Він відіграє важливу роль в

передачі імпульсів між синапсами нейронів. Підвищення вмісту глутамінової та аспарагінової кислоти може призводити до ексайтотоксичності, а саме до розладу енергетичного обміну та пошкодження нейронів. Механізм базується на гіперзбудженні рецептору глутамату за участю глутамінової та аспарагінової кислоти, відкриванні кальцієвих каналів, активації NO-синтази яка спричиняє збільшення концентрацій оксиду азоту, що в сукупному результаті викликає окисдований стрес та апоптоз [31].

Ексайтотоксичність – один з патологічних процесів, який виникає при ішемічному інсульті, та призводить до смерті нейронів. Так, спочатку спостерігається виснаження АТФ, що призводить до виходу з ладу іонних насосів, які підтримують поляризацію мембран. Вподальшому деполяризація та підвищення вмісту цитозольного  $Ca^{2+}$  та  $Na^{+}$  призводить до цитотоксичного ефекту. З метою блокування активності глутамату дослідники використовували декстрометорфан, який є неконкурентним антагоністом NMDA-рецепторів та легко проходить через ГЕБ. Його застосування зменшувала нейрональну смертність на моделях ішемії у тварин [32, 33]. В якості блокатору кальцієвих каналів вчені досліджували можливість застосування магнію хлориду внутрішньочеревинно. Дослідження на щурах показало, що введення магнію хлориду зменшувало розмір отриманого інфаркту. Авторами Kuzenkov V. S., Krushinskii A. L. проводилось дослідження щодо впливу нітрату магнію, сульфату магнію та хлориду магнію на розвиток неврологічних розладів та смертності у щурів з експериментальною церебральною ішемією. Встановили, що магнію нітрат проявив більш значний захисний ефект на динаміку неврологічної патології в порівнянні з магнію хлоридом та магнію сульфатом [34].

В якості неконкурентного антагоністу рецепторів NMDA, який може блокувати дію ексайтотоксичних амінокислот, відоме застосування кетаміну. Дослідженнями *in vitro* та *in vivo* встановлена можливість захисту нейронів від пошкодження при ішемії [35, 36].

Іншими дослідженнями вивчалась можливість впливу прогестерону на перебіг ішемічної хвороби шляхом взаємодії з рецепторами NMDA. Прогестерон вводили підшкірно щурам після тимчасової оклюзії мозкової артерії. Встановили, що лікування прогестероном приводило до регуляції NR1, NR2A та NR3B, завдяки можливому нейрозахисту стероїдів шляхом взаємодії з рецепторами NMDA [37].

Guo Yu.1, Fei Wu.2 Er-Song Wang проводили вивчення можливості сполуки BQ-869 щодо блокування NMDA-рецепторів у щурів з індукованою церебральною ішемією. Встановили, що зазначена сполука є потужним антагоністом рецепторів NMDA, яка сприяє зменшенню розмірів церебральної ішемії та смертності від інсульту [38].

*Інгібітори апоптозу.* Каскад патологічних процесів при ішемічному інсульті поступово призводить до апоптозу нервових клітин. В якості апоптичних факторів, які беруть участь в ішемії головного мозку, відомі білки Bcl-2, протеази каспаза-3, фосфатидилінозитид 3-кіназа, АМФ-активована протеїнкіназа. Апоптоз при ішемічному інсульті може тривати від кількох днів до декількох тижнів. Каспази відіграють в цьому процесі ключову роль медіатора апоптозу та неродегенерації. Вплив активності каспаз розповсюджується також на можливе підсилення запалення або на гліальну функцію [39, 40].

З метою інгібування каспази-3, для досягнення нейропротективного ефекту проводили дослідження щодо застосування сполук природного походження отриманих з Магнолії лікарської. Встановили, що отримані сполуки дозволяли захищати мозок від ішемічного пошкодження та аутофагії [41].

Автори проводили дослідження щодо вивчення нейропротекторної дії резвератролу (природної поліфенольної сполуки), який може регулювати експресію – PI3K/AKT/mTOR. Дослідження проводили на щурах, ішемію індукували шляхом оклюзії мозкової артерії протягом двох годин з подальшою добовою реперфузією. Використання імуногістохімії та вестернблотингу

дозволило виявити наступне. Резерватол покращував неврологічну функцію, зменшуючи об'єм інсульту, а також послаблював апоптоз нейронів завдяки інгібуванню PI3K/AKT з LY294002 та JAK2/STAT3 з AG490 [42].

*Модифікатори оксидативного стресу.* Оксидативний стрес відіграє важливу роль в патофізіологічному процесі церебральної ішемії та пов'язаний з підвищенням продукування активних форм кисню, активних видів азоту, які пригнічують нормальну функцію ліпідів, а також білків. Вільні радикали, такі як гідроксил, перекис водню, супероксид, пероксинітрит, завдяки своїй потужним окиснюваним властивостям викликають оксидативний стрес та розвивають апоптоз клітин під час мозкового інсульту. Гіпоксія перериває процес окисного фосфорилування дихального ланцюга мітохондрій, що призводить до поляризації мітохондрій та активній продукції різних форм кисню. Активація рецепторів NMDA ініціює виникнення синтазу оксиду азоту (NOS), яка далі каталізує L-аргінін з утворенням NO, що призводить до продукції пероксинітриту. Використання антиоксидантів, які будуть поглинати окислювальні радикали, є перспективним для інгібування оксидативного стресу ішемічного пошкодження [43-45].

В якості інгібітора оксидативного стресу вчені досліджували можливості застосування активного інгредієнту тимохінону, який отримують з *Nigella Sativa*. Даний АФІ може впливати на оксидативний стрес та запальний процес при ішемічному інсульті, також він може застосовуватись в якості нейрофармакологічного агенту при різноманітних неврологічних захворюваннях. Застосування тимохінону при ішемії зменшувало оксидативний стрес, нейрозапалення та кількість загиблих нейрональних клітин, забезпечуючи підтримуючу та захисну функції нейронів. Використовуючи неінвазивний шлях введення у вигляді мукоадгезивної емульсії вдалось досягти покращення нейроповедінкової активності при ішемії головного мозку [46].

Ебселен – сполука, яка реагує з пероксинітритом, пригнічує ліпооксигенази, синтази оксиду азоту, протеїнкінази С та Hz/Kz-АТФазе. Проведеними дослідженнями на щурах лінії Вістар встановлено, що Ебселен

проявляє антиоксидантні, нейропротекторні властивості завдяки зменшенню продукування малонового діальдегіду та збільшенням активності супероксиддисмутази в тканинах мозку [47]. Також, деякий час тому, його застосовували для лікування інсульту протягом 24 год після виникнення інсульту [48].

Досить поширеним інгібітором NOX, який застосовують в дослідженнях експериментального інсульту – є апоцинін, також відомий як ацетованілон. Апоцинін – це природна органічна сполука, яку початково виділили з кореня *Arosynum cannabinum* та *Picrorhiza kurroa*. *Arosynum cannabinum*, *Picrorhiza kurroa* лікарська рослинна сировина, яка широко застосовувалась в народній медицині Азії та Китаю для лікування запальних захворювань [49, 50]. В дослідках на тваринах апоцинін відновлював потенціал мембран мітохондрій та активність мітохондріальних ферментів за рахунок інгібування активних форм кисню та взаємодії між НАДФН-оксидазою та мітохондріальними комплексами. В результаті у дослідних ішемізованих щурів зменшувався дефіцит поведінки та нейрозапалення [51].

*Протизапальні засоби.* Церебральна ішемія супроводжується запальним процесом, при якому відбувається накопичення лейкоцитів та активація мікроглії, що в результаті призводить до продукування різноманітних запальних цитокінів, а також токсичних метаболітів та ферментів у мікроглії, що призводить до збільшення експресії молекул клітинної адгезії [52, 53]. В гострій фазі ішемічного інсульту активується мікроглія, а потім імунні клітини транспортуються в перинфаркт та інфарктне ядро. Далі формується постінсультна запальна реакція, в якій беруть участь ішемізовані нейрони та запальні цитокіни.

Доклінічні та клінічні дослідження, опираючись на механізми запального процесу, припускають ефективність напрямків протизапальної корекції в терапії ішемічного інсульту. Активація периферійної імунної відповіді в мікроглії призводить до вивільнення інтерлейкіну (IL)-1 $\beta$ , а також до продукції фактора некрозу пухлини TNF, який знову надходить у запальний каскад,



індукуючи вироблення цитокінів та хемокінів в клітинах ендотелію та астроцитах. Впливаючи на протизапальні цитокіни, наприклад такі як фактор некрозу пухлини, інтерлейкіни: ІЛ-1, ІЛ-6 та ІЛ-10, є перспективним. Проте необхідно враховувати, що ці цитокіни мають регуляторні функції і їх нейтралізація може призводити до побічних ефектів [54-58].

## 1.2 Аналіз даних літератури щодо інтраназальних лікарських форм для місцевого застосування

Ніс, в організмі людини, крім дихання, виконує також бар'єрну функцію попереджуючи потрапляння пилу, мікроорганізмів та інших чужорідних частинок, характеризується наявністю розгалуженого лабіринту ходів та пазух, які з'єднуються між собою через вузькі отвори. При виникненні запалення слизової оболонки носової порожнини, завдяки набряку, спостерігається накопичення густого слизу в пазухах. Порушення носової прохідності призводить до закладеності носа, головного болю, надмірного виділення слизу, погіршення слуху, відсутності запаху [59-61].

Відомими причинами запалення слизової оболонки носа (риніт) є – переохолодження, зниження імунітету, вірусні інфекції, бактеріальні інфекції, алергени, потрапляння в носову порожнину чужорідних тіл. Характер перебігу риніту є гострим, та хронічним. Гострий риніт обумовлений переохолодженням, потраплянням бактерій або вірусів протікає від одного дня до тижня. Перебіг хронічного риніту більш тривалий в часі, характеризується наявністю ускладнень патологічних процесів або ж некоректно обраною тактикою лікування іншої патології [62-64].

Для лікування риніту використовують назальні препарати місцевої дії в залежності від напрямку фармакотерапії [65-70]:

- деконгестанти (нафазолін, тетразолін, ксилометазолін, оксиметазолін, фенілефрін, тромазолін, феноксазолін, епінефрин, метізолін, тімазолін);
- антибактеріальні (фраміцетин, мупіроцин, протеїнат срібла),

- противірусні (інтерферон рекомбінантний людський альфа-2b, оксолін, ацикловір);
- гормональні (беклометазон, будесонід, флутиказон, мометазон, дексаметазон);
- протиалергійні (кромогліцієва кислота, азеластин, лоратадин);
- розріджуючі слиз (ацетилцистеїн);
- препарати рослинного походження (ефірні олії сосни, м'яти перцевої, евкаліпту, екстракт цикламену європейського);
- сольові розчини (розчин натрію хлориду ізотонічний, гіпертонічний, гіпотонічний).

Незважаючи на чималий асортимент назальних засобів для місцевого застосування, нині продовжуються дослідження по вдосконаленню існуючих або ж створенню нових засобів. Наприклад, алергічний риніт викликає запалення носової порожнини, що призводить до погіршення проходження потоку повітря через ніс. Проведеними дослідженнями в Department of Otolaryngology and Head and Neck Surgery, Бразилія на пацієнтах віком від 18 до 30 років було встановлено, що у хворих з алергічним ринітом достовірно краще на таких показниках, як об'єм носової порожнини та піковий носовий потік вдихання, спостерігалась позитивна динаміка лікування з застосуванням кортикостероїдів [71].

Нині, місцеві кортикостероїди застосовуються для зменшення дихальних шляхів. Автори *in vivo*, на лабораторних мишах, проводили дослідження впливу будесоніду на моделі пошкодження назального епітелію трихлороцтовою кислотою. Тварин поділяли на групи, в яких викликали пошкодження назального епітелію. Далі застосовували будесонід назально, або назально розчин натрію хлориду. В контрольній групі не здійснювали пошкодження епітелію. Встановили, що назальне використання будесоніду може зменшити деструктивні наслідки пошкодження епітелію на моделі з трихлороцтовою кислотою. Ці результати окреслюють новий цитопротекторний ефект кортикостероїдів на назальний епітелій з

перспективністю використання місцевих кортикостероїдів для профілактичного застосування [72-76].

При хронічному синуситі можливе застосування місцевих антибіотиків назальним шляхом. Подвійним сліпим, рандомізованим контрольованим дослідженням було застосовано в якості діючої речовини тобраміцин. В іншому рандомізованому дослідженні назально було використано офлоксацин. Проте декількома ретроспективним дослідженнями було виявлено, що місцеві антибіотики змінюють бактеріальну флору носових пазух, тому для обґрунтованого використання антибіотикотерапії доцільно проводити великі рандомізовані дослідження [77-81].

Медикаментозний риніт (*Rhinitis medicamentosa*) часто виникає при тривалому застосуванні місцевих назальних протизастійних засобів. В якості дієвих препаратів для лікування медикаментозного риніту використовують АФІ гормональної природи, деконгестанти, та судинозвужуючі засоби [82-86]. Автори проводили дослідження з метою вивчення застосування ксиліту на пошкоджену слизову оболонку носа внаслідок медикаментозного риніту. Досліди проводили на лабораторних щурах лінії Wistar. В результаті було встановлено, що ефективність ксиліту подібна мометазону, застосування якого коштовніше в порівнянні з ксилітом [87].

В геріатричній практиці відоме застосування сольового назального розчину натрію хлориду в якості назального деконгестанту [88-90]. Дослідниками в рандомізованому, проспективному, перехресному контрольованому дослідженні на 42 пацієнтах літнього віку, у яких спостерігалась сухість носа та супутні симптоми, проводили вивчення застосування ізотонічного розчину натрію хлориду та олії чорного тмину (*Nigella Sativa*). В результаті встановили, що використання олії чорного тмину, в порівнянні з ізотонічним розчином натрію хлориду достовірно краще впливає на сухість носу, непрохідність та утворення кірок. Не спостерігалось достовірно суттєвої різниці між впливом олії чорного тмину та ізотонічного розчину натрію хлориду на свербіж та печіння в носі [91].

Виникнення алергічного риніту обумовлене підвищеною чутливістю організму до алергенів. Часто дана патологія має сезонний тип течії, який пов'язують з цвітінням рослин, розповсюдженням пилку або іншої природою алергенів [92-94]. Авторами проводилось дослідження на 25 пацієнтах щодо впливу антигістамінного азеластину-назального спрею, який застосовується для лікування алергічного риніту, на носову та носоглоткову мікрофлору. Встановили, що використання азеластиновго назального спрею протягом одного місяця не мало статистично значущого впливу на кількість мікрофлори носа та носоглотки. Проводились також інші дослідження на 60 пацієнтах з алергічним ринітом в анамнезі. Пацієнтів поділяли на групи, перша група приймала азеластин, друга група – назальний спрей мометазону фуuratoу, третя група – ізотонічний назальний спрей з морською водою. Встановили, що назальний спрей з азеластином та мометазон фуuratoм зменшують закладеність носа та збільшують об'єм носової порожнини в порівнянні з ізотонічним спреєм для носа з морською водою [95, 96].

### 1.3 Аналіз даних літератури щодо інтраназальних лікарських форм для системного застосування

Протягом останніх років назальний шлях розглядається дослідниками як неінвазивний спосіб доставки діючих речовин системної дії в якості альтернативи парентеральному або пероральному введенню [97-103]. На відміну від парентерального шляху назальний спосіб доставки не пошкоджує шкірний покрив. При пероральному прийомі транспортування діючих речовин через шлунково-кишковий тракт, обумовлює можливе руйнування діючих речовин ферментами або ж біотрансформацію при проходженні через печінку.

*Анатомічні особливості назальної доставки.* З анатомічної точки зору, ніс – орган, який забезпечує нюх та виконує бар'єрну функцію (фільтрування різноманітних частинок) завдяки наявному війчастому епітелію та слизу (рис. 1.2).

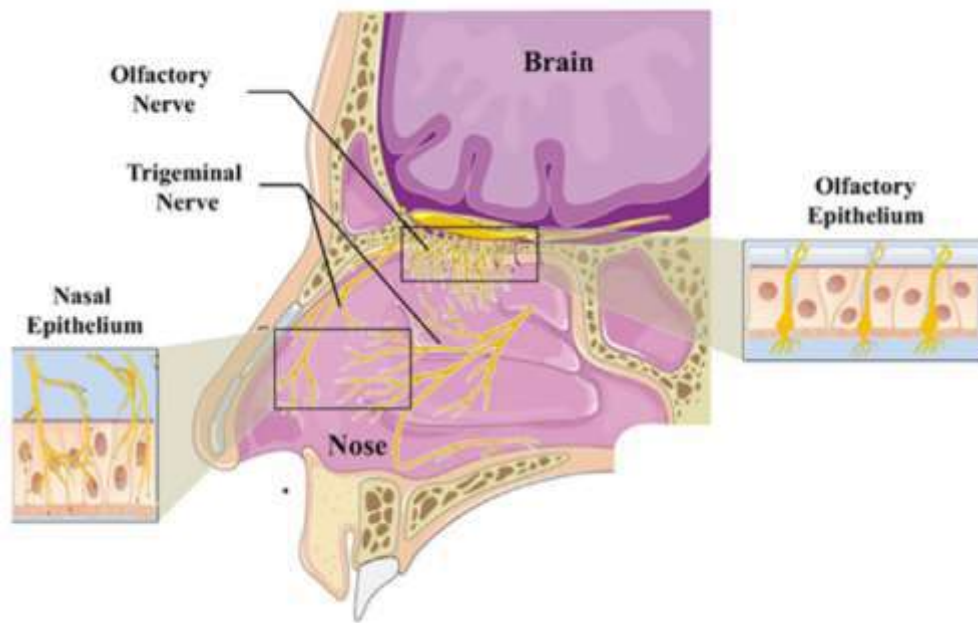


Рис. 1.2. Носова порожнина (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29170026>)

Зовнішній отвір носу складається з носової кістки та хряща. Порожнина носа сягає від зовнішнього отвору до носоглотки. Порожнина носа поділена носовою перегородкою на праву та ліву. В верхній частині носової порожнини знаходиться нюховий епітелій, клітини якого забезпечують здатність відчувати запахи. Нюхові сенсорні нейрони знаходяться на поверхні епітелію, дендрити яких розташовані в внутрішній частині носової порожнини. В носовій порожнині наявна система пазух, які класифікуються як верхньощелепні, лобні, решітчасті та клиновидні. Порожнина носа ділиться також на відділи: вестибулярний, носовий, та нюховий. Вестибулярний відділ фільтрує маленькі частинки пилу, які надходять поряд з повітрям. Носовий відділ, який містить носові раковини – основним місцем для всмоктування діючих речовин, введених назально. Він вкритий епітелієм, який складається з війчатих та невійчатих клітин, а також клітин які секретують слиз. Також нервові закінчення, які є в носовій порожнині, проникають в нюхову цибулину головного мозку. Цей зв'язок є перспективним для транспортування АФІ [104-108].

Слизова оболонка носа має пористий та тонкий епітеліальний шар клітин з відносно великою площею поглинання ( $150 \text{ cm}^2$ ), що спонукає до швидкого

поглинання діючих речовин та низькою можливістю передозування. Слизова порожнина носа вкрита слизом, який представляє собою гель та водний золь. Зазначений секрет містить воду, муцин, альбумін, імуноглобулін, лізоцим, лактоферин та інші білки і ліпіди [59, 104, 109].

Протягом останніх років, проводилися різноманітні дослідження з метою створення назальних лікарських засобів системної дії різних фармакотерапевтичних груп. Назальний шлях введення дозволив транспортувати діючі речовини з різною молекулярною масою до системного кровотоку. Так, білково-пептидні препарати, гормональні засоби та вакцини, зазвичай не використовують перорально в зв'язку з руйнуванням АФІ в шлунково-кишковому тракті [110-115].

*Вакцини.* Використання назальних вакцин перспективно для стимулювання імунного захисту. Проведеними багатьма дослідженнями було встановлено, що найбільш перспективною технологією для транспортування вакцин є наночастинки. В якості елементів наночастинок використовували хітозан, циклодекстрин, мальтодекстрин. В деяких випадках в технологіях виготовлення препарату використовували ліпосоми, наносоми, ліпідні нанокапсули, або ж протеїнові наночастинки [116-120].

В якості назальної форми випуску можуть використовуватись системи з різним дисперсійним середовищем та різною в'язкістю. Використання сухих порошків, в якості назального препарату, є перспективним в зв'язку з кращою фізичною та хімічною стабільністю в порівнянні розчинами. З метою пролонгації знаходження в носовій порожнині препарату пропонується використання мукоадгезивних допоміжних речовин [121, 122].

*Гормональні препарати.* Автори проводили дослідження щодо застосування назально інсуліну в дозі 400 ОД/мл шляхом використання трьох назальних пристроїв для доставки. Проводили визначення розміру крапель, геометрії шлейфу, розпилення та осадження на носовій пов'язці. Встановили, що оптимальний пристрій для доставки забезпечує кут розпилення від 30° до 45°; розмір крапель від 20 до 50 мкм. За допомогою магнітно-резонансної

томографії було виявлено, що назально-введений інсулін достовірно краще в порівнянні з фізіологічним розчином впливав на інсулінові рецептори [123-127].

Для лікування важкої гіпоглікемії застосовують внутрішньом'язову ін'єкцію глюкагону. В якості альтернативи, запропоновано назальний шлях введення глюкагону. Встановлено, що рівень глюкози та глюкагону в крові після назального та внутрішньом'язового введення були однаковими. Враховуючи, можливу частоту прийому назального препарату, відсутність пошкодження шкірного покриву, та тимчасовий період побічних ефектів доцільно використовувати назальний глюкагон в дозі 3 мг для пацієнтів віком від 4 до 17 років [128-132].

Окситоцин – гормон (циклічний нонапептид), який продукується в гіпоталмусі і секретується в кровотік з задньої долі гіпофізу. Згідно літературних даних окситоцин – нейротрасмітер, який, ймовірно, можна застосовувати для лікування аутизму. В результаті дослідження встановили, що концентрація окситоцину після назального застосування, була вищою в порівнянні з парентеральним введенням. Крім того ефект зняття стресу спостерігався тільки після назального прийому. Тобто назальне застосування є перспективним транспортом речовин для системного застосування [133-138].

В якості назальної системи доставки дексаметазона запропоновані ліпідні/альгінатні наночастинки, які дисперговані в розчині пектину. Характеристики наночастинок – розмір  $252,3 \pm 2,4$  нм, індекс полідисперсності 0,241, дзета-потенціал  $-31,7 \pm 1,0$  мВ, вміст дексаметазона  $255 \pm 7$  мкг/мл. В'язкість гелю, який отримали при змішуванні суспензії наночастинок в безпервній фазі опектину з імітацією носового слизу, характеризується лог-лінійним зсувом. Отриманий гель забезпечував помірне трансепітеліальне проникнення *in vitro*. В результаті встановили, що отриманий розчин можливо розпилювати в назальній порожнині з метою тривалішого контакту з слизовою оболонкою носа [139].

*Анальгетики.* В якості альтернативи парентеральним лікарським засобам для лікування больових синдромів наркотичними анальгетиками пропонується використання назального шляху. Так, для морфіну були запропоновані назальні форми з хітозаном, фосфатидилхоліном, або підсилювачем абсорбції – олеїною кислотою. Застосування буторфанолу назально без підсилювачів абсорбції та спеціальних технологій, наприклад таких як мікросфери, забезпечує біодоступність у пацієнтів понад 80%. Використання фентанілу з мукоадгезивами (хітозан, пектин) дозволило збільшити час контакту препарату з назальним епітелієм, що привело до тривалішого вивільнення і збільшення  $T_{max}$ . Оптимізація лікарської форми за рахунок промоторів адсорбції та складу лікарської форми може впливати на швидкість всмоктування [140-145].

З метою нівелювання негативних побічних реакцій з боку шлунково-кишкового тракту, кеторолаку було виготовлено мукоадгезивні мікросфери для назальної доставки. Для виготовлення використовували карбопол, полікарбофіл та хітозан, технологія – розпилувальна сушка. Мікросфери стандартизували по морфологічним характеристикам, ефективності інкапсуляції, набуханням, вивільненням діючої речовини *in vitro*. Було встановлено, що технологічний процес суттєво впливає на розмір частинок та вихід мікросфер. Вивільнення кеторолаку найкраще характеризує модуль Хігучі. Мікросфери виявились нетоксичними для слизової носу [146].

Проводили порівняння назальних форм мікроемульсії та нанонемульсії трамадолу для лікування епізодичного та невідкладного болю. Досліди *in vivo* та назальну токсичність проводили на слизовій оболонці носа вівців. Фармакокінетичні дослідження проводили на мишах. Отримані глобули трамадолу мали розміри –  $16,69 \pm 3,21$  и  $136,3 \pm 4,3$  нм. Встановили, що отримані лікарські форми, в порівнянні з розчином трамадолу, показали кращий ефект протягом 16 год [147].

Для лікування больового синдрому використовуються наркотичні та ненаркотичні анальгетики. Застосування назальних форм анальгетиків – це новий напрямок фармацевтичної технології. З метою створення назальної



форми мелоксікаму використовували сольову форму мелоксікаму. Контролювали мукоадгезивні властивості, структурний аналіз, швидкість розчинення. Проведеними дослідженнями встановили, що носова форма мелоксікаму демонструвала більш швидке розчинення та проникність в тестах *in vitro*. Зроблене припущення, що низька мукоадгезивність не забезпечувала тривале утримування препарату в носовій порожнині. Перспективні подальші дослідження [148-152].

Кеторолак трометамін широко застосовується для лікування болю помірного характеру. Назальне застосування кеторолаку у вигляді розчину має недолік у зв'язку з витіканням з носової порожнини. В якості допоміжних речовин запропоновано використання термо- та іоночутливих гідрогелів, на базі полоксамеру 407(P407) та деацетильованої геланової камеді (DGG). Розроблений склад містив 3% P407 та DGG 18%, також були використані підсилювач проникнення (сульфобутиловий естер- $\beta$ -циклодекстрин 2,5%) та бактеріальний інгібітор (хлорбутанол 0,5%). Встановили, що запропонований назальний гель мав заплановану температуру гелеутворення, задовільне вивільнення діючої речовини та очевидний фармакодинамічний ефект [153-158].

*Вітаміни.* В якості альтернативного шляху застосування вітаміну B<sub>12</sub> запропоновані назальні краплі. Дослідження проводили на п'ятдесят одному пацієнті. Встановили, що розроблені назальні краплі значно підвищували рівень вітаміну B<sub>12</sub> в крові, дві третини пацієнтів повідомили про позитивний ефект, який збільшував кількість кроків, а також шкали функціонування RAND-36 та втомлюваності CIS20г. В педіатричній практиці лікування дефіциту вітаміну B<sub>12</sub> обумовлює використання ін'єкцій, які викликають значний стрес у пацієнтів. Наразі в якості альтернативи запропоновано спрей з вітаміном B<sub>12</sub>, який суттєво збільшував концентрацію вітаміну в крові, при цьому не спостерігалось побічних реакцій. Це спонукає до проведення подальших досліджень з метою виявлення оптимального дозування [159-162].

*Препарати для серцево-судинної системи.* Назальний шлях для транспортування АФІ, які впливають на серцево-судинну систему, використовувався авторами Лисянською Г. П., Гладишевим В. В., Ал Зедан Фаді, Алмохамад Жума з метою створення назальних м'яких лікарських засобів у формі гелів, кремів. Swamy N. G. та Abbas Z. були виготовлені мікросфери амлодипіну бесилату, для назального введення, з метою уникнення метаболізму в печінці під час першого проходу. Для мікросфер був використаний полімер – гідроксіпропілгуар, технологія отримання – метод випаровування розчинника для отримання емульсії вода/олія. Отримані мікросфери мали сипучість, розмір частинок був від  $13,4 \pm 2,38$  мкм до  $43,4 \pm 1,92$  мкм. Ефективність захвату мікросфер від  $67,2 \pm 1,18\%$  до  $81,8 \pm 0,64\%$ . На моделі вивільнення через слизову носа вівців отримані мікросфери забезпечували вивільнення діючою речовиною протягом 8 год та мали добрі мукоадгезивні властивості [163-167].

Верапамілу гідрохлорид, при пероральному прийомі, має низьку біодоступність (близько 20%), яка обумовлена ефектом першого проходження. Дослідниками була запропонована альтернативна назальна форма верапамілу гідрохлориду у вигляді хітозанових мікросфер. Мікросфери виготовляли методами розпилювальної сушки та осадження. Для підтвердження їх якості використовували електронну мікроскопію, метод лазерної дифракції, диференційну скануючу калориметрію, а також вивільнення *in vitro*. Біодоступність вивчали на кролях, результати порівнювали з внутрішньовенним введенням. В результаті виявили, що отримані мікросфери мали сферичну форму розміром 21-53 мкм. Метод розпилювальної сушки виявився більш ефективним в порівнянні з методом осадження по ефективності інкорпорування верапамілу. Показники біодоступності назального верапамілу були вищими в порівнянні з пероральним прийомом [168].

*Препарати для лікування мозкових порушень.* Нагорною Н. О. та Рогачовим І. О. проводилися дослідження щодо створення м'яких назальних засобів церебропротективної дії для терапії цереброваскулярних захворювань. Для назальної доставки Ling Yuan Chin, з співавторами, був розроблений

мукоадгезивний наноемульгель з телмісартаном. В якості допоміжних речовин використовували Sefsol 218, олеїнову кислоту, Tween 20, Transcutol P, а також розчин хітозану. Для підтвердження якості отриманих наногелів проводили оцінку розміру крапель, їх розподіл за розмірами, дзета потенціал, рН, та в'язкість. Також проводили оцінку мукоадгезивних властивостей, характер вивільнення *in vitro*, а також механізм проникнення *ex vivo* через слизову кози. Встановили, що вивільнення наноемульсії телмісартану ( $71,71 \pm 5,32\%$ ) відбувається протягом 12 год, що обумовлено, ймовірно, наявністю хітозановго покриття. Найбільш висока швидкість вивільнення спостерігалась у наноемульгелі з низькою та середньою масою хітозану. Динаміка вивільнення телмісартану з назального емульгелю *in vitro* характеризується кінетикою першого порядку [169-171].

Мігрень – неврологічне захворювання, приступи якого розвиваються швидко, часто з тошнотою, рвотою, що ускладнює застосування пероральних засобів. Найбільш часто для терапії мігрени застосовують пероральні триптани, наприклад суматриптан, пероральне, та парантеральне застосування яких супроводжується побічними ефектами. В якості назального засобу суматриптану розроблено назальний порошок, з патентованим назальним пристроєм Breath Powered. Проводилися клінічні дослідження для порівняння біодоступності суматриптану в формах випуску: назального порошку, назального спрею, пероральних таблеток та підшкірних ін'єкцій. Дослідження проводили на 20 здорових пацієнтах. Встановили, що незважаючи на нижчу дозу суматриптану в назальному порошку, в порівнянні з іншими формами, назальний порошок забезпечував більш швидке всмоктування чим назальний спрей та таблетки, проте спостерігалось менша системна дія в порівнянні з таблетками та підшкірними ін'єкціями [172-175].

Проводилися дослідження з метою вивчення ефективності назального спрею золмітриптану при лікуванні гострого мігреню. Після застосування назального засобу, встановлено, що золмітриптан не тільки зменшує головний

біль на 85%, але і позитивно впливає на такі симптоми мігрені, як світлочутливість, фонофобія та тошнота [176].

Авторами вивчалася можливість створення назальної форми з куркуміном для можливої терапії депресивних станів. Назальна форма представляла собою термочутливий гель на базі гуанідину-хітозану з куркуміном. В'язкість отриманого гелю збільшується в діапазоні температур 29-30 °С. Розроблений гель має хороші мукоадгезивні властивості. В досліджах *in vitro* кумулятивна швидкість вивільнення куркуміну склала 55% впродовж 10 год [177-181].

Вченими проводилися дослідження щодо створення термочутливого назального препарату з мукоадгезивними властивостями, який змінює свої характеристики при фізіологічній температурі в носовій порожнині. Для назальної доставки ібупрофену в якості допоміжних речовин використовували термочутливий хітозан різної молекулярної маси. Для підтвердження якості отриманого препарату проводили фізико-хімічні, реологічні, біофармацевтичні дослідження. Розроблений склад забезпечував швидке гелеутворення (4-7 хв) при температурі 30-35 °С, близькій до температури носової порожнини. Використання хітозану з молекулярною масою 110-150 кДа забезпечило розпилення на більшій площі поверхні [182].

Автори проводили вивчення біодоступності галантаміну при назальному застосуванні з наночастинками хітозану у порівнянні з назальним спреєм без хітозану і пероральним застосуванням. Модифіковані наночастинки хітозану виготовляли методом іонного гелеутворення, ефективність назальної доставки оцінювалась на моделі скополамінової анаестезії та біохімічній оцінці активності холінестерази в мозкові мишей-альбіносів. В якості контролю використовували пірацетам 400 мг/кг внутрішньочеревним введенням. Досліди проводили протягом 7 днів. Результати досліджень показали, що назальне використання модифікованих наночастинок хітозану з галантаміном достовірно краще впливало на одужання мишей в порівнянні з простим

назальним застосуванням розчину галантаміну та пероральним застосуванням галантаміну [183-185].

Донепезил (DPZ) широко застосовується при лікуванні хвороби Альцгеймера у формі таблеток. З метою підвищення біодоступності та швидкості настання терапевтичного ефекту вченими проводились дослідження щодо створення нових назальних форм, які матимуть кращу проникність через гематоенцефалічний бар'єр. В результаті було створено наноемульсії, ліпосомальні гелі. Проведені фармакокінетичні дослідження ліпосомального донепезилу гідрохлориду, який диспергували в модифікованому гелі хітозану. Для підтвердження якості отриманої назальної форми використовували електронну мікроскопію, ультраефективну рідинну хроматографію, діалізну мембранну техніку. Середній розмір частинок ліпосомального донепезилу та ефективність захвату складала –  $438,7 \pm 28,3$  нм і  $62,5\% \pm 0,6$  відповідно. Результати контрольованого вивільнення ліпосомального донепезилу гідрохлориду показали, що період напіввивільнення його складає 3,5 год. Стабільність ліпосомального гелю була кращою при температурі 4 °С. В порівнянні з пероральним застосуванням, назальний ліпосомальний гель з донепезилу гідрохлоридом забезпечував кращий середній вміст препарату в головному мозку [186-189].

В якості альтернативного шляху доставки прогестерону, з метою забезпечення нейопроективної дії, був запропонований інтраназальний шлях. В зв'язку з фармакокінетичними обмеженнями введення цієї молекули, запропоновано використання мукоадгезивних частинок гідрогелю для підвищення адсорбції. Отримували наночастинки з різною концентрацією прогестерону шляхом утворення поліелектролітного комплексу між триметилхітозаном і альгінатом натрію з подальшим іонотропним гелеутворенням з триполіфосфатом натрію. Отримані частинки мали розмір від 200 до 236 нм, індекс полідисперсності 0,23, ефективність інкапсуляції прогестерону – 83-95%. Дзета потенціал отриманих систем був позитивним та перевищував 28 мВ, що характеризувало отримані наночастинки як стабільні

від явищ агрегації, а також можливою відсутньою взаємодією з негативним зарядом слизової оболонки носа. В дослідях *in vitro*, на щурах, після 30 хв інгаляції, спостерігали збільшення концентрації в 5 раз більше в порівнянні з базальним рівнем прогестерона [190-193].

#### 1.4 Характеристика видів назальної упаковки

При створенні препаратів для назального застосування необхідно проводити вибір засобу для забезпечення збереження лікарського препарату в незмінному стані при зберіганні, транспортуванні та використанні. Такий засіб (упаковка) повинен також ефективно транспортувати лікарський препарат до назальної порожнини. Упаковка повинна містити інформацію для пацієнтів та спеціалістів охорони здоров'я з метою однозначної ідентифікації, інформування про застосування та зберігання. Первинна упаковка має безпосередній контакт з лікарським препаратом, вторинна упаковка контактує тільки з первинною упаковкою [194-204].

Проведений аналіз систематизованої інформації у створеній нами бібліотеці по назальним лікарським засобам дозволив виявити наступні типи упаковки.

*Упаковка для недозованих назальних лікарських препаратів.* Застосовується для доставки лікарського препарату до назальної порожнини у відносній кількості (рис. 1.3) шляхом вприскування або вдихання. Вимога до однорідності дозування (однорідність маси, що витягується) не характерна для такої упаковки. Прикладом можуть бути назальні сольові розчини для промивання носа або олівці (баночки з кришкою) для інгаляцій (бальзам «Зірка» з ефірними оліями).



Рис. 1.3. Упаковка для недозованих назальних засобів

*Упаковка для дозованих назальних засобів багаторазового застосування.* Даний вид упаковки, головним чином завдяки своїй конструкції, забезпечує дозоване вивільнення назального препарату в носову порожнину. Тому серед специфічних методів контролю такої упаковки обов'язково присутній метод однорідності дозування.

*Упаковка-флакон з піпеткою.* Даний вид упаковки застосовується для транспортування назальних крапель низької в'язкості (рис. 1.4). Дозування препарату забезпечується піпеткою.



Рис. 1.4. Упаковка флакон з піпеткою

Характер використання зазначеної упаковки обумовлює, після внесення крапель до носової порожнини, відкидання пацієнтом голови назад, на деякий час, з метою попередження витікання препарату.

*Безпропелентна аерозольна упаковка.* Характеризується відсутністю пропеленту (газу під тиском) та наявністю механізму для виштовхування вмісту флакону до носової порожнини. В якості механізму використовується насос з системою сполучних патрубків та розпилювальної насадки (рис. 1.5).



Рис. 1.5. Безпропелентна аерозольна упаковка

Такий спосіб доставки дозволяє глибше транспортувати рідкий лікарський препарат з низькою в'язкістю до носової порожнини. Серед характерних вимог до такої упаковки обов'язковим є контроль однорідності дозування (однорідність маси, що витягується).

*Упаковка з пропелентом.* Даний вид упаковки характеризується наявністю газу в балоні під тиском, який через відповідний клапан забезпечує розпилення вмісту балону в носовій порожнині (рис. 1.6).



Рис 1.6. Пропелентна аерозольна упаковка

Глибина доставки у носову порожнину та ступінь дисперсності розпилення у даного типу упаковки найвища. Проте, наявність газу під тиском в упаковці є вибухонебезпечним та технологічно складним при фасуванні лікарського препарату в порівнянні з іншими видами упаковки.

*Упаковка для дозованих назальних засобів одноразового застосування.*  
*Пристрій для розпилення назальних засобів.* Даний вид упаковки призначений для розпилення назальних засобів шляхом введення розчину для розпилення в циліндр з поршнем (шприцем типу Луер) та продавливання його через спеціальну насадку (рис. 1.7).



Рис. 1.7. Назальний атомайзер (MAD Nasal™)



В результаті руху поршня виникає тиск, який дозволяє розпилювати рідини з низькою в'язкістю(водні розчини).

Відомий також інший вид упаковки, який дозволяє транспортувати одну дозу попередньо запакованого назального розчину до носової порожнини (рис. 1.8).



(Unidose (UDS)  
Systems)  
(A)



Unidose® Xtra nasal spray  
(bepak.com)  
(B)



(B)

Рис. 1.8. Однодозові упаковки для назальних засобів

Однодозові упаковки типу А, Б обумовлюють натискання великим пальцем поршня для транспортування розчину тонким струменем в назальну порожнину. Даний вид упаковки може застосовуватись в невідкладних станах неспеціалістами для швидкого введення препаратів. Для застосування однодозової пластикової упаковки типу В потрібно відкрутити верхню частину флакону-крапельниці шляхом повороту насадки. Після відокремлення верхньої частини флакону необхідно голову пацієнта нахили в бік і здійснити закапування. Зазначений тип упаковки часто застосовується для сольових розчинів з метою механічної евакуації вмісту носової порожнини.

## РОЗДІЛ 2

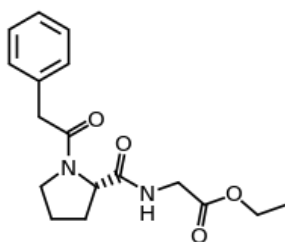
### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Об'єкти дослідження

##### Діючі речовини

*Noopenm* (N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester, Omberacetam) (CAS 157115-85-0, PubChem CID 180496, UA/7187/01/01)

Формула:  $C_{17}H_{22}N_2O_4$ , Молекулярна маса: 318,4 г/моль



Синтетичний дипептид. Субстанція білого кольору, малорозчинна в воді, добре розчинна в спирті та хлороформі, практично не розчинна в естері. Проявляє позитивні нейропротективні, ноотропні та когнітивні ефекти.

*Рекомбінантний рецепторний антагоніст інтерлейкіну-1  $\beta$*  (Anakinra, Interleukin1 receptor antagonist, IL-1Ra, CAS №143090-92-0, drugbank Accession Number DB0002, ЛСР-007452/10)

Формула:  $C_{759}H_{1186}N_{208}O_{232}S_{10}$ , Молекулярна маса: 17,906 кДа

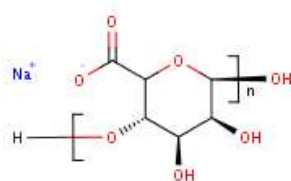


IL-1Ra – продукт біотехнологічного синтезу з використанням системи експресії *E. Coli*, складається з 153 амінокислот, відрізняється від білку людини наявністю додаткового залишку метіоніну на N-кінцевому участку молекули. Субстанція представляє собою напівфабрикат розчин з концентрацією IL-1Ra 50 мг/мл у вигляді прозорої або слабко опалесцюючої рідини. Напівфабрикат

розчин містить також натрію едетат, натрію дигідрофосфату дигідрат, полісорбат та воду для ін'єкцій. Механізм дії анакінри базується на конкурентному зв'язуванні з рецептором інтерлейкіну-1, що призводить до зменшення запалення.

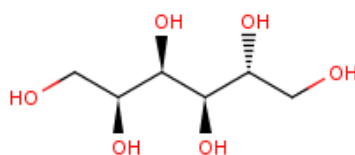
### Допоміжні речовини

*Натрію альгінат* (Natrii alginas, Sodium alginate) (ВР: Sodium alginate, PhEur: Sodium alginate, с. 2909-2910, cas 9005-38-3, PubChem CID 5102882).



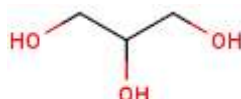
Порошок білого, кремового або жовтувато-білого кольору. Розчиняється в воді з утворенням в'язкого розчину. Практично не розчинний в спирті, хлороформі, естері, водних розчинах з рН<3. Застосовується як стабілізуючий засіб, суспендує агент, дезінтегратор в таблетках та капсулах, модифікатор в'язкості, мукоадгезивний агент, підвищує в'язкість. Має виражені плівкоутворюючі властивості.

*Сорбіт* (D-Sorbitol, sorbitol) (ВР: Sorbitol, PhEur: Sorbitol, cas 50-70-4, PubChem CID 5780).



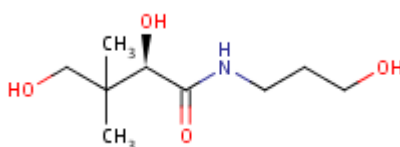
Білий або безбарвний кристалічний гігроскопічний порошок. Добре розчиняється в воді, метанолі, ізопропанолі, бутанолі, циклогексанолі, слабо розчинний в етанолі. Практично не розчиняється в більшості інших органічних розчинників. Добре розчиняється в гарячому етанолі. Застосовується як зволожувач, пластифікатор, стабілізатор, підсолоджуючий агент, наповнювач в таблетках та капсулах.

*Гліцерин* (glycerol, glycerin) (ДФУ: Glycerolum, ВР: Glycerol, PhEur: Glycerol, cas 56-81-5, PubChem CID 753).



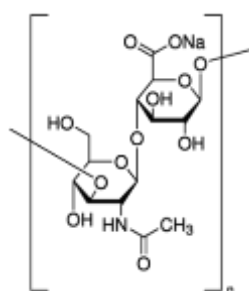
Прозора, безбарвна, в'язка, гігроскопічна рідина, без запаху, має солодкуватий смак. Добре змішується з водою, етанолом. Слабо розчиняється в етиловому естері. Нерозчинний в бензолі, тетрахлориді вуглецю, хлороформі, петролейному естері. Застосовується як зволожувач, засіб для пом'якшення, пластифікатор, розчинник.

*Декспантенол* (Dexpanthenol, D-Panthenol) (PhEur: Dexpanthenol cas 81-13-0, PubChem CID 131204).



Прозора, гігроскопічна, в'язка рідина. При зберіганні можливий випад кристалів. Добре розчиняється в воді, етанолі, метанолі. Слабо розчинний в гліцерині. Погано розчиняється в етиловому естері. Застосовується як зволожувач, протизапальний агент, прискорює реепіталізацію пошкоджених клітин.

*Натрію гіалуронат* (Sodium hyaluronate, natrii hyaluronas) (BP: Sodium Hyaluronate, PhEur: Sodium Hyaluronate, PubChem CID 23663392).



Порошок білого кольору або гранули білого кольору. Гігроскопічний. Розчинний у воді, швидкість розчинності залежить від молекулярної маси. Погано розчиняється в сумішах води та органічних розчинниках. Застосовується як зволожувач, модифікатор вивільнення, лубрикант.

*Натрієва сіль карбоксиметилцелюлози* (Carboxymethylcellulose sodium, Carmellose sodium, *натрій-КМЦ*) (PhEur: Carmellose Sodium, USP-NF: Carboxymethylcellulose Sodium, cas 9004-32-4, PubChem CID 23706213)



Білий або жовтувато-білий порошок. Добре розчиняється в гарячій воді, повільніше в холодній. Не розчиняється в мінеральних оліях та органічних рідинах. Застосовується як загущувач, стабілізатор емульсії, гелеутворювач, плівкоутворювач.

*Твін-80* (*Polysorbate 80, Polyoxyethylene sorbitan monooleate, Tween 80*) (BP: Polysorbate 80, PhEur: Polysorbate 80, cas 9005-65-6, PubChem CID 5281955).



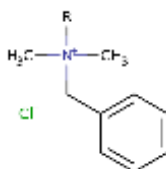
Масляниста рідина, жовтуватого кольору з специфічним запахом. Добре змішується з водою, етилецетатом, метиловим спиртом. Практично не розчиняється в мінеральних маслах та жирних кислотах. Застосовується як неіоногенний емульгатор, стабілізатор, диспергуючий агент, підсилювач адсорбції.

*Кислота бензойна* (Benzoic Acid, Acidum benzoicum) (ДФУ Кислота бензойна, BP: Benzoic Acid, PhEur: Benzoic Acid, cas 65–85–0, PubChem CID 243)



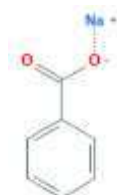
Безбарвні кристали, або дрібнокристалічний порошок. Погано розчинний в воді, розчинний в киплячій воді, легко розчинний в спирті, хлороформі, бензолі, жирних маслах. Застосовується як консервант та антимікробний засіб.

*Бензалконію хлорид* (Benzalkonium chloride, Benzododecinium chloride) (BP: Benzalkonium Chloride, PhEur: Benzalkonium Chloride, cas 8001-54-5, PubChem CID 8753).



Безбарвна, бліда або жовта сполука. Добре розчиняється в етанолі та ацетоні. Розчинення в воді відбувається повільно. Застосовується як консервант, антисептичний та дезинфікуючий засіб.

*Натрію бензоат* (Sodium Benzoate) (BP: Sodium Benzoate, PhEur: Sodium Benzoate, cas 532-32-1, PubChem CID 517055).



Білий зернистий, або кристалічний порошок. Розчинний в воді, етанолі. Нерозчинний в органічних розчинниках. Застосовується як антимікробний агент, консервант.

*Хітозан* (Chitosan) (BP: Chitosan Hydrochloride, PhEur: Chitosan Hydrochloride, cas 9012-76-4, PubChem CID 71853)



Порошок білого або кремово-білого кольору, без запаху. Помірно розчиняється в воді, практично нерозчинний в етанолі. Легко розчиняється в кислих середовищах більшості органічних кислот, крім фосфорної та сірчаної. Застосовується як мукоадгезивний агент, плівкоутворювач, модифікатор в'язкості.

*Кислота лимонна безводна (Citric Acid Monohydrate)* (ДФУ, ВР: Citric Acid Monohydrate, PhEur: Citric Acid Monohydrate, cas 5949-29-1, PubChem CID 22230).



Білий кристалічний порошок, або безбарвні кристали. Легко розчиняється в воді, легко розчиняється в спирті етиловому, помірно розчинна в естері. Застосовується як антиоксидант, консервант, модифікатор рН, буферний агент.

*Динатрію едетат (Edetate disodium, трилон Б)* (ДФУ Динатрію едетат, ВР: Disodium Edetate, PhEur: Disodium Edetate, cas 139-33-3, PubChem CID 8759).



Білий кристалічний порошок. Практично не розчиняється в хлороформі та естері, слабо розчинний в етанолі. У воді розчиняється 1 частина в 11 частинах води. Застосовується, як хелатор.

*Вода очищена (Aqua purificata)* (ДФУ І.2, С. 391). Прозора, безбарвна рідина, без запаху, кольору, смаку, рН від 5,0 до 7,0.

## 2.2 Методи дослідження

При виконанні роботи були використані сучасні методи досліджень [205-212].

2.2.1 Фізико-хімічні, фармако-технологічні, реологічні, біофармацевтичні методи дослідження

*Визначення маси вмісту упаковки* (ДФУ І вид., доп. 1, с. 86).

*Біофармацевтичні дослідження, in vitro*, проводили методом рівноважного діалізу крізь напівпроникну мембрану – целофанову плівку Curophan, Type 150 pm,  $11 \pm 0,5$  мкм завтошки у вертикальних чарунках дифузії дев'ятипозиційній станції Франца Franz Cells (PermeGear, Inc., США). Кожна чарунка містить донорну камеру, в яку поміщали досліджуваний зразок гелю, та акцепторну камеру об'ємом 10 мл, яку заповнювали діалізним розчином (вода очищена). Для рівномірного перемішування діалізного розчину в акцепторній камері додавали магнітну мішалку. Швидкість перемішування діалізного розчину становила 350 rpm. В експериментах використовували повторні досліди, які обробляли статистично.

Температурний режим в експериментальних дослідженнях був різним -  $29 \pm 0,2$  °C,  $33 \pm 0,2$  °C,  $37 \pm 0,2$  °C, що забезпечувалося використанням циркуляційного водяного термостату (Thermo Scientific HAAKE SC100-S5P).

*рН рідких назальних гелів* визначали потенціометрично згідно з вимогами ДФУ (2.2.3) за допомогою рН-метра 150М зі скляним електродом.

*Реологічні дослідження* (ДФУ 2.0, Т. 1, п. 2.2.10) проведено на модульному компактному реометрі MCR 302 (Anton Paar GmbH). Для



проведення ротаційних тестів, в якості вимірювального пристрою використано коаксіальні циліндри CC27/T200/SS. В нижній статичний циліндр поміщали наважку назальної лікарської форми до відповідної заводської відмітки. Виконували ініціалізацію приладу та вказували температуру дослідження ( $29 \pm 0,5$  °C,  $33 \pm 0,5$  °C,  $37 \pm 0,5$  °C), яка забезпечувалась вбудованим термостатом (Peltier temperature control for concentric cylinder systems, C-PTD 200).

Протягом всього дослідження програмне забезпечення (RheoCompass) реєструвало показники швидкості зсуву (Shear rate  $\dot{\gamma}$ ,  $s^{-1}$ ), напруги зсуву (Shear stress  $\tau$ , Pa) та в'язкості (viscosity  $\eta$ , Pas(mPas)). Отримані результати відображались табличних даних та візуалізовувались в реограмах плинину. Алгоритм методики полягав в наступному: перед початком вимірювання верхній рухомий циліндр занурювали в статичний циліндр з попередньо внесеною наважкою дослідного назального засобу. Чекали до стабілізації температури в системі, далі поступово збільшували швидкість обертання верхнього циліндра від 1 до 500 ( $s^{-1}$ ). Потім при максимальній швидкості обертання циліндра протягом 10 хв руйнували дослідний зразок, далі припиняли руйнування і чекали протягом 10 хв для відновлення системи. Після відновлення системи дослідження проводили в зворотному напрямку – від максимальної швидкості обертання циліндра до мінімальної.

Концентрацію високомолекулярної пептидної сполуки - антагоністу інтерлейкіну-1  $\beta$  (IL-1Ra) в назальних формах визначали за адаптованою спектрофотометричною методикою (ультра-фіолетова область, довжина хвилі 280 нм) на спектрофотометрі UV-2600, (Shimadzu Corporation, Японія) [213].

Концентрацію низькомолекулярного АФІ - ноопепту в назальних формах визначали за адаптованою спектрофотометричною методикою при довжині хвилі 258 нм на спектрофотометрі UV-2600, (Shimadzu Corporation, Японія) [214].

### 2.2.2 Токсикологічні методи дослідження

*Характеристика тварин для токсикологічних досліджень.* Досліди виконані на 72 білих безпородних щурах-самках масою 95-110 г і 30 мурчаках обох статей масою 480-520 г, отриманих з розплідника ДУ «Інститут фармакології та токсикології АМН України». Тривалість карантину (акліматизаційного періоду) для всіх тварин становила 14 днів. Протягом карантину проводили щоденний огляд кожної тварини (поведінку і загальний стан), двічі в день за тваринами спостерігали в клітинах (захворюваність і смертність). Перед початком дослідження тварини, що відповідають критеріям включення в експеримент, були розподілені на групи за допомогою методу рандомізації. Тварини, які не відповідають критеріям, були виключені з дослідження протягом карантину. Клітини з тваринами були поміщені в окремі кімнати. Світловий режим: 12 год – світло, 12 год – темрява. Температура повітря підтримувалася в межах 19-25 °С, відносна вологість – 50-70%. Температура і вологість повітря реєструвалися щодня. Було встановлено режим провітрювання, що забезпечує близько 15 обсягів приміщення на год. Дослідних тварин утримували на однакових раціонах, в звичайних умовах віварію. Тварини містилися в стандартних клітках – щури з 5 особин в клітці, мурчаки – по 1 тварині в клітці. Раціон харчування – фуражне зерно, хліб, коренеплоди (буряк, морква).

*Визначення гострої токсичності.* Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою 98-110 г, згідно з рекомендаціями ДФЦ МОЗ України та іншими рекомендаціями. У кожній групі було по 6 тварин. Досліджувані гелі вводили інтраназально за допомогою шприца-дозатора в максимально допустимому обсязі для цього шляху введення – 0,4 мл. Реєстрували протягом 14 діб загибель тварин і зміни з боку серцево-судинної системи, системи дихання, ЦНС, рухової активності.

*Дослідження алергізуючої та шкірно-резорбтивної активності методом нашкірних аплікацій.* Вивчення проводили на білих безпородних щурах обох статей масою 120-150 г (2 групи – контроль і дослід по 10 тварин у кожній),

згідно з рекомендаціями ДФЦ МОЗ України та іншими рекомендаціями. На бічній поверхні тулуба тварин вистригали волосяний покрив на ділянці 4×4 см. На цю ділянку шкіри наносили 0,5 г гелю, після чого тварин поміщали на 4 год в індивідуальні клітини для запобігання злизування препарату. Аплікацію гелю проводили шляхом 20 повторних нашкірних аплікацій по 5 разів на тиждень. Реакцію шкіри враховували щодня за шкалою оцінки шкірних проб. Перше тестування проводили після 10 аплікацій (у разі виявлення алергії подальше нанесення гелю передбачалося припиняти). При негативному або сумнівному результаті число аплікацій обов'язково планували збільшити до 20. Оцінку результатів алергізуючої активності гелю методом нашкірних аплікацій проводили згідно з відповідною шкалою (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

### Шкала для оцінки аплікаційних шкірних тестів

Позначення реакції	Умовні позначення	Опис реакції
Негативна	–	відсутня зміна шкіри
Сумнівна	±	невелика еритема без набряку
Слабо-позитивна	+	еритема та набряк в місці аплікації
Позитивна	++	еритема, набряк, папули
Різко-позитивна	+++	еритема, набряк, папули, ізольовані везикули
Дуже різко-позитивна	++++	еритема, набряк, папули, Еритема, отек, папулы, везикули зливаються

*Дослідження місцевоподразнюючої дії (кон'юнктивальна проба).* Вивчення місцевоподразнюючої дії проводили на мурчаках масою 480-520 г (2 групи – контроль і дослід по 10 тварин у кожній), згідно з рекомендаціями ДФЦ МОЗ України та іншими рекомендаціями. На кон'юнктиву обох очей тварин дослідної групи дозатором наносили по 0,01 мл гелю. Щурам контрольної групи в кон'юнктивальний мішок вводили дистильовану воду. Спостереження проводили протягом 3-х днів.

Оцінку реакції здійснювали за шкалою:

0 балів - немає змін слизової кон'юнктиви; 1 бал – легке почервоніння кон'юнктиви; 2 бали – почервоніння кон'юнктиви і набряк.

*Дослідження активної шкірної анафілаксії.* Дослідження активної шкірної анафілаксії гелю проводили на білих безпородних щурах самках масою 180-190 г (2 групи – контроль і дослід по 10 тварин у кожній) згідно з рекомендаціями ДФЦ МОЗ України. На бічній поверхні тулуба тварин вистригали волосяний покрив на ділянці 4×4 см. На цю ділянку шкіри наносили 0,5 г гелю, після чого тварин поміщали на 4 год в індивідуальні клітини для запобігання злизування препарату. Сенсibiliзацію тварин виявляли через 5 днів після останнього нанесення препарату. З цією метою на шкіру вуха одноразово наносили 0,3-0,5 г гелю. Облік інтенсивності анафілактичного шоку проводився через 6, 12 і 24 год в балах за індексом по Weigle: ++++ – шок зі смертельним результатом; +++ – шок важкого ступеня (загальні судоми, асфіксія, тварина втрачає здатність утримуватися на лапах, падає на бік, не гине); ++ – шок помірний (невеликі судоми, виражені явища бронхоспазму); + – шок слабкий (деяке занепокоєння, прискорене дихання, чухання мордочки, мимовільне сечовипускання, дефекація, шерсть скуйовджена); 0 – шок не розвинувся, ознаки його відсутні.

*Дослідження загальнотоксичної дії назальних лікарських форм при багатократному введенні.* У дослідженнях були використані 80 білих нелінійних щурів масою  $180\pm 20$ , отримані з розплідника Інституту фармакології і токсикології АМН України. Догляд, утримання і годування тварин здійснювався згідно з вимогами нормативних документів в стандартних умовах віварію. Щури утримувалися в стандартних клітках (пластмасовий ящик з оцинкованої сіткою) розмірами 500x320x160 мм по 5 тварин. Кожна група включала в себе 10 тварин (5 самців і 5 самок). Тривалість карантину (акліматизаційного періоду) для всіх тварин становила 14 днів. Протягом карантину проводили щоденний огляд кожної тварини (поведінку і загальний стан), двічі в день тварин спостерігали в клітинах (захворюваність і смертність). Перед початком дослідження тварини, що відповідають критеріям включення в

експеримент, були розподілені на групи за допомогою методу рандомізації. Тварини, які не відповідають критеріям, були виключені з дослідження протягом карантину. За день до введення препарату всі тварини оглянуті кваліфікованим ветеринаром. У дослідження включені тільки здорові тварини. Рандомізація в групі проведена механічним способом. Маркування тварин здійснена за допомогою 1% розчину брильянтового зеленого (СОП № 04) відповідно до рис. 2.1.

№ 1 - мітка на голові



№ 2 - мітка на спині



№ 3 - мітка на хвості



№ 4 - мітка на передній лівій лапі



№ 5 - мітка на передній правій лапі



№ 6 – без мітки



Рис. 2.1. Характеристика маркування тварин

До початку проведення дослідження комісія з питань біоетики ЗДМУ перевірила і погодила протокол дослідження, а також всі процедури, пов'язані з утриманням тварин, гуманним поводженням з тваринами і їх використанням в експерименті (відповідно до вимог GLP і Європейською конвенцією про захист

хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших цілей від 18.03.1986 р.). Метою хронічних токсикологічних експериментів є характеристика ступеня пошкоджуючої дії фармакологічної речовини при її тривалому введенні, виявлення найбільш чутливих органів і систем організму, а також дослідження ступеня оборотності спричинених нею пошкоджень. Тривалість введення при вивченні хронічної токсичності залежить від передбачуваної тривалості прийому в клініці. Основним способом введення є спосіб, рекомендований для клінічного вивчення. Хронічну токсичність назального гелю з ІЛ-1Ra та гелю з ноопептом вивчали в максимально допустимому обсязі – 0,4 мл. Контрольна група одержувала 1% крохмальний слиз – 0,4 мл. Тваринам експериментальних груп з 1-х по 90-у добу 1 раз в день з 9 по 10 год ранку вводили досліджувані ЛЗ. При виборі доз керувалися результатами, отриманими при дослідженні гострої токсичності фармакологічної речовини, її здатністю викликати кумулятивний ефект, а також максимальними добовими дозами, в яких препарат рекомендований для клінічного вивчення. Досліджувані ЛЗ вводили щодня гризунам протягом 90 діб, відповідно до методичних рекомендацій «Доклінічні дослідження лікарських засобів». Протягом усього досліду тварини знаходилися під щоденним наглядом; відзначали споживання корму і води, стан волосяного покриву і слизових оболонок, поведінку; регулярно зважували; досліджували стан серцево-судинної системи, вивчали морфологічні та біохімічні показники крові (табл. 2.2-2.3).

Таблиця 2.2

### Інтегральні показники

Параметри	Строки реєстрації
1	2
Виживаність	Щоденно
Маса тіла	1-ша, 30-та, 60-та, 90-та доба
Споживання їжі	Щоденно

Продовж. табл. 2.2

1	2
Рухова та поведінкова активність	Щоденно
Зовнішній вигляд	Щоденно
Пальпація	В кінці експерименту
ЕКГ	30-та, 60-та, 90-та доба та через 30 діб після припинення введення ЛЗ
ЦНС («відкрите поле»)	30-та, 60-та, 90-та доба та через 30 діб після припинення введення ЛЗ
Добовий діурез	30-та, 60-та, 90-та доба та через 30 діб після припинення введення ЛЗ

Таблиця 2.3

**Клініко-лабораторні дослідження (строки спостереження: через 90 діб від початку введення та через 30 діб після закінчення введення ЛЗ)**

Гематологічні дослідження	
Параметр	Результат
1	2
Гемоглобін	+
Еритроцити	+
Лейкоцити	+
Тромбоцити	+
ШОЕ	+
Нейтрофіли (сегментоядерні)	+
Нейтрофіли (паличкоядерні)	+
Лімфоцити	+
Моноцити	+
Еозинофіли	+
Дослідження біохімічних показників сироватки крові	
АлАТ	+
АсАТ	+

Продовж. табл. 2.3

1	2
ЩФ	+
Сечовина	+
Креатинін	+
Загальний білок	+
Глюкоза	+
Альбумін	+
Холестерин	+
Тригліцериди	+
Білірубін загальний	+
Кальцій	+
Фосфор	+
Хлориди	+
Калій	+
Натрій	+
Біохімічні та мікроскопічні дослідження сечі	
Об'єм	+
Колір	+
Мутність	+
Відносна в'язкість	+
pH	+
Глюкоза	+
Кетони	+
Лейкоцити	+
Еритроцити	+
Епітелій	+
Гній	+
Слиз	+
Загальний білок	+
Білірубін	+
Нітрити	+



### 2.2.3 Фармакологічні методи дослідження

*Експериментальні моделі для вивчення специфічної (церебропротективної) активності лікарських форм.* Характеристика тварин для фармакологічних досліджень. Всі дослідження було проведено у відповідності до Директиви 2010/63EU Європейського парламенту і Ради від 22 вересня 2010 року про захист тварин, що використовуються для наукових цілей, а також з національними «Спільними етичними принципами експериментів на тваринах» (Україна, 2001) і вказівками, викладеними в «Основні засади вивчення токсичності потенційних фармакологічних препаратів» (ДФЦ України, К., 2000). Проведення експерименту була схвалена Комісією з біоетики Запорізького державного медичного університету.

Дослідження проведено на щурах лінії Wistar віком 6 місяців масою 220-290 г. Тварини містилися в стандартних умовах віварію (12-год світловий цикл, температура 22 °С). Для проведення справжніх експериментів тварин піддавали харчової депривації, особливості якої описані нижче. З метою приручення щурів, їх перед початком експерименту тримали в руках по 2-3 хв протягом 5 днів, що полегшувало наступні експериментальні дослідження.

*Модель еквівалента розсіяного склерозу у щурів.* Експериментальний алергічний енефаломієліт [224-226] індукували одноразової підшкірного введення енцефілітогенної суміші в повному ад'юванті Фрейнда з розрахунку 100 мг гомогената гомологічного спинного мозку; 0,2 мл ПАФ (вміст убитих мікобактерій 5 мг/мл) і 0,2 мл фізіологічного розчину на тварину. ЕГС вводили в основу хвоста під легким ефірним наркозом в обсязі 0,4 мл. Про формування експериментального алергічного енцефаломієліту у тварин судили по розвитку у них неврологічних порушень, які оцінюються шляхом визначення клінічного та кумулятивного індексу ЕАЕ. Клінічний індекс визначали за шкалою: м'язова слабкість однієї кінцівки – ½ бали, парез – 1 бал, параліч – 1 ½ бала. При залученні в процес декількох кінцівок підсумовували бали. Відсутність порушень брали за 0 балів, летальний результат – 6 балів. Тварин з клінічними

індексом  $\frac{1}{2}$ – $2\frac{1}{2}$  бали вважали такими, які легко «хворіють»; 3-6 балів відповідало важкого перебігу ЕАЕ.

Препарати і дози. У дослідженні було п'ять груп тварин: 1) інтактні (10 щурів); 2) контрольні – неліковані з ЕАЕ, отримували фізіологічний розчин (20 щурів); 3) тварини з ЕАЕ, які одержували базове лікування – метилпреднізолон, 3,4 мг/кг, внутрішньоочеревинно повільно у фізіологічному розчині об'ємом не більше 1/10 ОЦК щури (20 щурів); 4) тварини з ЕАЕ, які одержували МП + ноопепт (інтраназальний гель, виготовлений на кафедрі технології ліків ЗДМУ) інтраназально, 10 мг/кг (20 щурів); 5) тварини з ЕАЕ, які одержували МП + цитиколін (Цераксон, «Ferrer Internacional S.A.», Іспанія) серія D003U1, 500 мг/кг, внутрішньошлунково (20 щурів).

Препарати вводили через 2 доби після індукції ЕАЕ: метилпреднізолон протягом 7 діб, а ноопепт і цитиколін протягом 14 діб (латентна фаза + клінічна фаза до закінчення піку захворювання). Контрольні і інтактні щури протягом всього курсу лікування отримували внутрішньочеревно і інтрагастральний фізіологічний розчин в аналогічних обсягах. Всі дослідження проводили на 17 добу експерименту.

*Методи дослідження інтеграційних функцій головного мозку щурів з ЕАЕ.* Для проведення справжніх експериментів тварин піддавали харчовій депривації, особливості якої описані нижче. З метою приручення щурів перед початком експерименту їх тримали в руках по 2-3 хв протягом 5 днів, що полегшувало наступні експериментальні дослідження. На 17 добу експерименту проводили оцінку рухової і пошукової активності за допомогою методики «Відкрите поле» і починали навчати тварин в лабіринті протягом 10 днів.

*Модель гострого порушення мозкового кровообігу.* Гостре і хронічне порушення мозкового кровообігу моделювали двосторонньою перев'язкою загальних сонних артерій, яку виконували під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг), з використанням хірургічного доступу шляхом виділення сонних артерій і одномоментного накладення на них шовкової лігатури [227]. Досліджуваний

назальний гель з IL-1Ra вводили інтраназально за допомогою піпетки-дозатора в дозі 1 мг/кг протягом 18 діб. Референс – препарат Цераксон (500 мг/4 мл) Ferrer International (Іспанія) – 500 мг/кг внутрішньоочеревинно. У кожній експериментальній групі було по 20 щурів. Щурів виводили з експерименту, як на 4-у добу після операції (гострий період), так і на 18-ту добу (відновний період).

*Модель пошкодження головного мозку при кетаміновій анестезії.* Кетамінову анестезію проводили шляхом введення 100 мг/кг кетаміну внутрішньоочеревинно. По виходу тварин з наркозу їм одноразово вводили препарати в таких дозах: ноопепт інтраназально – 10 мкг/кг, цереброкурин внутрішньоочеревинно – 0,2 мг/кг, пірацетам внутрішньо-очеревинно – 250 мг/кг. Інтактна група отримувала одноразово внутрішньо-очеревинно фізіологічний розчин 1 мл на 100 г ваги, а контрольна група, після введення кетаміну, одноразово внутрішньоочеревинно фізіологічний розчин в аналогічному дозуванні. На другу добу після анестезії проводили оцінку рухової і пошукової активності за допомогою методики «Відкрите поле» і починали навчати тварин в лабіринті протягом 10 днів. У роботі використовували Цереброкурин (НДР, Україна) – біла, злегка жовтувата прозора рідина, рН 6,1-6,4, містить нейропептиди, в тому числі і білки S-100, рилін, фактор росту нервів (NGF) (не менше 2 мг/мл), амінокислоти [228]. Пірацетам у вигляді 20% розчину, (Артеріум, Україна) і назальний гель з ноопептом Приготований інтраназальний 1% розчин являє собою однорідну прозору рідину, без запаху, з низькою в'язкістю.

*Визначення рухової і пошукової активності.* Визначення рухової і пошукової активності проводилося за допомогою методики «Відкрите поле» з використанням арени власного виробництва з розмірами 80x80x35см [228-231]. Тварина містилася у середині однієї зі сторін мордою до стінки, після чого їй протягом 8 хв дозволяли вільно переміщатися по арені. Ми оцінювали загальну пройдену відстань (см), загальну рухову активність (см<sup>2</sup>/с), структуру активності (висока, низька активність, неактивність, %), кількість завмирань і

входжень в центр, відстань, пройдену біля стінки (см) і в центральній області арени (див, %), вертикальну пошукову активність (кількість стійок на задніх лапах біля стінки і в центрі), кількість подій короткого і довгого грумінга, кількість актів дефекації і уринації.

*Оцінка референтної і робочої пам'яті.* Щурів піддавали харчовій депривації. Їжа була доступна щодня протягом 1 год. Тварин доводили до 85% початкової маси шляхом обмеження харчової дієти з вільним доступом до води.

Дослідження пам'яті проводили за допомогою радіального лабіринту LE760 (AgnTho's, Sweden), як зазначено раніше [232]. Восьмипроменеви́й радіальний лабіринт складається з восьмикутної платформи (довжина сторони 22 см), від якої відходять пронумеровані від 1 до 8 радіальні промені-доріжки довжиною 70 см і шириною 10 см з заглибленнями для годівниць на кінці (діаметр 2 см, глибина 1,5 см). Кожна доріжка може бути закрита за допомогою гільйотинного механізму незалежно один від одного. Вся установка розташовувалася на висоті 70 см від підлоги. Ми використовували методику, як зазначено раніше [233]. Дослідження проводилося в повній тиші.

Починаючи з першого дня тварини перемістилися в центральний майданчик лабіринту з 4-а закритими променями і 4-а відкритими променями, в годівницях яких розміщувалося 200 мг харчових гранул. Комбінація відкритих і закритих променів була індивідуальною і постійною для кожної тварини. Протягом наступних 10-ти днів тварина навчалася знаходженню їжі, використовуючи зовнішні візуальні орієнтири. Навчання проводилося протягом 10 хв або до знаходження тваринам всіх чотирьох джерел їжі. Експеримент повторювали щодня дворазово з кожною твариною. Після експерименту тварина отримувала денний раціон їжі. На 10 день тварина перемістилася в радіальний лабіринт з вісьмома відкритими променями-доріжками, в 4-х з яких розміщувалася їжа згідно звичної для тваринного схемою. Ми оцінювали референтну пам'ять (загальне довгострокове уявлення про структуру лабіринту і розташуванні їжі, яке сформувалося у тварини в процесі навчання) і кількість помилок референтної пам'яті (перші відвідини раніше закритого променя, в

якому тварина ніколи не знаходила їжу), а також робочу пам'ять, (короткострокове уявлення тваринни про розташування їжі в конкретному досвіді) і кількість помилок робочої пам'яті (повторне відвідування променя, в якому тварина раніше вже знаходила або не знаходила їжу). Крім того, ми оцінювали пройдену відстань і загальну рухову активність.

*Отримання і обробка даних.* Дослідження проводилися на базі відділу експериментальної патофізіології та функціональної морфології Навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медичного університету. Експерименти проводилися в добре освітленій кімнаті в повній тиші. При проведенні експериментів виключалося вплив зовнішніх і внутрішніх візуальних, нюхових і слухових стимулів. Оцінка поведінки тварин проводилася лаборантом, який не обізнаний про приналежність тварини до конкретної експериментальної групи. Захоплення і запис зображення проводився за допомогою кольорової відеокамери SSC-DC378P (Sony, Japan). Аналіз відеофайлу проводився за допомогою програмного забезпечення Smartv 3.0 (Harvard Apparatus, USA). Статистична обробка результатів проводилася за допомогою Microsoft Excel 2016 з пакетом статистичної обробки AtteStat 12. Для оцінки достовірності відмінностей в досліджуваних групах використовувався критерій Краскела-Уолліса з пост поправкою Данна. Вірогідним вважалися відмінності при  $p < 0,05$ .

*Аналіз антидепресивної активності.* Одним з клінічних проявів хронічного запального і демієлінізуючих процесів при розсіяному склерозі є порушення вищих коркових функцій, яким до недавнього часу приділялася недостатня увага при аналізі неврологічного статусу і оцінці ефективності лікування. При цьому більше половини хворих вже на початкових стадіях захворювання скаржаться на стійкі порушення нейропсихічних функцій (біль, інсомнія) і практично всі в тій чи іншій мірі мають нейропсихічного розлади (зменшення м'язової сили, дезадаптація і депресія).

Депресія – досить частий супутник РС. Більш того, більше 50% пацієнтів з РС в різний період хвороби відчують настільки серйозні симптоми депресії, які потребують медикаментозної корекції.

Однією з загально визнаних і найбільш широко використовуваних моделей вивчення депресивного стану, що застосовуються в сучасних дослідженнях, є тест-модель Порсолта (тест форсованого або примусового плавання). Вважають, що відсутність в моделі можливості уникнути небезпеки відображає саме стан депресії, але не стан тривожності і страху, де можливість уникнути передбачається. Тест Порсолта включений як один з головних для дослідження впливу препаратів і нових сполук на емоційно-стресові стани [234].

У даній серії експериментальних досліджень тварин розміщували в віварії групами по 10 щурів як мінімум 2 тижні до початку експерименту. Їжа та вода були без обмежень. Тестування проводилося в денний час, в проміжку між 13 і 18 год. При тестуванні щури після введення препаратів опускалися в пластиковий циліндр висотою 60 см і діаметром 50 см, в який на дві третини була налита вода температурою 23-24 °С.

Тривалість тесту становила 6 хв, протягом яких реєстрували поведінку тварин. Поведінковими показниками були: латентність (с) першого «зависання» («зависанням» вважали іммобільність – повна відсутність плавальних рухів при пасивному утриманні тварин на воді більше 5 с) кількість «зависання» і сумарний час іммобільності (с) клімбінг (кількість спроб вибратися з циліндра). Під впливом препаратів з нейропротективним компонентом дії латентний період до першого «зависання» і активність тварин в тесті Порсолта ростуть, а час іммобільності зменшується.

*Неврологічний дефіцит* у тварин визначали за шкалою Stroke-index С. Р. McGrow в нашій модифікації [235, 236]. Важкість стану визначалася за сумою відповідних балів. Зазначалося кількість тварин з легкої симптоматикою до 2,5 балів за шкалою Stroke-index (млявість рухів, слабкість кінцівок, односторонній полуптоз, тремор, манежні рухи) і важкими проявами неврологічних порушень

(від 3 до 10 балів) – парези кінцівок, параліч нижніх кінцівок, бічне положення (табл. 2.4).

Таблиця 2.4

### Характеристика неврологічних симптомів

Неврологічний симптом	Stroke index
Млявість, сповільненість рухів	0,5
Тремор	1,0
Односторонній полуптоз	1,0
Двосторонній полуптоз	1,5
Слабкість кінцівок	1,5
Односторонній птоз	1,5
Двосторонній птоз	1,5
Манежні рухи	2,0
Парез 1-4 кінцівок	2,0-5,0
Параліч 1-4 кінцівок	3,0-6,0
Коматозний стан	7,0

*Вестерн-блотинг.* Концентрацію в цитоплазматичній або мітохондріальній фракціях органів (серце, головний мозок) iNOS, bcl-2 і HSP<sub>70</sub> визначали методом Вестерн-блот аналізу. Білки розділяли в 10% поліакриламідному гелі. Поділ білкових фракцій проводилося шляхом електрофорезу при напрузі 100 V (для ущільнення гелю), коли пробки досягали межі розділу гелів – при напрузі 200 V, до того часу, поки пробки не досягнуть закінчення гелю. Білки з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану при напрузі 100 V і силі струму 0,35 A протягом 1 год. Після перенесення мембрану поміщали в блокуючий буфер, що містить 1% розчин бичачого сироваткового альбуміну (SIGMA, USA, кат. № A2153) на 20 г. Відмиту на шейкері протягом 5 хв в розчині 0,1 фосфатного буфера (pH 7,4) мембрану поміщали в розчин первинних антитіл проти iNOS, bcl-2 і HSP70 (1:500), (Santa Cruz Biotechnology)

і інкубували 2 год при кімнатній температурі. Відмивали на шейкері 4 рази по 5 хв в 0,1 фосфатному буфері (рН 7,4). Поміщали мембрану в розчин вторинних антитіл (1:1000), (біотинільований анти-мишачий IgG, SIGMA, USA, кат. № 051M4885), інкубували 2 г. Відмивали на шейкері 4 рази по 5 хв в розчині 0,1 фосфатного буфера. Поміщали мембрану в розчин ExtrAvidin-пероксидази (SIGMA, USA, кат. № 051M4885) в 1% розчині бичачого сироваткового альбуміну (1:1000). Інкубували 1 год і промивали. Для візуалізації мембрану обробляли розчином АЕК: 1 таблетка 3-аміно-9-етилкарбазола (Sigma, USA, кат. № а6926), розчинена в 2,5 мл ДМФА, що містить 47,5 мл 0,05 М ацетатного буфера, рН 5,0, 25 мкл 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Інкубували мембрану в субстратній суміші 5-10 хв. Червоний нерозчинний преципітат характеризує комплекс антиген-антитіло в блоті. Промивали мембрану в дистильованій воді кілька разів. Висушували смужки між листами фільтрувального паперу під потоком холодного повітря. Детекцію iNOS, bcl-2 і HSP<sub>70</sub> здійснювали за допомогою денситометрії в програмі Adobe Photoshop.

2.2.4 Біохімічні методи дослідження. З головного мозку швидко видаляли кров, відокремлювали від мозкової оболонки і досліджувані шматочки поміщали в рідкий азот. Потім подрібнювали в рідкому азоті до порошкоподібного стану і гомогенізували в 10-кратному обсязі середовища при (2 °С), що містить (в ммоль): сахарози – 250, трис-НСІ-буфера – 20, ЕДТА – 1 (рН 7,4) [237]. При температурі (+4 °С) методом диференціального центрифугування на рефрижераторній центрифугі Sigma 3-30k (Німеччина) виділяли мітохондріальну фракцію. Для очищення мітохондріальної фракції від великих клітинних фрагментів попередньо проводилося центрифугування протягом 7 хв при 1000 g, а потім супернатант повторно центрифугували протягом 20 хв при 17000 g. Супернатант зливали і зберігали при -80 °С. Осад мітохондрій ресуспендували в середовищі виділення, що містить бичачий сироватковий альбумін (0,5 мг/мл) і знову осаджували протягом 10 хв при 17000 g. Мітохондрії суспендували в середовищі виділення, суспензія містила 40-60 мг білка/мл. Для тривалого зберігання мітохондрії заморожують при



-80 °С. Для визначення швидкості відкриття мітохондріальної пори використовували суспензію 0,5-1,0 мг білка/мл. Безбілковий екстракт отримували додаванням точної наважки гомогенату тканини серця в хлорній кислоті (0,6) з наступною нейтралізацією 5,0 М калію карбонатом [238]. Для оцінки інтенсивності оксидативного стресу визначали маркери окисної модифікації білка – АФГ і КФГ, а також нітротирозин. Стан антиоксидантної системи оцінювали за активністю СОД, ГР [239, 240]. Стан енергетичного обміну визначали за рівнем найбільш значущих інтермедіатів – АТФ, АДФ, АМФ, лактату, пірувату, малату, активності МДГ [237]. Про продукцію, метаболізм та транспорт NO судили за NOS, вмістом нітротирозину, нітратів, рівню сумарних SH-груп і активності глутатіонредуктази [237].

Визначення активності СОД проводили за методикою, описаної Чеварі зі співавторами із застосуванням феназінметансульфата і нітросинього тетразолія. Активність ГР визначали за методикою в тесті з окисленим глутатіоном [237]. Стабільні метаболіти NO визначали за рівнем нітратів в реакції Грісса [215], активність NOS визначали за різницею між швидкістю окислення NADPH, яка реєструвалась флюорометрично, в двох паралельних зразках, який не містить, та містить інгібітор NOS – N-нітро-L – аргінін [241]. Показники ОМБ визначалися за методом В. Halliwell [237] із взаємодії окислених амінокислотних залишків з 2,4-ДНФГ і утворенням АФГ і КФГ, що мають спектр поглинання при 274 нм 363 нм відповідно. Активність КФК-ЦТ і КФК-мх в міокарді визначали після хроматографічного розділення, по оптичному тесту Варбурга [215].

Кількість малату визначали за методом Хохорста по спаду НАДН при 340 нм [237, 242]. Вміст пірувату визначали за методом Цоха-Ломпрехта по спаду НАДН при 340 нм [243]. Вміст лактату визначали за методом Хохорста щодо підвищення НАДН при 340 нм [244]. Активність НАД-МДГ визначали спектрофотометрично в мітохондріальній фракції. Аденілові нуклеотиди визначали методом тонкошарової хроматографії. Вміст сумарних SH-груп визначали спектрофотометрично по реакції з 5,5-дітіо-біс-7-нітробензойною

кислотою [241]. Нітротирозин визначали в цитозольній фракції гомогенату серця твердофазним імуносорбентним сендвідж – методом ELISA, ELISA Kit (Cat. № НК 501-02) фірми Hycult Biotech і відображали в нм / г тканини.

2.2.5 Гістохімічні методи дослідження. Для гістохімічних досліджень головний мозок на 24 год фіксували в рідині Карнуа і далі за стандартною схемою заливали в блоки парапластом-X100, з яких готували серійні фронтальні 14-мікронні гістологічні зрізи в області сенсомоторної кори і СА1-гіпокампу. Для визначення інтенсивності експрес генів раннього реагування c-fos гістологічні зрізи мозку виділяли з парапласта і регідрували, тричі по 5 хв відмивали фосфатним буфером (рН 7,4) і протягом 30 хв інкубували з 2 М соляною кислотою ( $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Потім двічі по 5 хв відмивали фосфатним буфером (рН 7,4), двічі по 5 хв відмивали боратним буфером по Холмсу (рН 8,4) і чотири рази по 5 хв – фосфатним буфером (рН 7,4), після чого протягом 30 хв інкубували з 0,1% розчином трипсину в фосфатному буфері ( $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Потім двічі по 5 хв відмивали фосфатним буфером (рН 7,4), двічі по 5 хв відмивали боратним буфером по Холмсу (рН 8,4) і чотири рази по 5 хв – фосфатним буфером (рН 7,4), після чого протягом 30 хв інкубували з 0,1% розчином трипсину в фосфатному буфері ( $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Після інкубації зрізи чотири рази по 5 хв відмивали фосфатним буфером (рН 7,4) і потім протягом 24 год інкубували у вологій камері ( $t=4-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) з первинними поліклональними антитілами кроликів IgG (1:500) c-fos (R-20 # SC-648) виробництва Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA). Після інкубації зрізи чотири рази по 5 хв відмивали фосфатним буфером (рН 7,4). Потім протягом 1 год ( $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) інкубували з вторинними антитілами кози до фрагменту IgG кролика, кон'югованими з флюоресцентним барвником (FITC) фірми Sigma-Aldrich (Кат.№ F 2266). На флюоресцентному мікроскопі Axioskop (Ziess, Germany) визначали інтенсивність експрес c-fos по щільності c-fos-позитивних клітин в зрізах за допомогою відеокамери COHU – 4922 (USA) і вводили в систему цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Germany) .

*Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі.* Для оцінки стану експресії мРНК iNOS використовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в режимі реального часу (ЗТ-ПЛР). Для підготовки зразків біоматеріалу шматочки головного мозку поміщали на добу в фіксатор Буена і після стандартної гістологічної проводки тканину укладали в парафін. На ротаційному мікротомі виготовляли зрізи СА-1 зони гіпокампа товщиною 5 мікрон. Після депарафінування і центрифугування, осад висушували на повітрі для видалення залишків етанолу. Виділення тотальної РНК з тканини щурів проводили з використанням набору «Trizol RNA Prep 100» ( «ІЗОГЕН», Росія). Для зворотної транскрипції (синтез до ДНК) використовували «Набір реагентів для проведення зворотної транскрипції (ОТ-1)» («синтола», Москва). Для визначення рівня експресії досліджуваних генів використовували ампліфікатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) і набір реактивів для проведення ПЛР-РВ в присутності SYBR Green R-402 («Синтол», Росія ). Специфічні пари праймерів (5'-3') для аналізу досліджуваних і референс генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення PrimerBlast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)) і виготовлені фірмою ThermoScientific, США. Реєстрація інтенсивності флуоресценції відбувалася автоматично в кінці стадії елонгації кожного циклу по каналу автоматично SybrGreen. Як референс-ген для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген actin, beta (Actb).

2.2.6 Гісто-морфологічні методи дослідження. Головний мозок експериментальних тварин помістили на добу в фіксатор Буена і після стандартної гістологічної проводки тканину укладали в парафін. Для вивчення морфології нейронів на ротаційному мікротомі виготовляли зрізи в області V-VI шару сенсомоторної кори товщиною 5 мікрон. Зрізи гіпокампу депарафінували і фарбували для визначення нуклеїнових кислот галоціанін-хромовими галуном по Ейнарсону. Морфометричні дослідження проводили на мікроскопі Axioskop (Zeiss, Німеччина), збільшення x40. Зображення нейронів

в області зони CA-1 гіпокампу, отримані на мікроскопі, за допомогою високочутливої відеокамери COHU-4922 (COCHU Inc., США) вводили в комп'ютерну програмно-апаратну систему цифрового аналізу зображення VIDAS, розроблену професором кафедри патофізіології, д. мед. н. А. В. Абрамовим. Аналіз зображень проводили в напівавтоматичному режимі. Визначали наступні показники:

- щільність нейронів, апоптотичних і деструктивно змінених нейронів (кількість клітин на  $1 \text{ мм}^2$  площі зрізу кори мозку);
- клітинний склад в області IV-V шарів кори і CA1 зони гіпокампу у відсотках;
- площу тіл нейронів, апоптотичних і деструктивно змінених нейронів ( $\text{мкм}^2$ );
- зміст РНК в нейронах, апоптотичних і деструктивно змінених нейронах (одиниці оптичної щільності, ЕОП), які розраховували як логарифм відношення оптичної щільності тіла клітини до оптичної щільності міжклітинної речовини,
- індекс відношення кількості тих, які вижили нейронів до числа апоптотичних і деструктивно змінених нейронів.

Дегенерованими вважалися нейрони, які мають ознаки каріопікнозу або цитолізу. Програмно вимірювалася щільність розташування нейронів які вижили та дегенерують, співвідношення числа інтактних нейронів до загинувших (індекс нейродегенерації) і відношення щільності виживших нейронів, при використанні препарату, до щільності інтактних нейронів в контрольній групі (індекс поліпшення виживаності). Так як частина загинувших нейронів до моменту гістологічного дослідження вже була фагоцитована клітинами мікроглії, окремо оцінювався індекс відносної активності мікроглії, рівний приватному від ділення різниці в щільності виживших нейронів на різницю в щільності дегенерованих нейронів (різниця між групою контролю і фармакологічним препаратом). Величина індексу нейродегенерації менше одиниці свідчила про переважання числа загинувших нейронів над вижившими, індекс поліпшення виживаності і активності мікроглії більше одиниці свідчили

про позитивну дію фармакологічного препарату, менш одиниці – про негативний. Про функціональний стан виживших нейронів судили на підставі зміни площі ядер і ядерець нейронів, змісту в них нуклеїнових кислот, ядерно-цитоплазматичного співвідношення і кількості багатоядрових клітин.

2.2.7 Статистичні методи дослідження. Вибір статистичних процедур і аналіз характеру розподілу досліджуваних величин. Аналіз нормальності розподілу оцінювали за критеріями Колмогорова-Смирнова (D) і Lilliefors, а також Shapiro-Wilk (W), якому віддавали перевагу. Також в якості критеріїв згоди оцінювали величину асиметрії і ексцесу розподілу даних. Коли неможливо було відкинути нульову гіпотезу про статистично значущих відмінностей розподілу змінних від нормального, використовували непараметричні методи аналізу даних, а в інших випадках параметричні методи.

*Цензурування кількісних даних.* При наявності в досліджуваній сукупності варіант, які різко відхиляються від основної маси спостережень, ґрунтуючись на властивостях стандартного нормального розподілу, їх виключали з подальшого аналізу в разі, якщо вони були більше або менше за абсолютним значенням критичного значення, розрахованого як сума вибіркового середнього значення і потроєного значення вибіркового математичного очікування.

*Подання даних.* Дані представлені у вигляді середнього і стандартної помилки репрезентативності вибіркового середнього значення.

Оцінка відмінності незв'язаних вибірових сукупностей: у випадках, коли розподіл змінної підпорядковувалося нормальному закону, враховуючи при цьому, що кількість порівнюваних груп перевищувало 2, для перевірки статистичної гіпотези про те, що досліджувані групи відносяться до різних генеральним сукупностям, використовували процедуру однофакторного дисперсійного аналізу, відкидаючи нульову гіпотезу про відсутність розбіжності вибіркової сукупності при  $p < 0,05$ , порівнюючи розраховану величину F-критерію з критичної, для подальшого попарного порівняння груп використовували критерій Games-Howell.

У разі розподілу, що відрізняється від нормального, або аналізу порядкових змінних, використовували U-критерій Mann-Whitney для 2-х незв'язаних вибірок, для більшого числа вибірок - критерій Kruskal-Wallis H з подальшим порівнянням по Games-Howell. Якщо кількість груп було 2, статистичну значущість відмінностей оцінювали за допомогою гетероскедастичного t-критерію Gosset U для незв'язаних груп з поправкою Бонфероні.

*Оцінка відмінності вибірових сукупностей в паралельних групах.* При аналізі впливу лікування на досліджувані параметри в разі нормального розподілу змінних використовували процедуру однофакторного дисперсійного аналізу повторних змін з подальшим використанням Newman-Keuls або Games-Howell, враховуючи множинність порівнянь.

У тих випадках, коли розподіл досліджуваних змінних не відповідає нормальному закону, використовували непараметричний аналог дисперсійного аналізу повторних змін – критерій Fridman. У разі 2 груп проводили порівняння з допомогою критерію Wilcoxon.

*Хі-квадрат.* Порівняння груп за якісною ознакою, а також при дослідженні частот зустрічальності показників, проводили за допомогою критерію  $\chi^2$  з аналізом таблиць спряженості.

Багатофакторний дисперсійний аналіз повторних змін і коваріаційний аналіз. Аналізуючи вплив різних чинників на досліджувані параметри в процесі терапії, динаміку показників залежно від вихідних (початкових) значень використовували процедуру багатофакторного дисперсійного аналізу повторних змін і коваріаційний аналіз.

*Кореляційний аналіз.* Оцінка ступеня взаємозв'язку між парами незалежних ознак, виражених у кількісній шкалі, здійснювалася за допомогою коефіцієнта рангової кореляції Pearson (r) або P. Spearman (R), в залежності від характеру розподілу змінних. Оцінку достовірності коефіцієнтів кореляції проводили, порівнюючи розраховані коефіцієнти з критичними (виходячи з властивостей коефіцієнтів кореляції і ступенів свободи).

*Регресійний аналіз.* Для визначення наявності та характеру залежності між числовими змінними використовували процедуру регресійного аналізу, використовуючи лінійну, логарифмічну, степеневу, експонентну, поліноміальну (другого і третього ступеня) моделі, добиваючись незалежної (за допомогою критерію Darbin-Wothson), нормального розподілу залишків (при цьому, як критерій згоди, застосовували величину асиметрії і ексцесу). Остаточний вибір рівнянь регресії проводили за допомогою узагальненого критерію якості, які знаходили як зважену суму узагальненого критерію точності і узагальненого критерію адекватності. Як критерій точності використовували нормовані значення середньої відносної помилки апроксимації, а як критерій адекватності - нормовані значення критерію Darbin-Wothson. При аналізі регресійних рівнянь брали до уваги величину множинного коефіцієнта кореляції, а також величину коефіцієнта детермінації  $R^2$ .

Результати дослідження оброблені із застосуванням статистичного пакету ліцензійної програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoft Inc., № AXXR712D833214FAN5), а також «SPSS 16.0», «Microsoft Excel 2003». Окремі статистичні процедури і алгоритми реалізовані у вигляді спеціально написаних макросів у відповідних програмах. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при  $p < 0,05$  [245].

### РОЗДІЛ 3

## ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ЗАГАЛЬНОЇ МЕТОДОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ НАЗАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ДЛЯ ТРАНСПОРТУВАННЯ АФІ ЧЕРЕЗ НІС-МОЗОК

### 3.1 Вибір загальної методології досліджень

Створення нових назальних лікарських форм системної церебропротективної дії обумовлює проведення пошукових досліджень, а саме узагальнення та систематизацію існуючих інформаційних потоків у вигляді наукових тез, статей, патентів, авторефератів, дисертацій, монографій. Зазначена інформація дозволить попередньо обрати АФІ для майбутньої лікарської форми, а також вид лікарської форми. На наступному етапі потрібно провести маркетингові дослідження вітчизняного ринку з метою визначення актуальності обраного напрямку, а також прогнозування потреби в новій лікарській формі. Після опрацювання результатів маркетингових досліджень необхідно здійснити фармацевтичну розробку нової лікарської форми з методами контролю її якості. Потім доцільно проведення доклінічних досліджень щодо визначення безпечності розробленої нової лікарської форми, а також окреслення її специфічної активності та прийняття рішення щодо рекомендації лікарської форми до поглиблених клінічних випробувань (рис. 3.1).

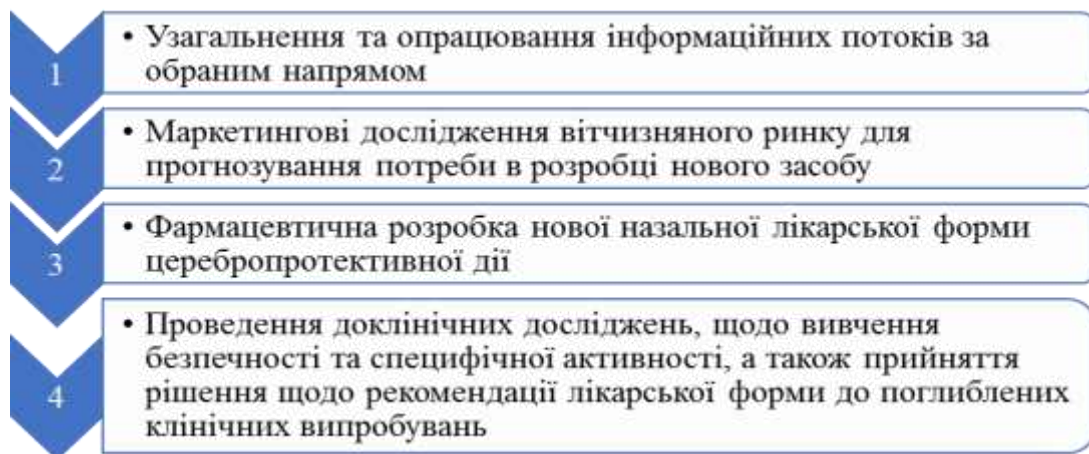


Рис. 3.1. Алгоритм створення нових назальних лікарських форм церебропротективної дії



### 3.2 Узагальнення та опрацювання інформаційних потоків по назальним лікарським формам

Процес узагальнення та опрацювання інформаційних потоків є досить кропітким та трудоемким, при цьому потрібно володіти спеціальними навичками з пошуку публікацій, як іноземного так і вітчизняного походження. Пошук ускладнюється великим різноманіттям форматів вихідних даних, які можуть змінюватися в залежності від пошукової системи, типу бази даних, характеру видавництва журналу. Наукова інформація по інтраназальним лікарським засобам для місцевого та системного застосування розповсюджена в різноманітних базах даних та бібліотеках, деякі фрагменти її опубліковані в наукових журналах на багатьох мовах у вигляді тез, статей, коротких повідомлень та патентів. В якості програмного забезпечення для роботи з бібліографічною інформацією ми досліджували такі засоби, як EndNote©, Reference Manager©, ProCite©, Библио-Мастер©, Mendeley©, Zotero©. Протестувавши можливості перерахованих вище програмних засобів, зупинилися на аплікації Zotero©, яка має можливість синхронізації створеної локальної бази знань по інтраназальним засобам із зовнішніми серверами, які розташовані в мережі internet, що в свою чергу захищає від несподіваної втрати накопиченої інформації та надає можливість отримати доступ до своєї інформації з будь-якого місця. При обробці інформації по інтраназальним лікарським засобам ми додатково додавали до кожного посилання характеристику інформації у вигляді тегів. Створена система тегів дозволяє швидко фільтрувати накопиченні знання по інтраназальним лікарським засобам, незважаючи на те в якій категорії вони знаходяться. Тобто, наприклад при виборі тегу «реологічні дослідження» в Zotero© відбувається пошук по всій бібліотеці тез, статей, патентів та інших публікацій – це дозволяє користувачеві оптимізувати час пошуку і не проглядати всі публікації по кожній категорії. Для пошуку інформації в створеній бібліотеці по інтраназальним лікарським засобам ми користувались категоріями та тегами, а також пошуковою системою

програми. Пошуковий механізм дозволяє знаходити інформацію не тільки в вихідних даних публікацій, а й в повних текстах документів прикріплених до бібліотечних карток. Отримані колекції бібліографічних посилань щодо наукових досліджень в області інтраназальних лікарських засобів в Zotero© розташовували персональному розділі «Моя бібліотека». Для зручності аналізу даних їх сортували по таким категоріям як:

- ✓ інтраназальні лікарські засоби місцевої дії;
- ✓ інтраназальні лікарські засоби системної дії;
- ✓ технологічні аспекти інтраназальних лікарських засобів:
  - технології отримання та характеристика якості гомогенних лікарських засобів;
  - технології отримання та характеристика якості гетерогенних лікарських засобів;
  - технології отримання та характеристика якості мікро та наносистем:
    - мікро та наноемульсії;
    - ліпосоми;
    - мікро та нано порошки;
- ✓ доклінічні дослідження інтраназальних лікарських засобів;
- ✓ клінічні дослідження інтраназальних лікарських засобів.

Розроблена структура категорій дозволяє ефективно проводити сортування та опрацювання інформації [246]. Обробка отриманої інформації дозволила виявити, для подальших досліджень, біологічні, фізико-хімічні та технологічні фактори, які ймовірно впливатимуть на транспортування АФІ через ніс-мозок.

3.2.1 Характеристика біологічних факторів, які впливають на доставку АФІ через ніс-мозок. Доставка діючих речовин безпосередньо в мозок обмежується декількома механізмами захисту одним з яких є гематоенцефалічний бар'єр. Це фізіологічний бар'єр, який виконує захисну функцію центральної нервової системи завдяки наявності у ендотелію капілярів

щільних контактів між собою, та відносно товстої базальної мембрани у капілярах. Характерною особливістю гематоенцефалічного бар'єру є його вибіркова проникність до низькомолекулярних поживних речовин, таких як амінокислоти, глюкоза, та інших. Високомолекулярні сполуки мають досить обмежений транспорт. Деякі вчені вважають, що сполуки з молекулярною масою більше 1 кДа транспортуються трансцелюлярно ендцитонічними процесами [100, 247, 248].

В носовій порожнині наявний ще один механізм захисту від пошкоджуючої дії патогенних мікроорганізмів, алергенів та інших чужорідних частинок – мукоциліарна система. Мукоциліарна система природним шляхом очищує дихальні шляхи. Епітелій слизової оболонки покриває слиз, який зволожує слизові оболонки, попереджує їх висихання, може адсорбувати різноманітні інорідні домішки. Мукоциліарний кліренс – виведення ринобронхіального секрету завдяки коливальним рухам одношарового в'їчастого епітелію. Швидкість мукоциліарного транспорту(мукоциліарного кліренсу) у здорової людини від 4 до 20 мм за хв [249-251]. При пошкодженні мукоциліарного кліренсу, в результаті запальних захворювань, може виникнути мукоциліарна недостатність. Тобто всмоктування діючих речовин з порожнини носа безпосередньо буде залежати від часу знаходження препарату в назальній порожнині і швидкістю виведення слизом за допомогою мукоциліарного кліренсу. Також ймовірно всмоктування буде залежати від місця введення препарату в назальну порожнину, тому що швидкість кліренсу в передній частині носа повільніша чим в задній.

Слизова оболонка носової порожнини має відносно велику площу поверхні, розгалужену систему капілярів і має інтенсивний приток крові. Враховуючи, що більшість препаратів може всмоктуватись за рахунок дифузії, розширення та звуження судин, в носовій порожнині, впливатиме на швидкість доставки діючих речовин в мозок. Різноманітні патологічні стани організму, які викликають набряк носової порожнини, наприклад алергійний або вазомоторний риніти ймовірно сповільнюватимуть всмоктування препаратів з

носової порожнини. Використання хімічних сполук, які підсилюватимуть швидкість кровотоку в носовій порожнині, сприятиме більш швидкому транспортуванню активних речовин в мозок [252-256].

В носовій порожнині знаходяться метаболічні ферменти – карбоксильні естерази, дегідрогенази альдегідів, епоксидні гідролази, глутатіон-трансферази, які можуть впливати на біотрансформацію діючих речовин в назальних тканинах. Наявність протеолітичних ферментів ймовірно буде сповільнювати транспорт діючих речовин на шляху ніс-мозок [257, 258].

При застосуванні назальних форм потрібно враховувати рН слизової оболонки. За даними літератури рН знаходиться в діапазоні 4,5-6,5. Крім того наявна захисна ферментна система в назальній порожнині ефективно працює в кислому середовищі. Штучна зміна рН назальної порожнини шляхом введення назальних форм з іншим рН може інактивувати захисні ферменти, які попереджують розвиток мікробної інфекції [181, 259-261].

Температура в назальній порожнині неоднорідна і залежить від стану організму, температури вдихаємого повітря, а також вологості. З технічної точки зору виміри *in vitro* температури в носовій порожнині мають певні труднощі, тому в літературних даних зустрічаються значення діапазону температур в різних участках носової порожнини від 29 до 37 °С [262-264].

3.2.2 Характеристика факторів, пов'язаних з природою активних сполук, які впливають на доставку активних сполук через ніс-мозок. Природа діючої речовини, яку планується застосовувати інтраназально ймовірно відіграватиме суттєву роль в швидкості транспортування в кров. Наприклад, висока ліпофільність діючої речовини часто є перешкодою для перорального застосування, проте має велику ймовірність ефективно застосовуватись назально [265, 266]. Так, вченими була розроблена форма назальна респеридону для терапії шизофренії з наночастинками хітозану, триполіфосфату та твіну-80, яку досліджували на щурах лінії Wistar, на моделі психозу викликаному амфетаміном. Встановили, що виготовлена форма була ефективною на експериментальній моделі

шизофренії[267]. Інші дослідники в якості альтернативного шляху доставки прогестерону виготовили його назальну форму опираючись на високій ліпофільності препарату [192].

Всмоктування АФІ шляхом ніс-мозок залежить від рКа діючої речовини, а також від значення рН в місці всмоктування. Тобто всмоктування слабких електролітів залежить від їх ступеню іонізації, при чому, чим менше іонізовані частинки тим краще відбувається транспортування [268].

Крім ліпофільності та рКа транспортування назально діючих речовин залежить від коефіцієнту розподілення (partition coefficient ( $P$ ), distribution coefficient ( $D$ )). Дослідниками проводилось вивчення здатності підсилювати назальну адсорбцію метотрексату через слизову кроля *in vitro*. Коефіцієнт розподілення метотрексату в системі метотрексат – L-аргінін був в 24 рази більшим в порівнянні системи без L-аргініну, що призводило до достовірно кращого всмоктування назально введеного метотрексату [269].

Розчинність препарату ймовірно також відіграє важливу роль при доставці діючих речовин через назальний шлях. Наприклад при введенні препарату у формі порошку, для його всмоктування потрібен час на розчинення його в назальному секреті гідрофільної природи. Тільки після розчинення буде відбуватись всмоктування.

3.2.3 Характеристика факторів, пов'язаних з лікарською формою та технологією виготовлення, які впливають на доставку активних сполук через ніс-мозок.

#### *Фактори інгредієнтів лікарської форми*

В'язкість та мукоадгезивність. Транспортування діючої речовини інтраназальним шляхом залежить від часу контакту між слизовою оболонкою носа та лікарською формою. Збільшення в'язкості лікарської форми шляхом модифікації реологічних властивостей, а саме додаванням компонентів, які збільшують в'язкість збільшить час контактування препарату з слизовою носа і сприятиме тривалішому вивільненню діючої речовини з лікарської форми. Водночас в'язкість назальної форми не повинна бути надто високою з метою

попередження порушення нормальних фізіологічних функцій організму, а саме мукоциліарного кліренсу та зміну частоти руху війок миготливого епітелію. Мукоадгезія – явище, яке характеризує взаємодію між мукоадгезивним полімером та муцином. Механізм мукоадгезії складається з декількох етапів, на початку полімер поглинає воду з слизової оболонки промокає та набухає. Далі полімер проникає в слиз та підвищує концентрацію діючої речовини в епітелії. В якості мукоадгезивних речовин в фармацевтичній технології використовуються як сполуки природного походження: натрію альгінат, пектин, хітозан, камеді, циклодекстрини, так і речовини синтетичного походження: похідні целюлози, полівінлпіролідону, акрилати, полівініловий спирт та інші [ 270-273].

Співрозчинники (co-solvent). З метою підвищення розчинності АФІ в назальних лікарських формах доцільно використовувати співрозчинники, які сприятимуть отриманню гомогенного розчину. В якості розчинників можуть використовуватись різноманітні спирти, такі як гліцерин, пропіленгліколь, етиленгліколь, манітол або їх суміші в різних співвідношеннях. Крім підвищення розчинності зазначені сполуки сприятимуть зволоженню назальної порожнини [274, 275].

Підсилювачі адсорбції (Absorption enhancers). Погана проникність гідрофільних назальних засобів (препаратів з низькою ліпофільністю) з технологічної точки зору може бути подолана додаванням до складу лікарської форми підсилювачів адсорбції які можуть впливати на назальний епітелій шляхом модифкації двошарових фосфоліпідів та збільшувати парацелюлярний транспорт діючих речовин. Прикладами таких речовин є: твіні, лаурил сульфат натрію, глікодезоксихолат натрію, олеїнова кислота, циклодекстрини ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), етилендіамінтетраоцтова кислота та її солі, амінований желатин, хітозан і триметилхітозан [276-278].

Інгібітори назальних ферментів. Для інгібування деяких ферментів носової порожнини (пептидаз та протеаз), які можуть метаболізувати діючу

речовину лікарської форми, можливо використання сполук різної хімічної природи – аprotинін, бестатин, амастатин, боролейцин, пуроміцин [279-281].

*Фактори технології лікарської форми.* Використання нових технологічних прийомів для виготовлення назальних лікарських форм є окремим фактором. Так, перспективним є виготовлення твердих ліпідних наночастинок, ліпосом, мікросфер, наноемульсій, термочутливих гелів. Використання наночастинок, завдяки їх малим розмірам, дозволяє транспортувати діючі речовини в слизовій оболонці носа парацелюлярним шляхом [282-284].

Тверді ліпідні наночастинки (solid lipid nanoparticles) – це дисперсії біосумісних ліпідів, таких як тригліцериди, жирні кислоти, які стабілізовані поверхнево-активними речовинами, з гідрофільно-ліпофільним балансом нижче 12 [285]. Інкорпорування АФІ в гідрофобному ядрі твердих ліпідних наночастинок може ефективно доставляти препарат в клітини. Так, авторами були проведені дослідження щодо створення ліпідних частинок з агомелатином розміром 167,7 нм. Розроблені наночастинки мали кращу біодоступність в мозку, в порівнянні з пероральною суспензією [286].

Ліпосоми – сферичні пухирці (везикули) нанорозміру з водним внутрішнім ядром, покритим фосфоліпідним шаром. Фосфоліпідний шар складається з фосфатидилхоліну, або сфінгомієліну або фосфатидилсерину який може додатково покриватись поліетиленгліколем. Ліпосоми мають хорошу біосумісність та біодоступність, можуть інкапсулювати малі та великі молекули з широким діапазоном гідрофільності та рКа, транспортувати АФІ до певних органів включаючи мозок, проте можуть також швидко інактивуватися макрофагами фагоцитарної системи [266, 287-291].

Наноемульсії гетерогенні системи олії в воді або воді в олії, які стабілізуються поверхневоактивними речовинами. На відміну від звичайних емульсій у наноемульсії діаметр внутрішньої фази представлений розміром нанометрової величини. Завдяки своїй природі наноемульсії з АФІ можуть транспортувати препарат шляхом ендоцитозу клітин. Для ефективної

біосумісності, в якості допоміжних речовин, в наноемульсіях, використовують льняне масло, конопляне масло, кедрово-горіхове масло, риб'ячий жир, фосфатидилхолін, дезоксихолеву кислоту, стериламін та воду. В порівнянні з іншими наносіями для доставки АФІ в мозок, перевагами є використання безпечних олій з корисними компонентами (омега-3 та омега-6 жирних кислот), проте недоліками є термодинамічна нестійкість [292-294].

Термочутливі назальні гелі – лікарські форми *in situ*, які при звичайній температурі мають вигляд рідини, з реологічної точки зору характеризуються низькою в'язкістю та мають ньютонівський тип течії, проте при підвищеній температурі у них відбувається перехід золь-гель, створюється густа рідина-гель з псевдопластичним типом течії. Така поведінка обумовлена наявністю в рецептурах термочутливих полімерів, таких як Pluronic F-127, Poloxamer 407, та їх комбінацій з карбомерами, похідними целюлози, та хітозаном [295, 296]. Так, авторами було проведено дослідження, щодо створення термочутливої гелевої назальної форми з такрином. В якості термочутливого полімеру використовували Pluronic F-1273 та інші допоміжні речовини, комбінація яких забезпечувала створення псевдопластичної рідини при температурі 28,5 °С. При температурі 20 °С назальна форма була у вигляді рідини. Отриманий гель збільшував час утримання в носовій порожнині, що призводило до збільшення у 2-3 рази вищої пікової концентрації в плазмі ( $C_{max}$ ) та площі під кривою (AUC) [297].

### 3.3 Фармацевтична розробка назальних лікарських форм церебропротективної дії

Відповідно до рекомендацій: Лікарські засоби фармацевтична розробка (ICHQ8), Належна лабораторна практика, мета фармацевтичної розробки – створення якісного препарату із заданими функціональними характеристиками, а також обґрунтування процесу його виробництва. Інформація отримана при фармацевтичній розробці може бути використана для управління ризиками для



якості, при чому якість повинна бути закладена при розробці. Крім того, також потрібно встановити простір проектних параметрів або критичні точки технологічного процесу, які можуть бути представлені у вигляді комбінації вхідних перемінних та параметрів процесу при яких доведено забезпечення якості [298, 299].

Згідно даних ДФУ назальні лікарські засоби – рідкі, м'які або тверді лікарські засоби, призначені для введення в носову порожнину, з метою одержання системної або місцевої дії. Містять одну або більше діючих речовин. Можуть містити допоміжні речовини для створення в'язкості, створення або стабілізації необхідного значення рН, збільшення розчинності діючих речовин або забезпечення стабільності лікарського засобу, а також антимікробні консерванти. Назальні лікарські засоби в свою чергу поділяються на: назальні порошки, назальні промивки, назальні краплі та спреї, назальні м'які лікарські засоби та назальні палички [210].

Фармацевтична розробка назальних засобів включає такі стадії, як: вивчення фізико-хімічних властивостей АФІ та допоміжних речовин, вибір раціонального складу лікарської форми шляхом проведення біофармацевтичних, реологічних, та мікробіологічних досліджень. Проведення досліджень щодо можливості поєднання комплексу АФІ та інших допоміжних інгредієнтів в одній лікарській формі, з урахуванням фармацевтичних несумісностей. Характеристика стабільності розробленої лікарської форми. Опрацювання технології виготовлення лікарської форми в умовах екстемпорального або промислового виробництва з критичними точками технологічного процесу (критичними стадіями виробництва). Вибір раціональної упаковки для розробленого назального засобу.

Фармацевтична розробка назальних засобів церебропротективної дії має певні особливості (рис. 3.2), обумовлені врахуванням різноманітних факторів, які впливатимуть на якість кінцевого продукту та швидкість настання терапевтичного ефекту.

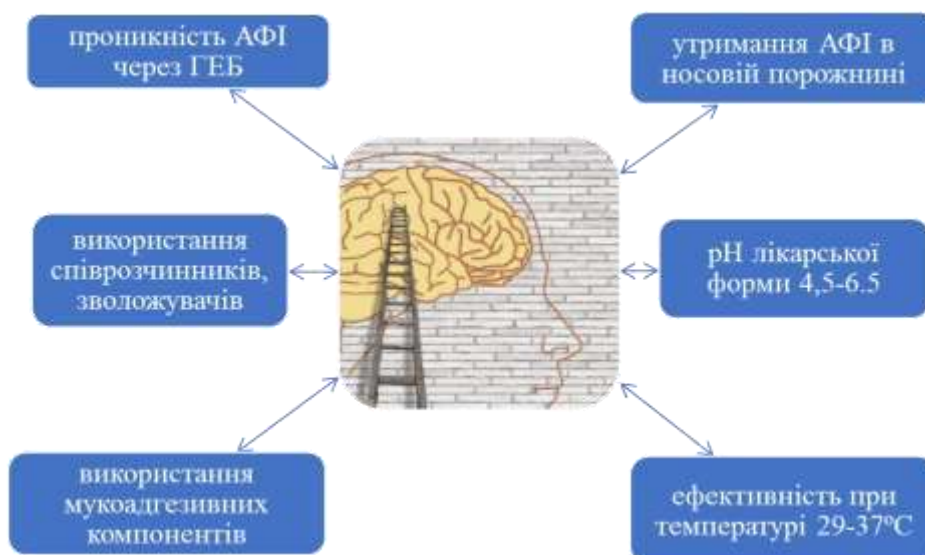


Рис. 3.2 Особливості фармацевтичної розробки назальних засобів церебропротективної дії

Так, враховуючи отриману нами інформацію щодо біологічних факторів, які впливають на доставку АФІ шляхом ніс-мозок, діюча речовина повинна проникати через ГЕБ, утримуватись в носовій порожнині впродовж 20-30 хв (робота мукоциліарного кліренсу). рН лікарської форми 4,5-6,5. Штучна зміна рН в носовій порожнині викликати подразнення слизової оболонки та інактивуватиме захисні ферменти. Розроблена лікарська форма повинна мати задовільні реологічні та біофармацевтичні властивості в діапазоні температур 29 до 37 °С.

Враховуючи різноманіття АФІ та допоміжних речовин, використання системного підходу в комплексі з сучасними інформаційними технологіями у вигляді експертних систем дозволить в подальшому проектувати якість на етапі розробки фармацевтичного продукту.

#### 3.4 Експертна система для назальних засобів системного застосування

Експертна система – засіб у вигляді комп'ютерної програми, яка відрізняється від традиційних комп'ютерних програм перш за все тим, що вона містить знання конкретної предметної області накопиченої в результаті

практичної діяльності людини та дозволяє вирішувати проблему в певній області знань за допомогою формалізованих правил, моделей або знань, які зберігаються в її вбудованій базі знань. Наразі експертні системи використовуються в різних галузях науки і техніки:

– *медицина* – системи діагностики, які дозволяють прогнозувати діагноз пацієнта та пропонувати стратегії лікування, шляхом відповіді на питання щодо симптомів, а також наявних показників лабораторних досліджень. Наприклад, Fahime Khozeimeh, Roohallah Alizadehsani, Mohamad Roshanzamir et al. [300] створили експертну систему, яка базується на нечіткій логіці, для вибору методу лікування доброякісних пухлин у вигляді папілом спричинених вірусом папіломи людини. Інші дослідники, Mutawa A. M., Mariam A. Alzuwawi [301] запропонували експертну систему для діагностики увеїту – запального захворювання увеї. Робота системи базується на опитуванні лікаря щодо симптомів пацієнта, та висвітлює підозри на захворювання і пропонує подальші дослідження щодо підтвердження або виключення супутніх захворювань;

– *фармація* – експертні системи для розробки лікарських засобів. Так, Inderbir Singh, Ajay Kumar Thakur, Rajni Bala, Reecha Madan запропонували експертну систему SeDeM для оцінки придатності допоміжних речовин до прямого пресування. Експертна система включає модель на 15 параметрів, яка може скорочувати час розробки таблеток [302];

– *легка промисловість* – експертні системи для легкої промисловості. Авторами Bullon Juan, González Arrieta Angélica, Hernández Encinas Ascensión, Queiruga Dios Araceli [303] наводиться характеристика експертної системи для текстильної промисловості. Експертна система сприяє збільшенню виробництва та зменшення втрат та включає математичні моделі для моделювання поведінки текстильних конструкцій (ниток, тканин). В якості класифікаторів використовуються штучні нейронні мережі;

– *телекомунікаційна сфера* – експертні системи для телекомів. Авторами Pievtsov Hennadii, Turinskyi Oleksandr, Zhyvotovskiyi Ruslan et al. [304] характеризується експертна система для аналізу електронного середовища в

режимі реального часу з використання штучних нейронних мереж, які дозволяють розпізнавати сигнал в умовах невизначеності та нечітких твердження його інтерпретації. Ефективність роботи досягається шляхом навчання архітектури штучних нейронних мереж;

– *фінансова сфера* – експертні системи використовуються для прогнозування ринків шляхом аналізу часових рядів. Наприклад, дослідниками Ludmila Dymova, Pavel Sevastjanov, Krzysztof Kaczmarek [305] характеризується експертна система показників технічного аналізу з застосуванням нечіткої логіки та теорії Демпстера – Шафера, яка дозволяла отримати задовільні результати на прикладі роботи чотирьох валютних пар.

Розробка експертної системи зазвичай складається з таких етапів: постановка завдання(визначається проблема, та підхід до її вирішення), розробка прототипу системи (прототип системи повинен підтвердити можливість вирішення практичних задач предметної області), оцінка роботи системи (проводиться користувачами для виявлення точності роботи), інтеграція (опрацьовується можливість оновлення системи шляхом отримання даних від зовнішніх баз даних, а також навчання користувачів), підтримка (надання консультацій користувачам в процесі використання системи).

При розробці експертних систем зазвичай використовуються такі технології:

- ✓ технологія, яка базується на використанні продукційних правил;
- ✓ технологія яка базується на знаннях, які були використані для вирішення аналогічної проблеми в минулому. Знання адаптуються до поточної проблеми, після вирішення її зберігаються в базі знань для подальшого використання.

Будь-яка проста експертна система містить три компоненти – інтерфейс для взаємодії з користувачами, база знань – всі опрацьовані знання по заданій галузі, механізм або комплекс механізмів з метою формування висновків для вирішення заданої проблеми (рис. 3.3).



Рис. 3.3. Компоненти експертної системи

Різноманіття біологічних, фізико-хімічних, технологічних факторів, які впливають на транспортування АФІ до мозку, шляхом інтраназального введення, обумовлюють розробку методології проектування та розробку програмного засобу у вигляді експертної системи з назальних лікарських засобів («ExpSys Nasalia»), яка враховуватиме фактори, фізико-хімічні властивості діючих та допоміжних речовин та прогнозуватиме раціональні рецептури в фармацевтичній розробці.

Здатність АФІ у назальній формі церебропротективної дії проникати через гематоенцефалічний бар'єр – є одним з найвагоміших факторів, які впливають на нейродоступність препарату. Для використання в «ExpSys Nasalia» можливості вибору стратегії формування рецептури в залежності від проникності через гематоенцефалічний бар'єр проводили розробку моделі, яка зможе прогнозувати з високою достовірністю нейродоступність у обраного АФІ.

3.4.1 Розробка моделей машинного навчання для прогнозу проникнення АФІ через ГЕБ. Моделювання проникності сполук через гематоенцефалічний бар'єр здійснювалось різними способами, наприклад, дослідниками розраховувались показники LogBB, LogP, LogD, які потім апроксимувались до експериментальних даних шляхом створення продукційних правил – «якщо – то» [306, 307]. Проте, різний механізм транспорту (пасивний та активний), а також різноманіття активнодіючих сполук ускладнює створення продукційних правил. Враховуючи вищезазначене, актуальним та перспективним є застосування *in silico* моделювання для створення моделей машинного навчання прогнозу проникності сполук через гематоенцефалічний бар'єр з метою використання їх в експертній системі «ExpSys Nasalia» при розробці назальних засобів церебропротективної дії. Останнім часом моделі машинного навчання широко застосовують в різних наукових напрямках та дозволяють отримувати прогнозування з високою достовірністю [308-310].

Створення датасету для навчання моделей брали шляхом аналізу бібліотеки PubMed ([pubmed.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)) в ручному режимі, за ключовими словами («bbb penetration», «in silico bbb test», «Blood-Brain Barrier Permeability», «Blood Brain Barrier»). В датасет вносили дані молекули у вигляді специфікації спрощеного представлення молекул в рядку введення (SMILES) та класифікаційні позначки: 1 – проникає, 0 – не проникає. SMILES для знайдених речовин шукали за допомогою сервісу PubChem ([pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)). В якості методів використовували набір методів бінарної класифікації машинного навчання ([rusaret.org](http://rusaret.org)), з використанням мови програмування python 3.8 ([python.org](http://python.org)) в середовищі управління пакетами miniconda ([conda.io](http://conda.io)). Програмування пайплайну (pipeline) здійснювали за допомогою пакету jupyter notebook ([jupyter.org](http://jupyter.org)). Генерацію ознак в датасеті з SMILES проводили за допомогою пакету RDKit ([rdkit.org](http://rdkit.org)).

Пайплайн розробки моделей включав наступні етапи: завантаження датасету, генерація ознак датасету, нормалізація датасету (перевірка на

наявність пропущених даних, заповнення їх або видалення молекули), вибір кращих трьох моделей класифікації, за критерієм AUC (від 0,5 до 1), оптимізація обраних моделей, збереження моделей для використання в експертній системі «ExpSys Nasalia».

На початку дослідження імпортували необхідні бібліотеки для роботи моделювання, потім завантажували створений датасет з даними та проводили генерацію ознак молекул (feature engineering) шляхом послідовної обробки SMILES. В якості ознак (дескрипторів) використовували: ключі MACCS (Molecular ACCess System keys), молекулярну масу (molecular\_weight, Molecular weight), коефіцієнт розподілення (log\_p, Wildman-Crippen LogP value), молекулярну рефракцію (log\_mr, Wildman-Crippen MR value), кількість акцепторів Н-зв'язків Ліпінського для молекули (num\_lipinskiy\_hba, number of Lipinski H-bond acceptors for a molecule), кількість донорів Н-зв'язків Ліпінського для молекули (num\_lipinskiy\_hbd, number of Lipinski H-bond donors for a molecule), кількість донорів Н-зв'язків для молекули (h\_bond\_donor, number of H-bond donors for a molecule), кількість акцепторів Н-зв'язку для молекули (h\_bond\_acceptors, number of H-bond acceptors for a molecule), кількість рухомих в'язків молекули (rotatable\_bonds, number of rotatable bonds for a molecule), число атомів (number\_of\_atoms), площу топологічної полярної поверхні (tpsa, topological polar surface area), формальний заряд молекули (formal\_charge, formal charge for the molecule), кількість важких атомів (heavy\_atoms, number of heavy atoms), правило 5 Ліпінського - (lipinski\_rule\_of\_5, Lipinski's rule of five), фільтр Гоше (ghose\_filter, Ghose filter), фільтр Вебер (veber\_filter, Veber filter), правило трьох (rule\_of\_3, rule of three), REOS Filter (reos\_filter, rapid elimination of swill), логарифм співвідношення концентрації речовини в мозку до плазми, розрахований за Clark (log\_bb\_clark, logarithm value of brain to plasma concentration ratio) [311, 312], логарифм співвідношення концентрації речовини в мозку до плазми, розрахований за Rishton (log\_bb\_rishton, logarithm value of brain to plasma concentration ratio) [311, 312], (рис. 3.4).

```

#Імпортуємо бібліотеки для конструювання ознак молекул (feature engineering) та для класифікації
import pandas as pd
from rdkit.Chem import AllChem, Descriptors, MolFromSmiles, Crippen, rdMolDescriptors, rdchem, QED, rdMolOps, MACCSkeys
from rycaret.classification import *
from rycaret.datasets import get_data

dataset = pd.read_csv(filepath or buffer='BBB_Permeability.csv')
dataset.set_index('num', inplace=True)

# Функція характеризує молекулу у змужанні ключів MACCS (Molecular Access System) keys
def get_feature(smiles):
    try:
        mol_maccskeys = [int(x) for x in MACCSkeys.GenMACCSKeys(MolFromSmiles(smiles)).ToBitString()]
        res_df = pd.DataFrame([mol_maccskeys, mol_maccskeys]).iloc[[0]]
        return res_df
    except Exception as e:
        return []

```

Рис. 3.4. Імпорт бібліотек для генерації ознак молекул та створення моделей машинного навчання

Після наповнення датасету ознаками молекул, проводили вибір трьох найкращих методів бінарної класифікації з тринадцяти найбільш розповсюджених. Вибір бібліотеки машинного навчання PyCaret обумовлений її простотою використання. Для побудови пайплайну, в порівнянні з іншими бібліотеками, такими, як Tensorflow, Keras, PyTorch, Scikit-learn потрібно використати невелику кількість програмного коду, що в результаті дозволяє за більш короткий час перевірити більшу кількість гіпотез та обрати кращу модель для прогнозування проникності активних фармацевтичних інгредієнтів через гематоенцефалічний бар'єр (рис. 3.5).

```

classification = setup(data, target = 'penetration', session_id=3,
    imputation_type='iterative', normalize = True, transformation = True,
    remove_multicollinearity = True, multicollinearity_threshold = 0.90,
    log_experiment=False, n_jobs=-1,
    numeric_features=['num_lipinskiy_hbd',
        'h_bond_donor',
        'formal_charge',
        'heavy_atoms',
        'lipinski_rule_of_5',
        'veber_filter',
        'ghose_filter',
        'rule_of_3',
        'reos_filter',
        'log_bb_clark',
        'log_bb_rishton'],
    feature_selection = True,
    experiment_name='bbbp_predict')

```

Рис. 3.5. Налаштування бібліотеки PyCaret для вибору методів бінарної класифікації



Дослідний датасет поділяли випадковим чином на датасет для навчання, який в результаті містив 1427 сполук, та датасет для перевірки – 612 сполук. В подальшому навчання моделей проводили на датасеті для навчання. Отримали наступні результати (рис. 3.6).

```
show_best_models = compare_models(sort = 'AUC')
```

	Model	Accuracy	AUC	Recall	Prec.	F1	Kappa	MCC	TT (Sec)
rf	Random Forest Classifier	0.8908	0.9192	0.9668	0.8972	0.9305	0.6769	0.6893	0.3180
et	Extra Trees Classifier	0.8948	0.9186	0.9628	0.9047	0.9326	0.6936	0.7036	0.2990
lightgbm	Light Gradient Boosting Machine	0.8758	0.9151	0.9509	0.8926	0.9205	0.6373	0.6465	0.0510
gbc	Gradient Boosting Classifier	0.8697	0.9095	0.9535	0.8841	0.9172	0.6131	0.6248	0.1460
knn	K Neighbors Classifier	0.8677	0.8926	0.9456	0.8877	0.9154	0.6128	0.6226	0.1030
lr	Logistic Regression	0.8687	0.8866	0.9429	0.8905	0.9157	0.6200	0.6278	0.9210
lda	Linear Discriminant Analysis	0.8658	0.8842	0.9456	0.8854	0.9143	0.6061	0.6150	0.0220
ada	Ada Boost Classifier	0.8567	0.8761	0.9389	0.8797	0.9082	0.5826	0.5906	0.0660
nb	Naive Bayes	0.7977	0.8244	0.8234	0.9013	0.8574	0.5020	0.5125	0.0110
qda	Quadratic Discriminant Analysis	0.8257	0.8085	0.8845	0.8858	0.8827	0.5336	0.5420	0.0210
dt	Decision Tree Classifier	0.8167	0.7597	0.8726	0.8835	0.8777	0.5106	0.5125	0.0150
svm	SVM - Linear Kernel	0.8427	0.0000	0.9230	0.8764	0.8980	0.5501	0.5666	0.0190
ridge	Ridge Classifier	0.8718	0.0000	0.9562	0.8844	0.9187	0.6176	0.6303	0.0120

Рис. 3.6. Вибір моделей машинного навчання бінарної класифікації (сортування за AUC)

Отримані дані свідчать, що найбільш перспективними за критерієм AUC - є моделі машинного навчання: випадковий ліс (Random Forest Classifier), класифікатор додаткових дерев (Extra Trees Classifier) та Light Gradient Boosting Machine, в яких AUC 0,9192, 0,9186, 0,9151 відповідно. Тому для подальших досліджень обрали ці моделі. Для кожної з моделей вивчали ознаки, які впливають на точність класифікації.

Як видно з наведених даних рис. 3.7, в дослідних моделях класифікації важливість ознак має різну вагу та послідовність. Так, в моделі Random Forest Classifier найбільш вагомими є – tpsa, h\_bond\_donor, log\_p, molecular\_weight. Для моделі Light Gradient Boosting Machine - log\_p, molecular\_weight, tpsa. Extra Trees Classifier виділяє тільки veber\_filter.

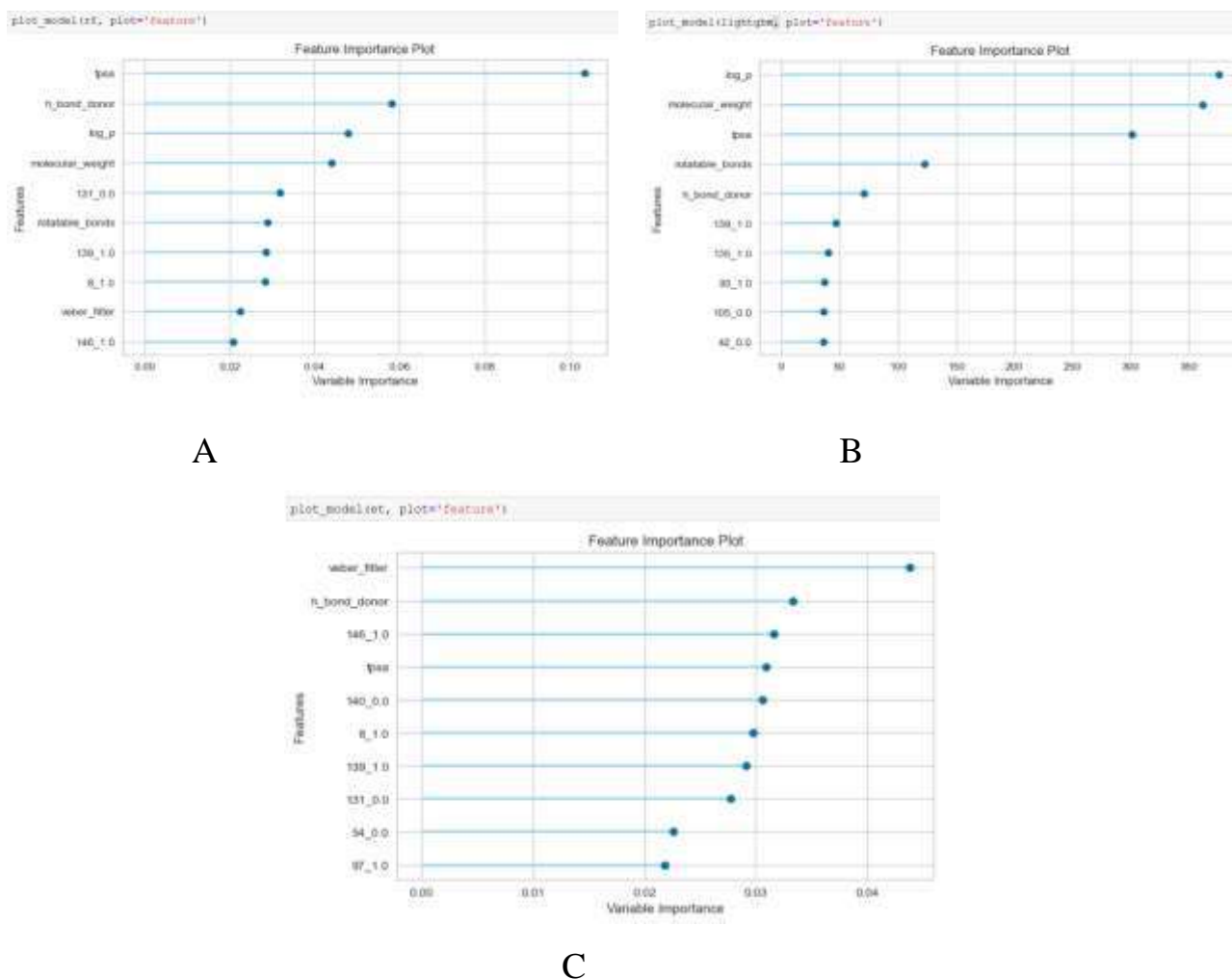


Рис. 3.7. Характеристика та важливість ознак, які впливають на точність класифікації (A – модель Random Forest Classifier; B – Light Gradient Boosting Machine; C – Extra Trees Classifier)

На наступному етапі, використовуючи техніки більш точного підбору гіперпараметрів моделей проводили їх оптимізацію за критерієм AUC (рис. 3.8).

```
tuned_top3 = [tune_model(i, n_iter=300, fold=20, optimize = 'AUC') for i in [rf, lightgbm, et]]
bagged_top3 = [ensemble_model(i, method = 'Bagging',
                             n_estimators = 300, fold=20,
                             optimize = 'AUC') for i in [rf, lightgbm, et]]
blender = blend_models(estimator_list = tuned_top3, method = 'soft')
```

Рис. 3.8 Оптимізація підбору гіперпараметрів моделей

Після проведених оптимізацій, для навчених моделей виконували метод ансамблювання (змішування), який здійснює консенсус для формування

остаточних прогнозів, при цьому використовуються різні алгоритми машинного навчання з метою прогнозування середньої ймовірності для кінцевого результату.

На наступному етапі проводили перевірку навчених моделей на датасеті для перевірки, який не використовували для навчання моделей, в результаті отримали наступні результати (рис. 3.9).

```
unseen_predictions = predict_model(stacker, data=data_unseen)
from pycaret.utils import check_metric
check_metric(unseen_predictions['penetration'], unseen_predictions['Label'], metric = 'AUC')
0.8229
```

Рис. 3.9. Перевірка прогнозування моделі на валідаційному датасеті

3.4.2 Розробка моделей машинного навчання для прогнозу виникнення фармацевтичних несумісностей в рецептурі назальної лікарської форми. Однією з відомих проблем в фармацевтичній розробці нових лікарських форм є обґрунтування складу рецептури для подальшого опрацювання технології екстемпорального або промислового виготовлення. Після вибору активної речовини, які будуть забезпечувати очікуваний терапевтичний ефект та виду лікарської форми, потрібно теоретично та практично обґрунтувати вміст допоміжних речовин в лікарській формі. Серед вимог, які пред'являються до допоміжних речовин є безпечність, біосумісність, надання лікарській формі належних властивостей (консистенція, форма, фізико-хімічні властивості), індіферентність [313, 314].

Нині в світі існує значна кількість активних фармацевтичних інгредієнтів, а також допоміжних речовин органічної та неорганічної природи, з різними фізико-хімічними властивостями. При розробці нових лікарських форм, в рецептурі, виникають різноманітні поєднання діючих та допоміжних речовин, які можуть призводити до фармацевтичних несумісностей. Фармацевтичні несумісності (Incompatibilita pharmaceutica) – явище обумовлене взаємодією між інгредієнтами рецептури, яке призводить до значної зміни фізико-хімічних властивостей готової лікарської форми [315].

Для експериментального вивчення можливої взаємодії інгредієнтів рецептури наразі використовується декілька підходів. Створюють бінарну суміш активного фармацевтичного інгредієнту та допоміжної речовини, яку тестують без додавання води та з додаванням води. В якості інструментальних методів використовують ізотермічне стрес тестування (isothermal stress testing IST), високоефективну рідинну хроматографію (high performance liquid chromatography HPLC), термічні методи: диференційну сканувальну калориметрію (differential scanning calorimetry DSC) та термогравіметрію (thermal gravimetry TG, DTA) [316, 317].

З метою ресурсозбереження активних фармацевтичних інгредієнтів та допоміжних речовин, на ранніх етапах дослідження при плануванні експерименту, доцільно використати знання щодо прогнозованих та експериментальних фізико-хімічних властивостей, які знаходяться в різних агрегаційних базах даних, наприклад таких як Pubchem ([pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)) або Drugbank ([drugbank.com](http://drugbank.com)). Знайдена інформація дозволить скоротити час на розробку складу та опрацювання технології. Проте, різноманіття характеристик активних сполук та допоміжних речовин не завжди знаходить відображення в зазначених сервісах.

Для опрацювання моделей машинного навчання потрібно використати певний об'єм інформації, який міститиме дані відносно сполук (діючих та допоміжних) та ознаки, щодо наявності або відсутності взаємодії (фармацевтичної несумісності). Тому, для наповнення датасету для навчання (training datasets), використовували метод контент аналізу даних бібліотеки PubMed ([pubmed.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)) в ручному режимі, за ключовими словами («pharmaceutical incompatibilities», «physico-chemical compatibility», «incompatible excipients») за останні 10 років. Аналізуючи літературні посилання, до датасету вносили композицію з двох сполук (їх традиційні або хімічні назви) та класифікаційні позначки: 1 або 0 (композиція: 1 – сумісна, 2 – несумісна). Об'єм отриманого датасету – 1185 рядків. В якості методів використовували набір методів бінарної класифікації машинного навчання

(pyscaret.org) з використанням мови програмування python 3.8 (python.org) в середовищі управління пакетами miniconda (conda.io). Програмування пайплайну (pipeline) здійснювали за допомогою пакету jupyter notebook (jupyter.org). Генерацію ознак сполук – MACCS (Molecular ACCess System keys), в навчальному датасеті, проводили за допомогою пакету RDKit (rdkit.org). Специфікації спрощеного представлення молекул в рядку введення (SMILES), в автоматичному режимі, шукали за допомогою сервісу PubChem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

Пайплайн підготовки даних дослідження програмували в наступній послідовності: завантаження до робочої пам'яті дослідного датасету з назвами сполук та класифікаційними ознаками (1 або 0) (рис. 3.10), трансформація датасету з метою отримання SMILES сполук (рис. 3.11), генерація ознак молекул (feature engineering) шляхом послідовної обробки SMILES (рис. 3.12), нормалізація датасету, а саме перевірка на наявність пропущених даних, та їх заповнення.

Після проведеної підготовки даних, отримали датасет, який містив MACCS ключі для дослідних пар сполук (167 ознак на кожен сполук), а також класифікаційну позначку 1 або 0. Для подальшого машинного навчання, дослідний датасет випадковим алгоритмом поділяли на датасет для навчання (769 сполук) та датасет для перевірки (192 сполуки). Потім проводили попередній аналіз отриманих моделей без оптимізації на датасеті для навчання та обирали 3 перспективних моделі класифікації за критерієм AUC (*Area Under the Curve*). Враховуючи, що дослідний датасет містить бінарні групи 2x167 ознак, всередині групи яких може виникати колінеарність (явище, при якому одна змінна в наборі лінійно корелює з іншою характеристикою), додатково налаштовували класифікатор для мінімізації цього явища.

Як видно з отриманих даних (рис. 3.13), найбільш перспективними, відповідно до обраного критерію AUC, для подальшого дослідження є моделі: класифікатор додаткових дерев (Extra Trees Classifier, ET) AUC 0,9684, категоріальний бустінг (CatBoost Classifier, CatBoost) AUC 0,9677,

екстремальний градієнтний бустінг (Extreme Gradient Boosting, EGB) AUC 0,9659, випадковий ліс (Random Forest Classifier, RF) AUC 0,9646, Light Gradient Boosting Machine (LIGHTGBM) AUC 0,9631. На наступному етапі, з обраними моделями проводили різноманітні техніки машинного навчання Ensembling (Stacking, Boosting, Blending) для більш детальної оптимізації.

```

from typing import Union, List, Dict
from tqdm.notebook import trange, tqdm
import requests
import json
import pandas as pd
from rdkit.Chem import AllChem, Descriptors, MolFromSmiles, Crippen, rdMolDescriptors, rdchem, QED, rdMolOps, MACCSkeys
import pycaret.classification as pycaret_class

dataset_in = pd.read_csv(filepath_or_buffer='incopartible_exipients.csv', sep=';')
dataset_in.set_index('num', inplace=True)

```

Рис. 3.10. Імпортування необхідних бібліотек та дослідного датасету до робочої пам'яті

```

def get_feature_from_name(compound:str)->Union[Dict[str,str]]:
    cid=""
    smiles=""
    title=""
    error=""
    url = 'https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/rest/pug/compound/name/{}/property/Title,CanonicalSMILES/json'.format(compound)
    try:
        response = requests.get(url)
        response.raise_for_status()
        raw=json.loads(response.text)
        try:
            cid=raw['PropertyTable']['Properties'][0]['CID']
        except Exception as e:
            cid=""
            error = e
        try:
            smiles = raw['PropertyTable']['Properties'][0]['CanonicalSMILES']
        except Exception as e:
            smiles = ''
            error = e
        try:
            title = raw['PropertyTable']['Properties'][0]['Title']
        except Exception as e:
            title = ''
            error = e
    except Exception as e:
        error = 'Pubchem error - {}'.format(e)
    return {'cid':cid, 'smiles':smiles, 'title':title, 'error':''}

```

Рис. 3.11. Функція отримання SMILES з традиційної або хімічної назви сполуки



```

def get_fingerprint_maccs(smiles:str, prefix:str, num:int)->pd.DataFrame:
    if len(smiles)>0:
        try:
            mol_maccskeys = [int(x) for x in MACCSkeys.GenMACCSKeys(MolFromSmiles(smiles)).ToBitString()]
            res_df = pd.DataFrame([mol_maccskeys,mol_maccskeys]).iloc[[0]]
            old_column=[el for el in range(0,167)]
            new_column=['{}_{}'.format(prefix, el) for el in old_column]
            res_df.rename(columns=dict(zip(old_column, new_column)), inplace=True)
            res_df['num']=num
            res_df.set_index('num', inplace=True)
            return res_df
        except Exception as e:
            columns_new=['{}_{}'.format(prefix, el) for el in range(0,167)]
            res_df = pd.DataFrame(columns=columns_new)
            res_df['num']=1
            res_df.set_index('num', inplace=True)
            return res_df
    else:
        columns_new=['{}_{}'.format(prefix, el) for el in range(0,167)]
        res_df = pd.DataFrame(columns=columns_new)
        res_df['num']=1
        res_df.set_index('num', inplace=True)
        return res_df

```

Рис. 3.12. Функція генерації ключів MACCS для дослідних сполук

	Model	Accuracy	AUC	Recall	Prec.	F1	Kappa	MCC	TT (Sec)
<b>et</b>	Extra Trees Classifier	0.9071	0.9684	0.9409	0.9275	0.9333	0.7794	0.7834	0.267
<b>catboost</b>	CatBoost Classifier	0.9201	0.9677	0.965	0.9252	0.9438	0.8054	0.8128	4.737
<b>xgboost</b>	Extreme Gradient Boosting	0.909	0.9659	0.9462	0.9261	0.9349	0.783	0.7895	0.206
<b>rf</b>	Random Forest Classifier	0.9034	0.9646	0.9382	0.9247	0.9303	0.772	0.7775	0.297
<b>lightgbm</b>	Light Gradient Boosting Machine	0.9107	0.9631	0.9408	0.9326	0.9358	0.7883	0.7922	0.101
<b>gbc</b>	Gradient Boosting Classifier	0.9052	0.9591	0.9462	0.9204	0.9324	0.7737	0.7785	0.112
<b>knn</b>	K Neighbors Classifier	0.8736	0.9265	0.9461	0.8814	0.912	0.6881	0.6967	0.088
<b>ada</b>	Ada Boost Classifier	0.8587	0.9246	0.9245	0.8824	0.9004	0.6538	0.6671	0.064
<b>lr</b>	Logistic Regression	0.8587	0.9223	0.9111	0.8894	0.8987	0.6636	0.671	0.347
<b>qda</b>	Quadratic Discriminant Analysis	0.8793	0.8976	0.8488	0.9734	0.9054	0.7406	0.757	0.019
<b>lda</b>	Linear Discriminant Analysis	0.859	0.8615	0.9378	0.8697	0.9019	0.6521	0.6606	0.021
<b>nb</b>	Naive Bayes	0.5537	0.8464	0.3883	0.9203	0.5408	0.2315	0.3175	0.012
<b>dt</b>	Decision Tree Classifier	0.8698	0.8433	0.9138	0.9007	0.9066	0.6916	0.6948	0.012
<b>svm</b>	SVM - Linear Kernel	0.8475	0	0.9085	0.8787	0.8919	0.6319	0.6392	0.014
<b>ridge</b>	Ridge Classifier	0.872	0	0.9432	0.881	0.91	0.6874	0.6976	0.012

Рис. 3.13 Попередній аналіз моделей машинного навчання бінарної класифікації

В результаті, для кожного виду моделі отримали ще додатково по три моделі (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**Статистичні показники оптимізованих моделей машинного навчання  
(mean±sd)**

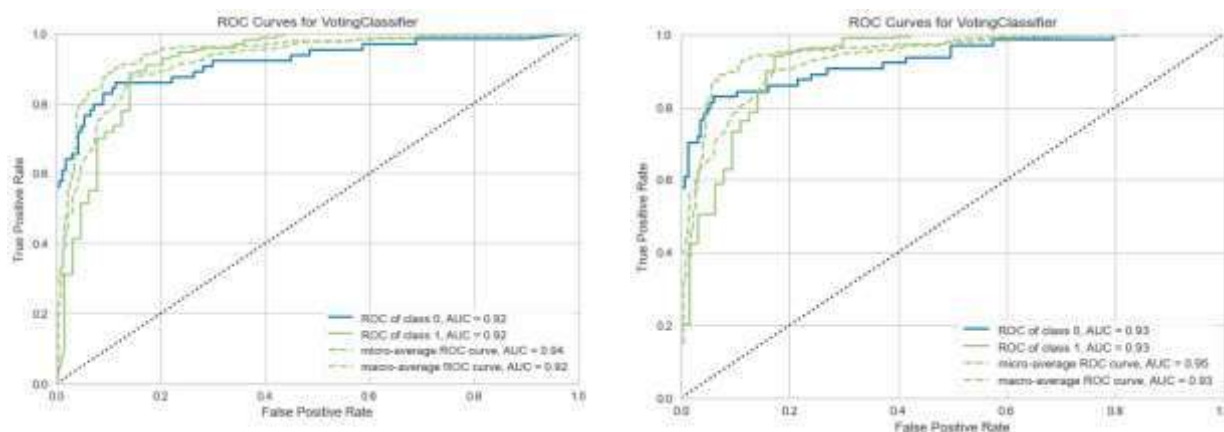
Модель	Accuracy	AUC	F1	MCC
RF (tuned)	0.9051 ±0.0271	0.9657 ±0.0157	0.9304 ±0.0195	0.7878 ±0.0666
RF (bagged)	0.9015 ±0.0264	0.9608 ±0.0203	0.9305 ±0.018	0.7689 ±0.0633
RF (calibrated)	0.9034 ±0.0351	0.9666 ±0.0151	0.9302 ±0.0257	0.7777 ±0.0811
CatBoost (tuned)	0.9108 ±0.0359	0.9655 ±0.0227	0.9368 ±0.0251	0.7921 ±0.0867
CatBoost (bagged)	0.9015 ±0.03	0.9643 ±0.0214	0.9306 ±0.0205	0.7684 ±0.0731
CatBoost (calibrated)	0.9145 ±0.0313	0.967 ±0.0185	0.9395 ±0.0214	0.8004 ±0.0764
LIGHTGBM (tuned)	0.9108 ±0.0331	0.9681 ±0.0183	0.9362 ±0.0232	0.7916 ±0.0804
LIGHTGBM (bagged)	0.9071 ±0.0342	0.9645 ±0.0211	0.9335 ±0.0241	0.7849 ±0.0833
LIGHTGBM (calibrated)	0.9145 ±0.0278	0.9681 ±0.0165	0.9391 ±0.0194	0.8018 ±0.0664
EGB (tuned)	0.8959 ±0.0292	0.9699 ±0.0164	0.9289 ±0.0186	0.7545 ±0.0705
EGB (bagged)	0.9071 ±0.0389	0.964 ±0.0198	0.9336 ±0.0279	0.7843 ±0.0916
EGB (calibrated)	0.9126 ±0.03	0.9671 ±0.0182	0.9381 ±0.0207	0.796 ±0.0726
ET (tuned)	0.894 ±0.0313	0.9645 ±0.02	0.9215 ±0.0232	0.7645 ±0.0737
ET (bagged)	0.9034 ±0.0341	0.9636 ±0.0191	0.9307 ±0.0246	0.7762 ±0.0799
ET (calibrated)	0.9052 ±0.0419	0.9653 ±0.0179	0.9316 ±0.0307	0.7828 ±0.097

Аналізували отримані моделі за комплексом статистичних показників: Accuracy, AUC, F1, MCC. Виявили, що техніки оптимізації машинного



навчання покращили статистичні показники досліджуваних моделей. Вподальшому, групували моделі за їх природою (tree, boosting) та використовували техніку змішування моделей (blending models), яка дозволяє поєднувати різні алгоритми машинного навчання з використанням більшості голосів або середніх прогнозованих ймовірностей для прогнозування кінцевого результату.

В результаті змішування отримали дві перспективні моделі машинного навчання бінарної класифікації (рис. 3.14), якість роботи яких перевіряли на датасеті для перевірки (192 сполуки). Датасет для перевірки не використовувався у навчанні цих моделей. Отримані статистичні оцінки моделей (рис. 3.15): tree\_blender (AUC 0.9521, F1 0.9747, MCC 0.9094), boost\_blender (AUC 0.9593, F1 0.9821, MCC 0.9352) свідчать про високу ймовірність *in silico* прогнозу щодо наявності або відсутності фармацевтичних несумісностей при розробці назальних рецептур церебропротективних лікарських форм. Опрацьовані моделі сприяють оптимізації рецептури у розробці нових назальних засобів церебропротективної дії та розміщені на веб сервері експертної системи «ExpSys Nasalia» (nasalia.zsmu.zp.ua) в розділі розрахунки.



A

B

Рис. 3.14. Криві навчання моделей машинного навчання blending tree, blending boosting (A – змішана модель blending tree (tuned\_class\_rf, tuned\_class\_et, B – змішана модель blending boosting (tuned\_class\_catboost, tuned\_class\_lightgbm, tuned\_class\_xgboost))

```

unseen_predictions_boost = pycaret_class.predict_model(finalized_blender_specific_boost_tuned_models,
                                                       data=data_unseen)
blender_boost_models_auc = check_metric(unseen_predictions_boost['Compatible'],
                                         unseen_predictions_boost['Label'],
                                         metric='AUC')
blender_boost_models_f1 = check_metric(unseen_predictions_boost['Compatible'],
                                       unseen_predictions_boost['Label'],
                                       metric='F1')
blender_boost_models_mcc = check_metric(unseen_predictions_boost['Compatible'],
                                        unseen_predictions_boost['Label'],
                                        metric='MCC')
unseen_predictions_tree = pycaret_class.predict_model(finalized_blender_specific_tuned_tree_custom_models,
                                                       data=data_unseen)
blender_tree_models_auc = check_metric(unseen_predictions_tree['Compatible'],
                                       unseen_predictions_tree['Label'],
                                       metric='AUC')
blender_tree_models_f1 = check_metric(unseen_predictions_tree['Compatible'],
                                      unseen_predictions_tree['Label'],
                                      metric='F1')
blender_tree_models_mcc = check_metric(unseen_predictions_tree['Compatible'],
                                       unseen_predictions_tree['Label'],
                                       metric='MCC')

print("Датасет для перевірки(модель tree_blender): AUC {}, F1 {}, MCC {}".format(blender_tree_models_auc,
                                                                                blender_tree_models_f1,
                                                                                blender_tree_models_mcc))
print("Датасет для перевірки(модель boost_blender): AUC {}, F1 {}, MCC {}".format(blender_boost_models_auc,
                                                                                blender_boost_models_f1,
                                                                                blender_boost_models_mcc))

```

Датасет для перевірки(модель tree\_blender): AUC 0.9521, F1 0.9747, MCC 0.9094  
Датасет для перевірки(модель boost\_blender): AUC 0.9593, F1 0.9821, MCC 0.9352

Рис. 3.15. *In silico* прогноз на датасеті для перевірки

### 3.5 Обґрунтування вибору упаковки для назальних засобів церебропротективної дії

Упаковка для назальних засобів системної дії має бути безпечною та забезпечувати належне транспортування назального розчину до носової порожнини. Відповідно до попередніх досліджень встановлено, що для збільшення тривалості знаходження лікарського препарату в назальній порожнині застосовують мукоадгезивні компоненти, які крім взаємодії з муциновими рецепторами, підвищують в'язкість назального препарату. Враховуючи характер полімерів, які можуть використовуватись в назальних засобах, доцільно до рецептури препаратів, також вводити компоненти зволожувальної дії.

З біофармацевтичної точки зору, вивільнення діючих речовин відбувається інтенсивніше з гомогенних лікарських форм гідрофільної природи [318-320]. Тому, з метою обґрунтування консистентних властивостей назальних форм церебропротективної дії, проводили вивчення реологічних досліджень рецептур мукоадгезивних полімерів, з зволожуючим компонентом (табл. 3.2). В якості

мукоадгезивних гелеутворювачів використовували натрієву сіль карбоксиметилцелюлози, гіалуронат натрію, альгінат натрію, гідроксиетилцелюлозу, хітозан. Зволожуючим компонентом слугував гліцерин.

Таблиця 3.2

### Рецептури складів гідрофільних систем з мукоадгезивними полімерами

Найменування допоміжної речовини	Гідрофільні системи (№ композиції)				
	1а	2а	3а	4а	5а
ГЕЦ	2,0	–	–	–	–
НаКМЦ	–	2,0	–	–	–
Хітозан	–	–	7,0	–	–
Лимонна кислота	–	–	21	–	–
Гіалорунат натрію	–	–	–	3,0	–
Альгінат натрію	–	–	–	–	3,0
Гліцерин	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Вода очищена	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100

Приготування розчинів полімерів проводилось за наступною технологією. При приготуванні основ-носіїв з хітозаном спочатку готували розчин кислоти лимонної. Потім наважку полімеру заливали розчином кислоти та перемішували до повного розчинення. При приготуванні розчинів натрій КМЦ, натрію альгінату і гідроксиетилцелюлози наважку полімеру заливали водою очищеною і залишали для набрякання на 30-40 хв. Після цього перемішували при нагріванні до утворення розчинів. При приготуванні розчину натрію глюкуронату наважку полімеру заливали водою очищеною, залишали для набрякання 30 хв, після чого перемішували до розчинення (без нагрівання). До всіх розчинів додавали 5% гліцерину (для попередження висихання).

Структурно-механічні характеристики вивчали за допомогою модульного компактного реометру MCR 302 (Anton Paar GmbH) в ротаційних тестах. В якості вимірювального пристрою, використовували коаксіальні циліндри

CC27/T200/SS. Дослідження проводили при температурі ( $25 \pm 0,5$  °C), яка забезпечувалась вбудованим термостатом. Протягом всього дослідження, програмне забезпечення (RheoCompass) реєструвало показники швидкості зсуву (Shear rate  $\dot{\gamma}$ ,  $s^{-1}$ ), напруги зсуву (Shear stress  $\tau$ , Pa) та в'язкості (viscosity  $\eta$ , Pa·s (mPas)). Отримані результати відображались табличних даних та візуалізовувались в реограмах плинину (рис. 3.16).

Отримані дані свідчать (рис. 3.17), що досліджувані композиції, в переважній більшості, входили в реологічний оптимум консистенції для гідрофільних систем, який досить часто використовується дослідниками для підтвердження якості та консистентних властивостей лікарських форм для зовнішнього застосування. Такі системи характеризуються тиксотропними властивостями з здатністю відновлювати свою структуру після прикладеного руйнівного зусилля. Тому на наступному етапі дослідження, зазначеними композиціями наповнювали доступні назальні упаковки, а саме безпропелентну аерозольну упаковку, тубу пластикову (10 мл), флакон з піпеткою та шприц типу Луер з атомайзером з метою вивчення однорідності маси, що доставляється та ефективності вивільнення назального гідрофільного гелю. Для порівняння, в експерименті також використовували ізотонічний розчин хлориду натрію 0,9%, в'язкість якого близька до в'язкості води. Пропелентну аерозольну упаковку не використовували в зв'язку з технологічними особливостями виготовлення, обумовленими наявністю в технології вибухонебезпечних газів під тиском.

За результатами досліджень встановлено, що обрані для тестування гідрофільні композиції, крім натрію хлориду, за рахунок своїх консистентних властивостей ускладнено дозуються зазначеними упаковками (табл. 3.3). Так у БАУ при натисканні на клапан насоса, евакуація композицій відбувалась неоднорідно, серед десяти натискань тільки у чотирьох випадках спостерігалось транспортування основи).

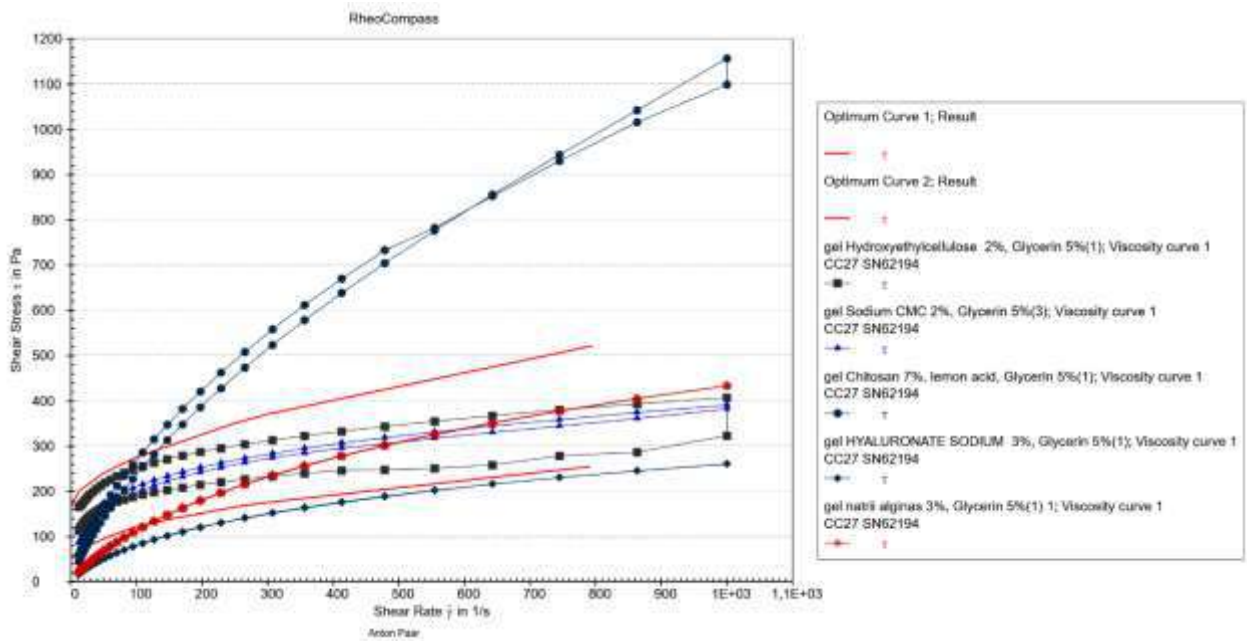


Рис. 3.16. Реограми плинуну гідрофільних систем з мукоадгезивним полімерами

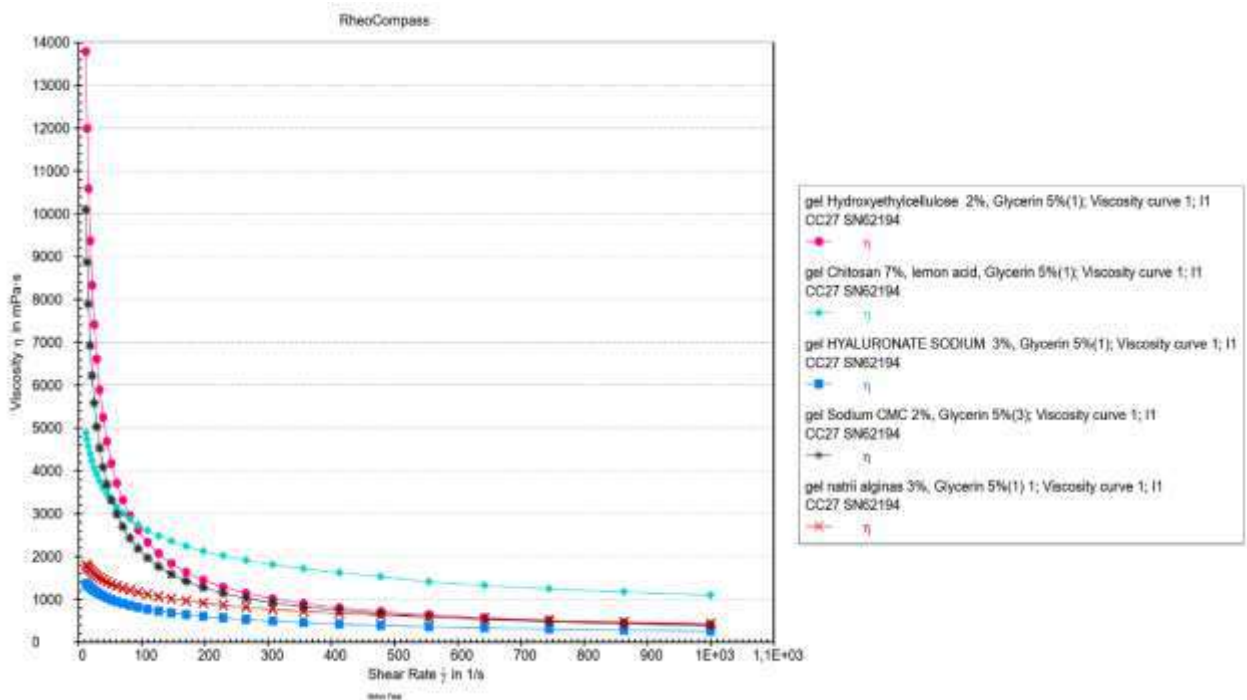


Рис. 3.17. Динаміка зміни в'язкості гідрофільних систем з мукоадгезивними полімерами

**Евакуаційні характеристики упаковки для назальних засобів  
системного застосування**

Номер гідрофільної композиції / NaCl 0,9%	Вид упаковки (ОМ)			
	БАУ	туба, г ( $\bar{x} \pm \Delta x$ )	флакон з піпеткою	шприц з атомайзером
1a	ОМ(-)	7,026±0,018	ОМ(-)	ОМ(-)
2a	ОМ(-)	7,228±0,024	ОМ(-)	ОМ(-)
3a	ОМ(-)	8,135±0,016	ОМ(-)	ОМ(-)
4a	ОМ(-)	8,345±0,008	ОМ(-)	ОМ(-)
5a	ОМ(-)	9,135±0,044	ОМ(-)	ОМ(-)
NaCl 0,9%	0,215±0,005	10,105±0,048	0,0106±0,0005	2,031±0,016

Примітка. ОМ(-) – однорідність маси, що доставляється, неможливо визначити; відповідно до нормативної документації на обрані упаковки: для БАУ одне натискання на клапан повинно забезпечувати 0,2 мл (0,2 г) розчину; об'єм туби 10 мл (маса наповнення 10 г); шприц – 2 мл (2 г)

Досліджувані основи добре видавлювались з туби, проте, однорідність маси, що доставляється була незадовільною. Щільність композицій унеможливила використання піпетки у флаконі з піпеткою, а також атомайзеру з шприцем – назальні гелі проблематично набиралися піпеткою та не проходили через атомайзер.

Для подальших досліджень проведено корекцію концентрацій мукоадгезивних компонентів у модельних складах, з метою зменшення в'язкості, та вивчено реологічні характеристики отриманих систем і ефективність дозування з дослідних упаковок (табл. 3.4, рис. 3.18-3.21).

Згідно отриманих даних (табл. 3.5, рис. 3.20), досліджувані упаковки по різному евакуують вміст гідрофільних мукоадгезивних компонентів.

Таблиця 3.4

**Модельні склади гідрофільних систем з мукоадгезивними полімерами**

Найменування	Гідрофільні системи (№ композиції)									
	16	26	36	46	56	66	76	86	96	106
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ГЕЦ	0,3	0,6	0,9	–	–	–	–	–	–	–
НаКМЦ	–	–	–	0,3	0,6	0,9	–	–	–	–
Хітозан	–	–	–	–	–	–	0,3	0,7	1,5	–
Лимонна кислота	–	–	–	–	–	–	0,9	2,1	4,5	–
Гіалорунат натрію	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0,3
Гліцерин	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Вода очищена	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100

*Продовж. табл. 3.4*

Найменування	Гідрофільні системи (№ композиції)				
	116	126	136	146	156
1	12	13	14	15	16
Гіалорунат натрію	0,7	1,5	–	–	–
Альгінат натрію	–	–	0,3	0,6	0,9
Гліцерин	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Вода очищена	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100



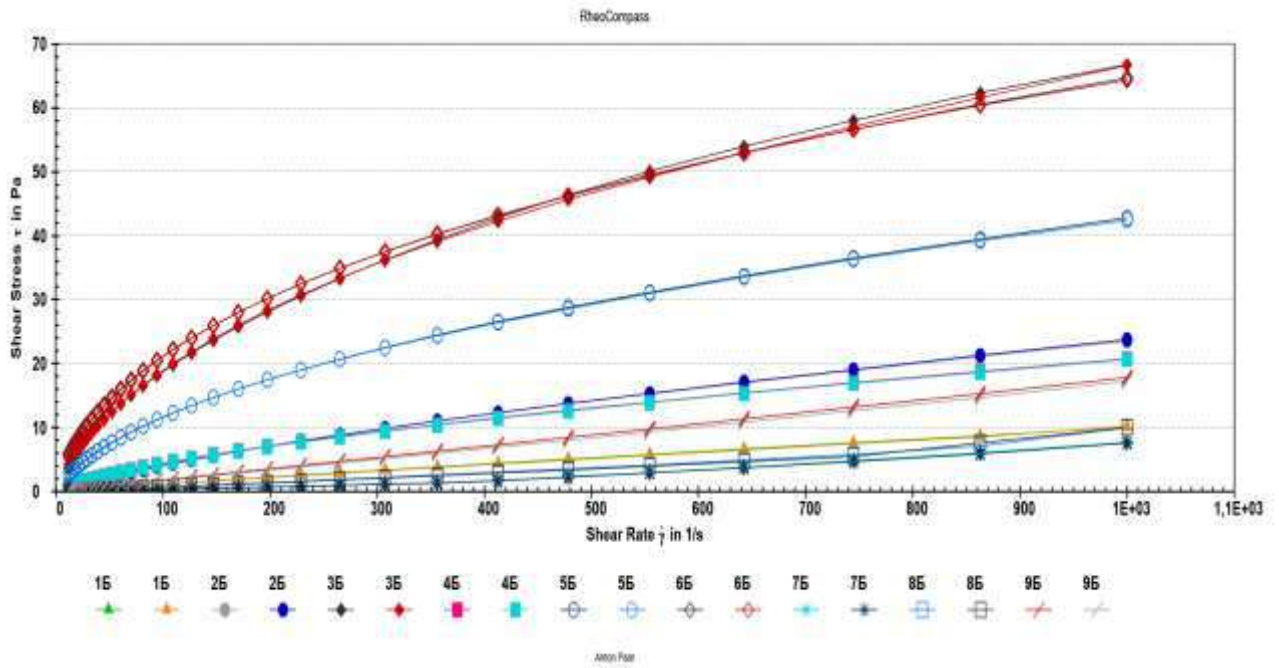


Рис. 3.18. Реограми плинугідрофільних систем з мукоадгезивними полімерами (16-96)

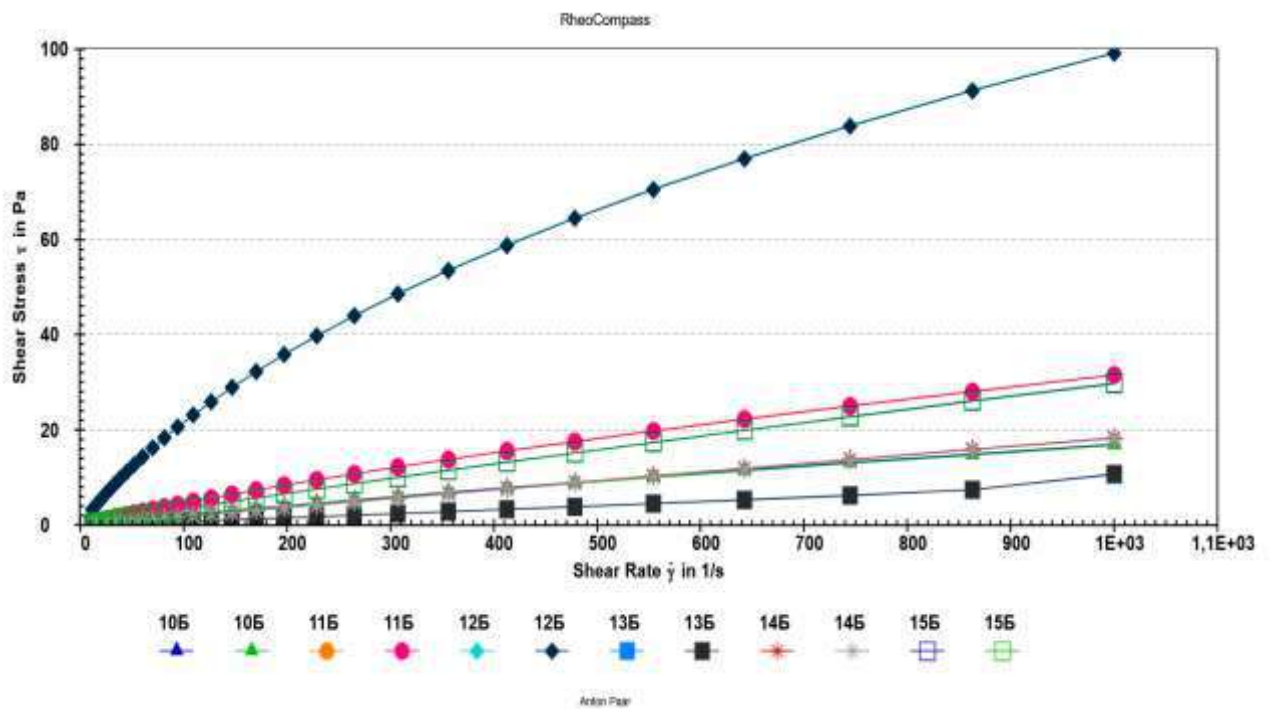


Рис. 3.19. Реограми плинугідрофільних систем з мукоадгезивними полімерами (106-156)



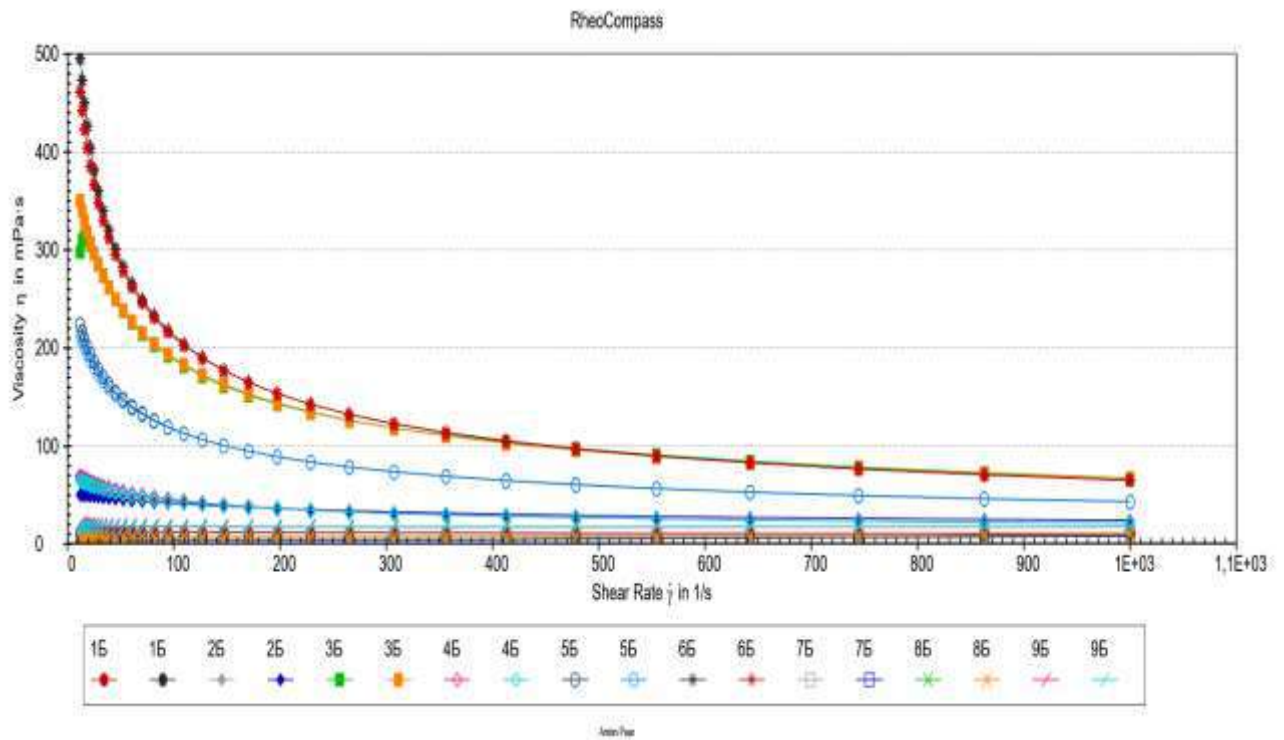


Рис. 3.20. В'язкість гідрофільних систем з мукоадгезивними полімерами (16-96)

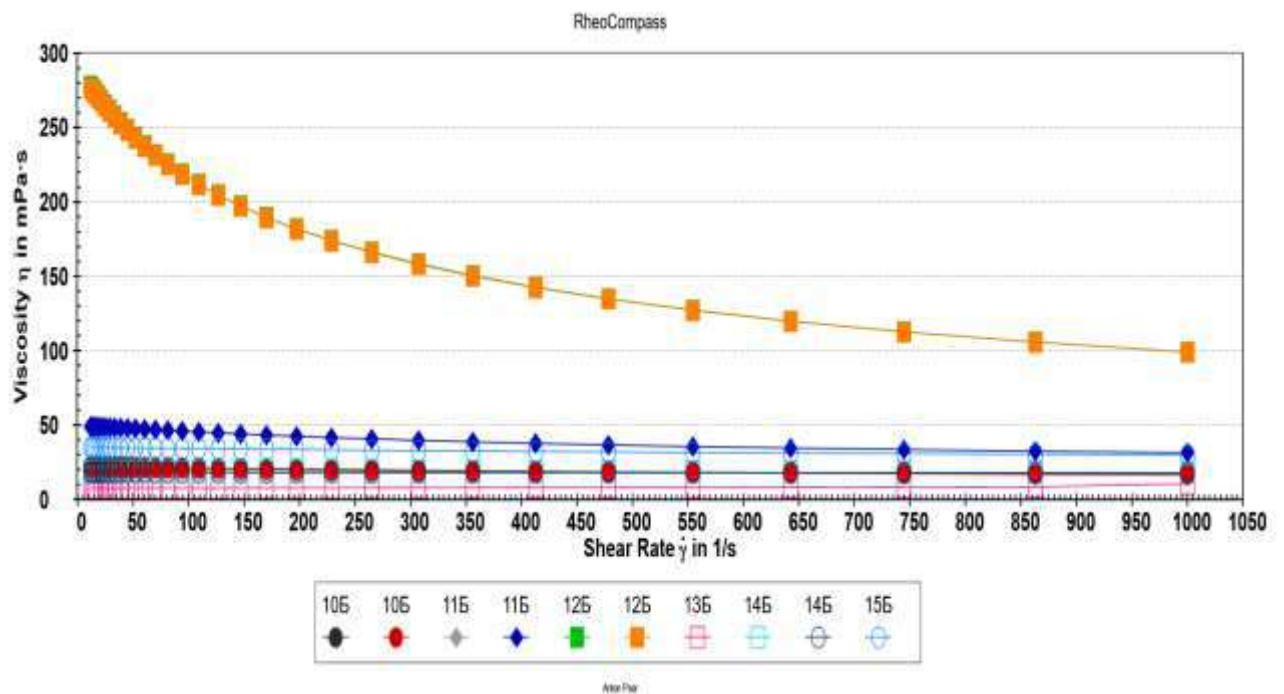


Рис. 3.21. В'язкість гідрофільних систем з мукоадгезивними полімерами (106-156)

Таблиця 3.5

**Евакуаційні характеристики упаковки  
для назальних засобів системного застосування**

Номер гідрофільної композиції (n=10)	Вид упаковки / маса зразку, г ( $\bar{x} \pm \Delta x$ )			
	БАУ	туба	флаконт з піпеткою	шприц з атомайзером
16	0,1995± 0,0005	9,69± 0,0147	0,0091± 0,0011	1,9086± 0,0167
26	0,1998± 0,0001	9,677± 0,0165	0,0076± 0,0004	1,5570± 0,0355
36	0,199± 0,0008	8,7209± 0,0142	0,0067± 0,0010	1,2610± 0,0385
46	0,1991± 0,0009	9,6344± 0,0246	0,0072± 0,0005	1,5861± 0,0083
56	0,1979± 0,0010	9,109± 0,0439	0,0070± 0,0006	1,3760± 0,0219
66	0,1988± 0,0009	8,1133± 0,0465	0,0060± 0,0018	0,9755± 0,0201
76	0,19792± 0,0009	9,9507± 0,0227	0,0097± 0,0006	1,8874± 0,0181
86	0,1974± 0,0009	9,8306± 0,0518	0,0095± 0,0004	1,7822± 0,0135
96	0,1986± 0,0010	9,7047± 0,0392	0,0095± 0,0003	1,6921± 0,0059
106	0,1984± 0,0008	9,4916± 0,0183	0,0080± 0,0002	1,6859± 0,0107
116	0,1994± 0,0009	9,5505± 0,0885	0,0070± 0,0003	1,5939± 0,0048
126	0,1991± 0,0007	8,6669± 0,2028	0,0047± 0,0004	1,1836± 0,0176
136	0,1987± 0,0025	9,8386± 0,0433	0,0091± 0,0005	1,8892± 0,0254
146	0,1948± 0,0041	9,7064± 0,0230	0,0093± 0,0001	1,6899± 0,0075
156	0,1958± 0,0033	9,6802± 0,0197	0,0079± 0,0003	1,5764± 0,0141

Примітка. Відповідно до нормативної документації на обрані упаковки: для БАУ одне натискання на клапан повинно забезпечувати 0,2 мл (0,2 г) розчину; об'єм туби 10 мл (маса наповнення 10 г); шприц – 2 мл (2 г)

БАУ за рахунок тиску, який створює вбудований насос, ефективно вивільняла мукоадгезивні основи з початковою в'язкістю від 3,5 mPa·s (композиція 7б) до 495,11 mPa·s (композиція 6б). Проте, при повторному застосуванні БАУ (впродовж декількох днів), відбувалося закупорювання отвору розпилювача упаковки мукоадгезивними полімерами, що в свою чергу призводило до ускладненого дозування основи. Ймовірно, модифікація конструкції розпилювача БАУ позитивно впливатиме на дозування мукоадгезивних основ з різною в'язкістю.

Однорідність маси дозування тубою також залежало від в'язкісних характеристик досліджуваних основ (табл. 3.5, рис. 3.20-3.21). Найкраще дозування маси спостерігалось у основ з відносно низькою початковою в'язкістю від 3,5 mPa·s до 68,55 mPa·s (1б, 2б, 4б, 7б, 8б, 9б, 10б, 11б, 13б, 14б, 15б). Підвищення в'язкості основ призводило до гіршої однорідності дозування маси: у композиції 5б розбіжність дозованої маси більше 8%, у композиції 3б розбіжність дозованої маси більше 12%, у композиції 6б розбіжність дозованої маси більше 18%. Крім того, використання туби, в якості упаковки для транспортування мукоадгезивних основ, мало свої особливості: одноразове використання; застосування додаткового пристрою для доставки основи в назальну порожнину (насадки), який буде нагвинчуватись на різьбу туби; обмежений об'єм туби, який потрібно евакуювати за один прийом.

Використання упаковки у вигляді піпетки з флаконом показало найбільші розбіжності в однорідності дозуванні маси основ (табл. 3.5, рис. 3.20-3.21). Ймовірно це пов'язано з особливостями конструкції піпетки та різною щільністю основ. Так при низьких значеннях початкової в'язкості, у систем 7б, 8б, 9б, 13б, 14б розбіжність однорідності дозування маси становила не більше 10%. Підвищення в'язкості досліджуваних основ (1б, 2б, 3б, 4б, 5б, 6б, 10б,

11б, 12б, 15б) призводило також до збільшення розбіжності дозування (від 11% до 51%). Багаторазове використання піпетки також викликало закупорювання отвору мукоадгезивними полімерами при висиханні.

Однорідність дозування маси зразків атомайзером з шприцем також залежало від консистентних властивостей досліджуваних основ (табл. 3.5, рис. 3.20-3.21). Так, у зразків (1б, 7б, 9б) розбіжність дозування маси не перевищувало 5,6%. Підвищення в'язкісних характеристик (системи 2б, 3б, 4б, 5б, 6б, 8б, 10б, 11б, 12б, 13б, 14б, 15б) суттєво впливало на однорідність дозування маси і становило від 10% до 51%.

### 3.6 Розробка упаковки для транспортування рідких назальних мукоадгезивних гелів

Враховуючи попередні дослідження, на наступному етапі, з метою виготовлення раціональної упаковки для транспортування назальних гелів, з мукоадгезивними полімерами, здійснено розробку конструкторської документації для проектування одноразової назальної насадки, за допомогою програмного засобу автоматизованого проектування AutoCAD. Даний засіб дозволив, в повному обсязі, забезпечити випуск конструкторської документації з урахуванням вимог [321-325] (рис. 3.22-3.23).

Конструкторська документація назальної насадки містить креслення складових частин виробу, її складальний кресленик, який представлений у вигляді зображення складальної одиниці, а також інших даних необхідних для виготовлення та контролю.



Розробка комплексу конструкторської документації обумовлена необхідністю геометрично точного зображення виду деталей і складальної одиниці, а також внесення необхідної інформації для виготовлення виробу, щодо розмірів окремих деталей, допусків для них, вимоги до матеріалів, а також технічні вимоги щодо можливості контролю виготовленого засобу. На підставі вимог комплексу конструкторської документації, підприємство-виробник зможе опрацювати технологію виробництва виробу, який включатиме комплект обладнання, оснащення, ливарних форм, методів контролю тощо, що в результаті призведе до налагодження серійного випуску продукції.

Дана насадка призначена для застосування в комплекті з шприцами типу Луер. До складу насадки входить – перехідний пристрій, подовжувальна трубка, розпилювальна форсунка, насадок запобіжний.

Спільне використання назальної насадки з шприцем типу Луер забезпечено за рахунок оснащення перехідника назальної насадки з стандартним конусом 6:100 для під'єднання одноразового шприца, а також упорами для пальців. Забезпечення щільного контакту насадки з носовою падухою, а також попередження травмування порожнини носа (ніздрів) та витікання назального гелю з носової порожнини обумовлено за рахунок запобіжної конусної насадки.

Для отримання лабораторного зразка назальної насадки, за даними розробленої конструкторської документації, виконали тривимірне моделювання деталей та їх збирання в системі автоматизованого проектування Unigraphics (NX CAD) з метою подальшого друку їх на тривимірному принтері. Система NX CAD також дозволила проаналізувати візуальні характеристики розробленого засобу (рис. 3.24).

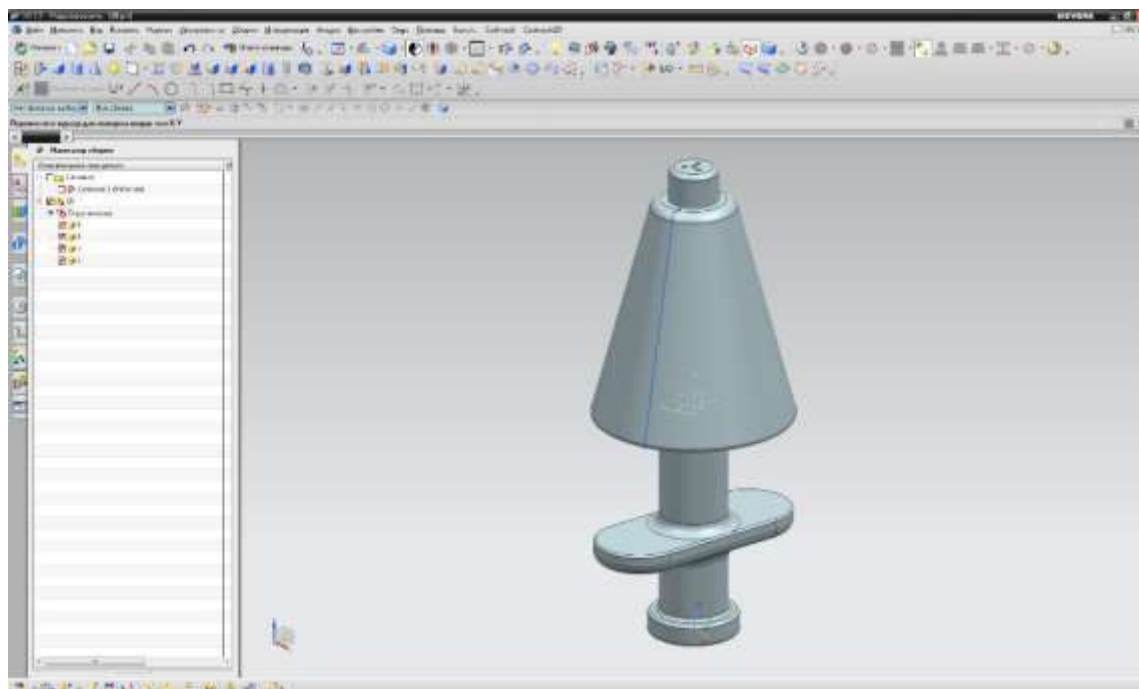


Рис. 3.24. Тривимірна модель розробленої назальної насадки

На наступному етапі, відповідно до розроблених тривимірних моделей перехідника, подовжувальної трубки та форсунки розпилювальної, виготовили дослідні зразки деталей з пластику шляхом високоточного друку на пристрої тривимірного друку з точністю друку 0,050 мм. Силіконовий конусний ущільнювач отримали шляхом лиття силікону в форму, яку також попередньо виготовили на принтері тривимірного друку.

Отримання лабораторного зразку назальної насадки для транспортування мукоадгезивних гелів (рис. 3.25) дозволило підтвердити можливість збирання деталей назальної насадки, зовнішню герметичність пристрою, герметичність конусного з'єднання при введенні дослідних назальних гелів з одноразових шприців типу Луер, безпеку її застосування, а саме відсутність можливості травмування носової порожнини при введенні назального засобу.

З отриманою насадкою проводили дослідження щодо можливості вивільнення назальних мукоадгезивних гелів через конструкцію пристрою.

Результати експериментального дослідження характеризують задовільні евакуаційні характеристики розробленої одноразової назальної насадки (табл. 3.6).



Рис. 3.25. Лабораторний зразок назальної насадки для транспортування мукоадгезивних гелів

Таблиця 3.6

**Евакуаційні характеристики упаковки для назальних засобів системного застосування**

Номер гідрофільної композиції, (n=10)	Вид упаковки / маса зразку, г ( $\bar{x} \pm \Delta x$ )
	Одноразовий шприц типу Луер (2 мл) з розробленою назальною насадкою
16	1,9715±0,0192
26	1,9574±0,0198
36	1,9370±0,0265
46	1,9685±0,0193
56	1,9448±0,0280
66	1,9187±0,0417
76	1,9785±0,0203
86	1,9695±0,0197
96	1,9638±0,0186
106	1,9607±0,0221
116	1,9554±0,0235
126	1,9390±0,0275
136	1,9715±0,0192
146	1,9600±0,0222
156	1,9576±0,0185



Встановлено, що використання отриманої насадки з шприцем типу Луер, для доставки рідких мукоадгезивних гелей, з в'язкістю від 495,11 mPa·s до 3,5 mPa·s забезпечувало однорідне дозування маси назального гелю. Розбіжність дозованої маси у більшості зразків не перевищувало 3,5% (у зразку 66 не більше 4,1%).

За матеріалами розділу опубліковано праці [326-328].

## ВИСНОВКИ

1. В результаті проведених досліджень був розроблений програмний засіб у вигляді експертної системи «ExpSys Nasalia» (nasalia.zsmu.zp.ua) для *in silico* прогнозу раціонального складу назальних лікарських засобів церебропротективної дії. Прогнозування *in silico* дозволить дослідникам на етапі фармацевтичної розробки нових інтраназальних лікарських форм більш ефективно здійснювати підбір допоміжних інгредієнтів, з урахуванням ресурсозбереження активнодіючих інгредієнтів та допоміжних речовин.

2. Розроблені моделі машинного навчання бінарної класифікації для *in silico* прогнозу проникності активних фармацевтичних інгредієнтів через гематоенцефалічний бар'єр.

3. Опрацьовані моделі машинного навчання для *in silico* прогнозу раціонального складу назальних лікарських форм церебропротективної дії. Підтвердження якості прогнозу фармацевтичних несумісностей з використанням опрацьованих моделей перевірена на датасеті для перевірки. Отримані статистичні показники моделей *tree\_blender* (AUC 0.9521, F1 0.9747, MCC 0.9094), *boost\_blender* (AUC 0.9593, F1 0.9821, MCC 0.9352) свідчать про високу ймовірність прогнозу.

4. За результатами проведених досліджень розроблена конструкторська документація на назальну насадку одноразову за допомогою засобу автоматизованого проектування, яка містить креслення складових частин

виробу, а також інших даних необхідних для його виготовлення та контролю. Для отримання лабораторного зразка назальної насадки, за даними розробленої конструкторської документації, виконано тривимірне моделювання деталей та їх збирання в системі автоматизованого проектування.

5. В результаті отримано лабораторний зразок спроектованої назальної насадки на принтері тривимірного друку, що дозволило підтвердити можливість збирання деталей назальної насадки, зовнішню герметичність пристрою, герметичність конусного з'єднання при введенні дослідних назальних гелів з одноразових шприців типу Луер, безпеку її застосування, а саме відсутність можливості травмування носової порожнини при введенні назального засобу.

6. Результати дослідження дозволили розробити нормативно-технічну документацію у вигляді технічних умов для виготовлення насадки назальної в умовах промислового виробництва.

## РОЗДІЛ 4

МАРКЕТИНГОВІ ДОСЛІДЖЕННЯ З ВИЗНАЧЕННЯ ПЕРСПЕКТИВНОСТІ  
ВПРОВАДЖЕННЯ НАЗАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ СИСТЕМНОЇ ДІЇ4.1 Маркетингові дослідження вітчизняного ринку інтраназальних  
лікарських засобів

Сучасний розвиток біофармацевтичних досліджень в світовій науці і практиці сприяє використанню нових лікарських форм або шляхів введення діючих речовин в організм людини. Останнім часом увагу дослідників привертає застосування неінвазивних шляхів введення лікарських засобів, які можуть бути використані як для нових лікарських субстанцій так і для існуючих. Інтраназальні лікарські форми відомі досить давно, переважна більшість з них широко застосовується для місцевої терапії різноманітних захворювань носової порожнини. Останніми десятиліттями вчені отримали позитивні результати, щодо використання інтраназального шляху для системного застосування. Біодоступність системних інтраназальних препаратів різної фармакологічної дії виявилася вищою в порівнянні з пероральним застосуванням, часто-густо є такою, як і при парентеральному введенні. Назальні лікарські засоби для системного застосування легко застосовувати, вони не викликають подразнення шлунково-кишкового тракту людини [329-332].

Враховуючи перспективність створення нових назальних лікарських форм системної дії і особливо назальних форм ноотропного, церебропротективного напрямку доцільно провести маркетингові дослідження вітчизняного ринку цього сегменту.

При аналізі асортименту назальних засобів та групи АТС – N06ВХ використовували такі інформаційні джерела, як Державний реєстр лікарських засобів України та класифікаційну систему АТС (Anatomical Therapeutic Chemical), а також Компендіум [333, 334].

Об'єктом дослідження була інформація про зареєстровані в Україні лікарські засоби, згідно з кодом АТС N06ВХ – інші психостимулюючі та ноотропні засоби. Також аналізували дані прайс-листів щотижневика «Аптека» та оптових операторів фармацевтичного ринку «Оптима-Фарм», «БАДМ» та ін. Під час аналізу, у роботі використано методи наукового аналізу: логічний, інформаційно-аналітичний, прийоми групування, порівняння, контент-аналіз. Коефіцієнт напруженості [335] розраховували за формулою:

$$K_{vi} = \frac{(n - 1)}{n},$$

де  $n$  – число всіх конкурентних аналогів фірм.

Також використовували логічний, графічний та статистичний методи дослідження.

Згідно Державного реєстру лікарських засобів станом на 01.01.2016 р. на вітчизняному ринку було зареєстровано 226 інтраназальних лікарських препаратів. Серед них інтраназальних лікарських засобів для місцевого застосування – 94,7% і тільки 5,3% складають препарати для системного застосування (рис. 4.1).



Рис. 4.1. Ринок інтраназальних лікарських препаратів

Аналіз країн виробників інтраназальних лікарських засобів для місцевого застосування, які присутні на ринку України, показав, що переважна їх більшість імпортного походження – 132 найменування, що становить 61,68% від загальної кількості. Серед них найбільшу частку займає Німеччина – 12,62%, Франція – 7,48%, Італія – 6,07%, Швейцарія 4,67%, Словенія 4,21% та інші – менш ніж 4%. Частка вітчизняних виробників – 82 найменування, що становить 38,32%.

Аналіз по лікарським формам показав, що більшість інтраназальних лікарських форм для місцевого застосування представлена у вигляді аерозолів без пропеленту – 126 найменувань (58,8%), інтраназальних крапель – 72 найменування (33,64%), гелів та мазей – 10 найменувань (4,64%), та інших лікарських формах таких, як аерозолі з пропелентом, назальні олівці. Частка таких лікарських форм становила менш ніж 1%.

В якості діючих речовин широко застосовуються: оксиметазолін – 56 найменувань (26,17%), ксилометазолін – 47 найменувань (21,96%), сольові розчини на основі натрію хлориду або морської води – 32 найменування (14,95%), фенілефрин – 15 найменувань (7,01%), нафазолін – 13 найменувань (6,07%), мометазон – 11 найменувань (5,14%), різноманітні комбінації – 8 найменувань (3,74%), інші – 18 найменувань (14,95%) від загальної кількості.

Був розрахований коефіцієнт напруженості серед інтраназальних лікарських форм для місцевого застосування та проаналізований рівень конкуренції серед їх виробників (рис. 4.2). Як видно з наведеного рисунка, найбільший рівень конкуренції спостерігається по таким діючим речовинам, як оксиметазолін, ксилометазолін, сольові розчини, фенілефрин, нафазолін, та їх комбінацій. Дещо менший рівень конкуренції виявлено в лікарських формах мометазону, флутиказону, беклометазону, та кислоти кромогліцієвої. Нині відсутня конкуренція у таких діючих речовинах, як туаміногептан, будезонід, трамазолін, фраміцетин, кеторолак, мупіроцин, азеластин, лоратадин.

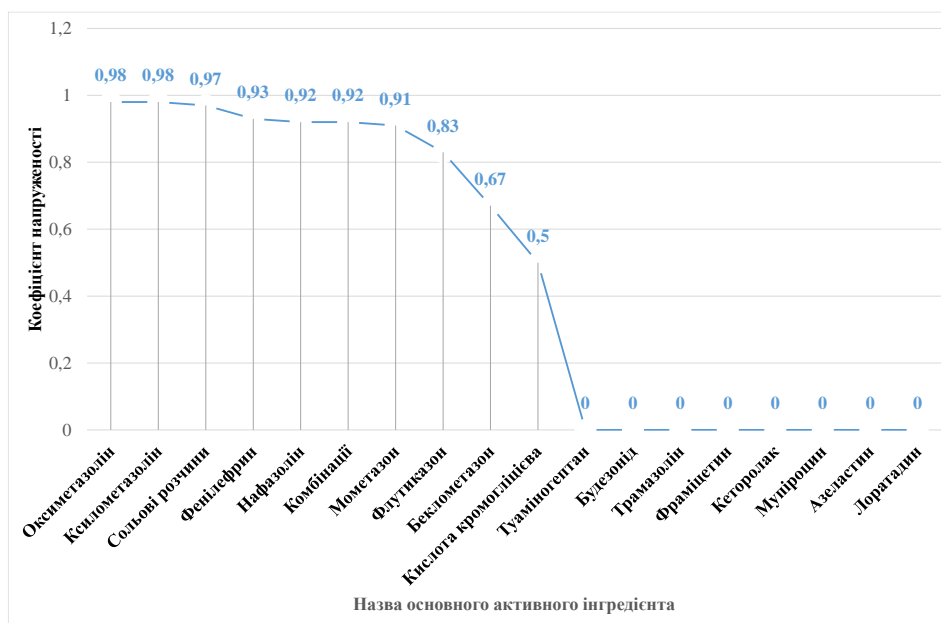


Рис. 4.2. Рівень конкуренції виробників інтраназальних лікарських засобів для місцевого застосування

В подальшому проводили аналіз інтраназальних лікарських форм для системного застосування. Такі лікарські засоби представлені 12 найменуваннями, які виготовляються вітчизняними, а також закордонними виробниками країн: Італії, Росії, Швейцарії, Німеччини. Серед інтраназальних лікарських засобів для системного застосування присутні наступні форми випуску: дозовані рідини – 6 найменувань (50%), краплі – 5 найменувань (41,67%), сухі суспензії – 1 найменування (8,33%).

В інтраназальних лікарських формах для системного застосування, які присутні на вітчизняному ринку, в якості діючих речовин застосовуються такі сполуки: дезмопресин – 6 лікарських форм (50%), інтерферон альфа-2b – 3 лікарських форми (25%), кальцитонін (лосося синтетичний) – 2 лікарські форми (16,67%), синтетичний аналог тафтсина - 1 лікарська форма (8,33%).

Розрахований коефіцієнт напруженості серед інтраназальних лікарських форм для системного застосування (табл. 4.1) показує, що рівень конкуренції в порівнянні з інтраназальними лікарськими формами для місцевого застосування відносно невисокий.

Таблиця 4.1

**Рівень конкуренції виробників інтраназальних лікарських засобів для системного застосування**

Назва активного інгредієнта	Коефіцієнт напруженості
Дезмопресин	0,83
Інтерферон альфа - 2b	0,67
Кальцитонін (лосося синтетичний)	0,5
Синтетичний аналог тафтсина	0

Найбільша конкуренція спостерігається у лікарських форм дезмопресину (коефіцієнт напруженості 0,83), низька конкуренція у інтерферону альфа-2b та кальцитоніну (лосося синтетичного) (коефіцієнт напруженості 0,67 та 0,5), відсутня конкуренція у синтетичного аналогу тафтсина (коефіцієнт напруженості 0).

#### 4.2 Дослідження вітчизняного фармацевтичного ринку психостимулюючих та ноотропних засобів групи N06BX

Згідно з даними Державного експертного центру Міністерства охорони здоров'я України, на фармацевтичному ринку України, відповідно до класифікації АТС, станом на грудень 2019 року зареєстровано 14 міжнародних непатентованих назв (МНН) лікарських засобів або 214 торговельних назв лікарських засобів з урахуванням форм випуску з групи препаратів групи N06BX.

Асортимент цих препаратів, за походженням, представлений номенклатурою засобів, як синтетичної так і рослинної природи (рис. 4.3).

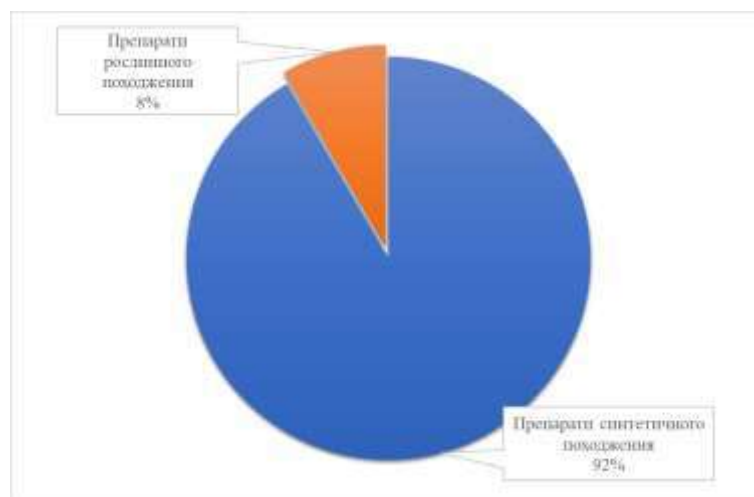


Рис. 4.3. Розподіл асортименту групи N06BX за походженням діючих речовин

Як видно з рис. 4.3, препарати синтетичного походження переважають і займають 92 %, частка рослинних засобів складає 8 %.

Синтетичні препарати, групи N06BX, представлені різними біологічно активними речовинами, які включають композиції цитиколіну, вінпоцетину, пірацетаму, фенібуту та ін.

Аналіз пропозицій, за формами випуску, станом на грудень 2019 року, висвітлено в табл. 4.2.

Як видно з даних табл. 4.2, для групи цитиколіну характерні такі лікарські форми, як: розчини для ін'єкцій – 55%, таблетки – 20%, краплі для орального застосування – 1%; для групи вінпоцетину – таблетки 23,5%, для групи пірацетаму – таблетки 21,3%, розчини для ін'єкцій 22,5%; для групи фенібуту – таблетки 10,6%; мебікару – таблетки 7,1%; для рослинних препаратів, які представлені лише препаратами Гінкго Білоба, основну питому вагу займають таблетки – 52,6%.



Таблиця 4.2

## Асортимент найменувань лікарських засобів групи N06BX – інші психостимулюючі та ноотропні засоби

Назва	Кількість найменувань	Форма випуску																			
		для ін.		гранули		для орал. заст.		таблетки		капсули		порошки		табл. сублінгв.		краплі оральні		екстракт сухий		всього	
		кількість	%	кількість	%	кількість	%	кількість	%	кількість	%	кількість	%	кількість	%	кількість	%	кількість	%	кількість	%
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Цитиколін	20	44	55,0	2	100,0	12	70,6	17	20,0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	75	35,1
Аміналон	2	–	–	–	–	–	–	1	1,1	1	5,3	–	–	–	–	–	–	–	–	2	0,9
Вінпоцетин	9	7	8,75	–	–	–	–	20	23,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	27	12,6
Пірацетам	5	18	22,5	–	–	–	–	18	21,3	2	10,5	–	–	–	–	–	–	–	–	38	17,8
Фенібут	8	–	–	–	–	4	23,5	9	10,6	6	31,6	–	–	–	–	–	–	–	–	19	8,9
Гліцин	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5	100,0	–	–	–	–	–	–	9	4,2
Гопантенова кислота	4	–	–	–	–	–	–	4	4,7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4	1,9
Феніл-пірацетам	1	–	–	–	–	–	–	4	4,7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4	1,9
Іпадактрин	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Кортексін	2	2	2,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	0,9
Мєбікар	3	–	–	–	–	–	–	6	7,1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	6	2,8

Продовж. табл. 4.2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Прамира- цетам	1	–	–	–	–	–	–	1	1,1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	0,5
Ембр. тканина ВРХ	2	2	2,5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	0,9
Церебро- лізін	7	7	8,75	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7	3,3
Листя Гінкго Білоба	14	–	–	–	–	1	5,9	5	5,9	10	52,6	–	–	–	–	1	100,0	1	100,0	18	8,3
Всього	79	80	100,0	2	100,0	17	100,0	85	100,0	19	100,0	5	100,0	4	100,0	1	100,0	1	100,0	214	100,0

Аналіз зареєстрованих торговельних назв лікарських засобів за фірмами-виробниками показав, що основну частку асортименту формують препарати вітчизняного виробництва. Так, співвідношення торговельних назв лікарських засобів закордонного та вітчизняного виробництва становить від 39,68% до 52,91%, тобто спостерігається повне домінування вітчизняних лікарських засобів. Також, треба визначити, що частка наявних препаратів спільних підприємств України з іноземними складає 7,41% (рис. 4.4).

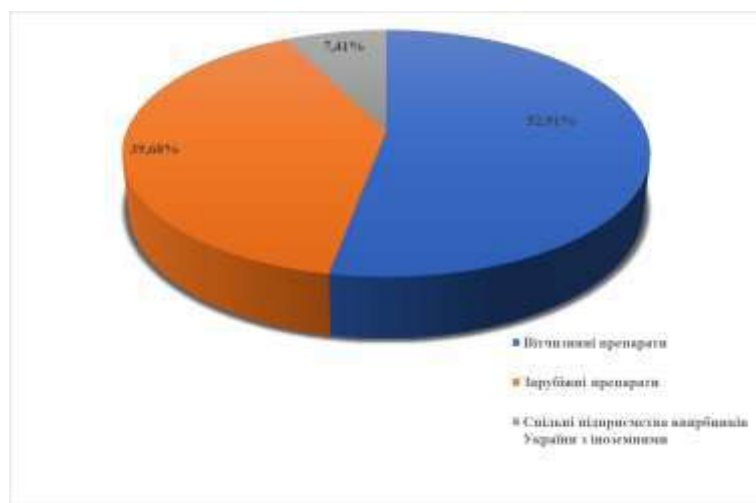


Рис. 4.4. Розподіл асортименту лікарських препаратів групи N06BX за країнами-виробниками

Проведене дослідження дозволило виявити, що в цілому, відповідно до переліку групи N06BX, нараховуються 29 країн виробників препаратів даної групи.

В Україні випуском лікарських засобів, що мають церебропротективні властивості, займаються 20 виробників, які випускають 95 найменувань. Лідерами є такі компанії: ПАТ «Фармак» – 13 лікарських засобів з урахуванням форм випуску (13,68%), ТОВ «Фармацевтична компанія Здоров'я» – 11 лікарських засобів (11,57%). ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця»» – препаратів (10,52%). Отже, ці виробники мають понад 35% пропозицій препаратів цієї групи, а розвиток вітчизняного виробництва є позитивним фактором для цього

сегменту ринку та вказує на широке застосування цієї категорії препаратів серед населення країни.

Серед 9 фірм закордонних виробників, які поставляють в Україну 58 найменувань препаратів, лідерами є: Латвія (ВАТ «Олайнфарм» – 12 пропозицій (20,69%), Польща (Біофарм ЛТД – 9 пропозицій (15,51%) та Угорщина (ВАТ «Фармацевтичний завод ЕГІС» – також 9 пропозицій (15,51%).

Треба відмітити, що на фармацевтичному ринку України – є 5 спільних підприємств з іноземними країнами: Італія / Україна – 1 пропозиція; Індія / Україна – 2 пропозиції; Україна / Німеччина – 1 пропозиція та Корея / Україна – 1 пропозиція, також присутній 1 препарат спільного підприємства Румунія / Великобританія (роноцид – розчин для ін'єкцій 1000 мг / 4 мл по 4 мл № 5 в ампулах).

Препарати синтетичного походження, групи N06ВХ, представлені на вітчизняному ринку в різних лікарських формах: розчинах для ін'єкцій та для орального застосування, таблетках, капсулах та інших формах випуску.

Найбільшою часткою характеризуються таблетки – 39,54% та розчини для ін'єкцій 37,21% (рис. 4.5).

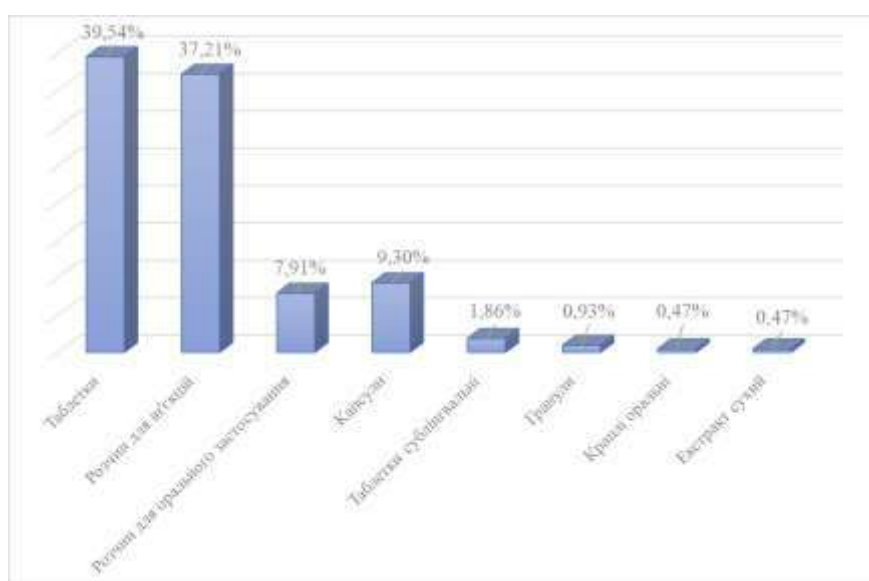


Рис. 4.5. Розподіл лікарських засобів групи N06ВХ за формою випуску

Препарати рослинного походження представлені 18 лікарськими формами, з яких: 1 пропозиція – розчин для орального застосування, 5 пропозицій – таблетки, 10 пропозицій – капсули, 1 пропозиція – краплі оральні, та 1 пропозиція – екстракт сухий. Їх випускають такі вітчизняні виробники, як ОДО «ІнтерХім» – 6 пропозицій та «ТОВ Астрафарм» – 2 пропозиції, тобто всього 8 пропозицій.

Асортимент препаратів закордонного виробництва представлений 10 пропозиціями: Словенія (ООО «КРКА Фарма») – 3 пропозиції, Німеччина («Салютас Фарма» та Др. Вільмар Швабе ГмбХ) – по 4 пропозиції, Франція (Бофур Інсен Індустрі) – 2 пропозиції та Польща (Білоба ЛТД) – 1 пропозиція.

Необхідно зазначити, що на вітчизняному ринку на даний час відсутні зареєстровані форми випуску активного фармацевтичного інгредієнту – N-феніл-ацетил-L-пролілгліцину, пептидної структури, який проявляє комплексну нейропротекторну дію, має низьку токсичність, та виражений терапевтичний ефект в менших дозах, в порівнянні з синтетичними препаратами.

#### 4.3 Дослідження цінових характеристик вітчизняного фармацевтичного ринку лікарських засобів групи N06BX

Було встановлено, що за даними Державного реєстру лікарських засобів України, станом на 01.01.2020 року, на території України зареєстровано 214 найменувань асортиментних позицій, переважна більшість яких знаходиться в групі – N06BX (інші психостимулятори та ноотропні засоби). Також присутні декілька найменувань в групах: N06DX (інші засоби, що застосовуються при деменції) та N07XX (засоби, що діють на нервову систему). В результаті виділили такі групи препаратів: цитиколіну, аміналону, вінпоцетину, пірацетаму, фенібуту, гліцину, гопантенової кислоти, феніпірацетаму, кортексіну, мебікару, церебролізіну, листя гінкго білоба. Основними формами

випуску цих груп є: розчини для ін'єкцій, гранули, розчини для орального застосування, таблетки, капсули, порошки, таблетки сублінгвальні, екстракт сухий.

На першому етапі дослідження нами було проаналізовано значення коефіцієнту ліквідності цін ( $C_{liq}$ ) на окремі лікарські засоби, які займають питому вагу в кожній групі, станом на 01.01.2020 року.

Коефіцієнт ліквідності ціни відображає ступінь конкуренції на ринку та в певній мірі характеризує доступність лікарських засобів. Чим меншими є значення коефіцієнту ліквідності (зазвичай від 0 до 0,5), тим сильнішим вважається рівень конкуренції, що склалась на ринку і, як наслідок, тим більш доступними є аналізовані лікарські препарати.

Розрахунок зазначеного показника проводили за наступною формулою [336, 337]:

$$C_{liq} = \frac{P_{max} - P_{min}}{P_{min}}$$

де  $C_{liq}$  – коефіцієнт ліквідності ціни;

$P_{max}$  – максимальна оптова ціна препарату, грн.;

$P_{min}$  – мінімальна оптова ціна препарату, грн.

Результати аналізу представлені в табл. 4.3.

*Таблиця 4.3*

**Оптові ціни та коефіцієнт ліквідності ціни ринку лікарських засобів  
групи N06BX (станом на 01.01.2020 р.)**

Торгова назва препарату	Форма випуску	$P_{max}$	$P_{min}$	$C_{liq}$
1	2	3	4	5
Цитиколін N06BX06				
Аксотилін	Р-н д/ін. 1000 мг/4 мл по 4 мл № 10 в амп.	413 <sup>90</sup>	389 <sup>05</sup>	0,06

Продовж. табл. 4.3

1	2	3	4	5
Сомазина	Р-н д/ін. 1000 мг/4 мл по 4 мл № 10 в амп.	690 <sup>00</sup>	586 <sup>50</sup>	0,18
Ліра	Табл. в/плів. обол. по 500 мг № 30	492 <sup>99</sup>	442 <sup>04</sup>	0,11
Кваніл	Табл. в/плів. обол. по 500 мг № 30	585 <sup>00</sup>	484 <sup>50</sup>	0,20
Кваніл	Р-н д/орал. заст. 100 мг/1мл по 30 мл у флак.	192 <sup>00</sup>	167 <sup>04</sup>	0,14
Ліра	Р-н д/орал. заст. 100 мг/1мл по 30 мл у флак.	176 <sup>00</sup>	158 <sup>95</sup>	0,11
Нейроксон	Р-н д/перор. заст. 100 мг/мл по 45 мл у флак.	337 <sup>00</sup>	286 <sup>30</sup>	0,17
Сомазина	Р-н д/перор. заст. 100 мг/мл по 30 мл у флак.	370 <sup>00</sup>	314 <sup>50</sup>	0,17
Цитиколін-Здоров'я	Р-н ор 100 мг/мл по 30 мл у флак.	224 <sup>28</sup>	150 <sup>95</sup>	0,49
Аміналон N06BX23				
Аміналон	Табл. в/о по 0,25 № 10	31 <sup>05</sup>	26 <sup>35</sup>	0,19
Аміналон-КВ	Капсули тв. по 250 мг № 10	33 <sup>00</sup>	28 <sup>05</sup>	0,18
Вінпоцетин N06BX18				
Вінпоцетин	Табл. по 0,005 № 50	38 <sup>30</sup>	31 <sup>11</sup>	0,23
Кавінтон	Табл. по 0,005 № 50	216 <sup>00</sup>	172 <sup>40</sup>	0,26
Пірацетам N06BX03				
Луцетам	Табл. в/плів. обол. по 800 мг № 30 у флак.	105 <sup>66</sup>	100 <sup>48</sup>	0,05
Пірацетам	Табл. по 400 мг № 60	22 <sup>50</sup>	20 <sup>40</sup>	0,10
Пірацетам-Здоров'я	Р-н д/ін. 200 мг/мл по 5 мл № 10 в амп.	32 <sup>00</sup>	29 <sup>45</sup>	0,10
Луцетам	Р-н д/ін. 200 мг/мл по 5 мл № 10 в амп.	123 <sup>50</sup>	118 <sup>00</sup>	0,04
Пірацетам	Капсули по 0,4г № 60	43 <sup>20</sup>	39 <sup>90</sup>	0,10
Фенібут N06BX22				
Нообут ІС	Табл. по 0,1 № 20	92 <sup>00</sup>	91 <sup>00</sup>	0,01
Ноофен	Табл. по 250 мг № 20	494 <sup>26</sup>	486 <sup>84</sup>	0,01
Фенібут	Табл. по 250 мг № 30	206 <sup>00</sup>	122 <sup>66</sup>	0,68
Біфрен	Капсули по 250 мг № 20	141 <sup>34</sup>	134 <sup>85</sup>	0,05

Продовж. табл. 4.3

1	2	3	4	5
Гліцин N07XX19				
Гліцин	Табл. сублінг. по 100 мг № 50	50 <sup>00</sup>	20 <sup>20</sup>	1,5
Гопантенова кислота N06BX23				
Гопантенова кислота	Табл. по 250 мг № 50	222 <sup>23</sup>	182 <sup>00</sup>	0,21
Когнум	Табл. по 250 мг № 50	238 <sup>00</sup>	185 <sup>58</sup>	0,29
Фенілпірацетам N06BX20				
Ентроп	Табл. по 100 мг № 20	648 <sup>70</sup>	548 <sup>13</sup>	0,18
Кортексін N06BX				
Кортексін	Ліофілізат для р-ну д/ін. по 5 мг № 10 у фл.	387 <sup>30</sup>	348 <sup>30</sup>	0,01
Мебікар N96BX21				
Мебікар ІС	Табл. по 0,3 № 20	140 <sup>90</sup>	126 <sup>90</sup>	0,11
Адаптол	Капс. 300 мг № 20	211 <sup>00</sup>	180 <sup>54</sup>	0,17
Прамірацетам N06bX16				
Прамістар	Табл. в плів. обол. по 600 мг № 20	293 <sup>57</sup>	275 <sup>40</sup>	0,06
Ембріональні тканини мозку великої рогатої худоби (цереброкурин) N06BX22				
Цереброкурин	Р-н д/ін. 2 мг/мл № 10 в амп.	2253 <sup>64</sup>	2241 <sup>54</sup>	0,05
Церебролізін N06BX26				
Церебролізін	Р-н д/ін. 215,2 мг/мл по 5 мл № 5 в амп	681 <sup>00</sup>	678 <sup>30</sup>	0,004
Листя Гінкго Білоба N06DX02				
Білобіл	Капсули 0,04 № 60	292 <sup>20</sup>	178 <sup>40</sup>	0,30
Білобіл форте	Капсули 80 мг № 60	420 <sup>00</sup>	337 <sup>00</sup>	0,24
Білобіл інтенс	Капсули 120 мг № 60	434 <sup>00</sup>	393 <sup>00</sup>	0,10
Білоба	Капсули 40 мг № 60	236 <sup>69</sup>	211 <sup>25</sup>	0,12
Гінкго Білоба	Капсули 40 мг № 30	57 <sup>60</sup>	43 <sup>05</sup>	0,33
Гінкго Білоба	Капсули 80 мг № 30	106 <sup>50</sup>	103 <sup>50</sup>	0,03
Гінкгоба	Капсули 120 мг № 20	340 <sup>20</sup>	289 <sup>17</sup>	0,17
Гінкгоба	Капсули 40 мг № 60	143 <sup>10</sup>	121 <sup>64</sup>	0,18
Гінкгоба	Капсули 80 мг № 60	278 <sup>00</sup>	236 <sup>30</sup>	0,17



Продовж. табл. 4.3

1	2	3	4	5
Мемоплант	Табл. по 40 мг № 20	193 <sup>00</sup>	185 <sup>00</sup>	0,04
Мемоплант форте	Табл. вкриті плів. обол. по 40 мг № 20	368 <sup>00</sup>	365 <sup>00</sup>	0,008
Меморін	Краплі оральні 40 мг по 40 мл у фл.	102 <sup>00</sup>	83 <sup>60</sup>	0,44
Танакан	Р-н оральн. 40 мл/мг по 30 мл	230 <sup>15</sup>	198 <sup>07</sup>	0,16
Танакан	Табл. по 40 мг № 90	511 <sup>00</sup>	497 <sup>16</sup>	0,03
Тебокаїн	Табл. по 120 мг № 20	398 <sup>00</sup>	354 <sup>00</sup>	0,12

Як видно, коефіцієнт ліквідності для більшості препаратів перебуває в інтервалі від 0,03 до 0,68. Найбільший показник у препараті Гліцин (1,5). Найменший показник у Церебролізіну (0,004) та Мемопланта форте (0,008), що є характерним для цих препаратів, які є менш доступними для населення. За розрахунками, згідно табл. 4.3, до малодоступних препаратів досліджуваної групи відноситься 42,55 %, які мають цінову характеристику до 200 гривень.

Враховуючи нестабільну ситуацію на ринку валют в Україні та ймовірність виникнення соціально-економічної кризи, актуальним є аналіз коефіцієнту адекватності платоспроможності ( $C_{as}$ ), який характеризує рівень доступності того чи іншого найменування лікарського засобу. Його доцільно знати для оцінювання впливу на величину попиту препаратів та купівельну спроможність хворого. Він характеризує, в динаміці, співвідношення між ціною препарату та платоспроможністю споживача.

Виходячи з цього було розраховано значення даного показника для препаратів, які мають найбільшу питому вагу в окремих групах (табл. 4.4).

Коефіцієнт адекватності платоспроможності ( $C_{as}$  – умовне позначення показника) – важливий показник, що використовується в аналізі цінових характеристик ЛП, представлених на фармацевтичному ринку на різних ланках товаропровідної мережі.

При дослідженні значень коефіцієнту адекватності платоспроможності визначено, що найменший показник спостерігається у пірацетаму ( $C_{as}=0,003$ ),

найбільший показник у цереброкурина ( $C_{as}=0,318$ ). Розрахунок здійснювали за формулою [336, 337]:

$$C_{a.s} = \frac{P}{W_{a.w.}},$$

де  $P$  – середньозважена роздрібна ціна лікарського препарату за певний період (2019 р.);

$W_{a.w.}$  – середня заробітна плата за певний період (за 2019 р. вона становила 9205 гривень).

На заключному етапі дослідження був розрахований соціально-економічний показник доступності  $C_D$ . Його розраховували за формулою [338]:

$$C_D = \text{abs}\left(\left(\frac{P}{W_{aw}}\right) - 1\right);$$

де  $P$  – середньозважена роздрібна ціна лікарського препарату за певний період (2019 рік);

$W_{aw}$  – середня заробітна плата за певний період (за 2019 рік вона становила 9205 гривень).

Модуль зазначеного коефіцієнта показує доступність препарату. Чим більше значення коефіцієнта, тим більш доступнішим для споживача є препарат на ринку. Результати аналізу представлені в табл. 4.4.

Як видно з даних табл. 4.4, низький показник  $C_{as}$  спостерігається у таких препаратах, як: таблетки аміналону, ( $C_{as}=0,004$ ), таблетки пірацетаму ( $C_{as}=0,003$ ), таблетки гліцину ( $C_{as}=0,007$ ) та ін., що засвідчує про забезпечення доступності препаратів та свідчить про потребу в них навіть за низької платоспроможності населення. В той же час, чим вище значення коефіцієнта, тим менш доступним для споживача є препарат.

Таблиця 4.4

**Значення середньозваженої роздрібної ціни, коефіцієнтів адекватності платоспроможності та доступності лікарських засобів групи N06BX**

Торгова назва препарату	Форма випуску	P	Ca.s	C <sub>D</sub>
1	2	3	4	5
<b>Цитиколін N06BX06</b>				
Аксотилін	Р-н д/ін. 1000 мг/4 мл по 4 мл № 10 в амп.	524,76	0,057	0,94
Сомазина	Р-н д/ін. 1000 мг/4 мл по 4 мл № 10 в амп.	816,83	0,088	0,91
Ліра	Табл. в/плів. обол. по 500 мг № 30	605,35	0,065	0,93
Кваніл	Табл. в/плів. обол. по 500 мг № 30	698,1	0,075	0,92
Кваніл	Р-н д/орал. заст. 100 мг/1мл по 30 мл у флак.	230,96	0,002	0,99
Ліра	Р-н д/орал. заст. 100 мг/1мл по 30 мл у флак.	217,1	0,023	0,97
Нейроксон	Р-н д/перор. заст. 100 мг/мл по 45 мл у флак.	415,13	0,045	0,95
Сомазина	Р-н д/перор. заст. 100 мг/мл по 30 мл у флак.	440,7	0,047	0,95
Цитиколін-Здоров'я	Р-н ор 100 мг/мл по 30 мл у флак.	196,24	0,021	0,97
<b>Аміналон N06BX23</b>				
Аміналон	Табл. в/о по 0,25 № 10	37,05	0,004	0,99
Аміналон-КВ	Капсули тв. по 250 мг № 10	39,65	0,004	0,99
<b>Вінпоцетин N06BX18</b>				
Вінпоцетин	Табл. по 0,005 № 50	45,5	0,004	0,99
Кавінтон	Табл. по 0,005 № 50	254,8	0,027	0,97
Кавінтон форте	Табл. по 0,001 № 90	782,16	0,084	0,91
<b>Пірацетам N06BX03</b>				
Луцетам	Табл. в/плів. обол. по 800 мг № 30 у флак.	133,25	0,014	0,98
Пірацетам	Табл. по 0,2 мг № 60	27,3	0,003	0,99

Продовж. табл. 4.4

1	2	3	4	5
Пірацетам-Здоров'я	Амп. 20% р-н для ін по 5 мл № 10 в амп.	39,86	0,004	0,99
Луцетам	Р-н д/ін. 200 мг/мл по 5 мл № 10 в амп.	182	0,019	0,98
Пірацетам	Капсули по 0,4 г № 60	53,73	0,005	0,99
Фенібут N06BX22				
Нообут ІС	Табл. по 0,1 № 20	79,3	0,009	0,99
Ноофен	Табл. по 250 мг № 20	637	0,069	0,93
Фенібут	Табл. по 250 мг № 30	209,95	0,022	0,97
Біфрен	Капсули по 250 мг № 20	178,75	0,019	0,98
Гліцин N07XX19				
Гліцин	Табл. сублінг. по 100 мг № 50	65	0,007	0,99
Гопантенова кислота N06BX23				
Гопантенова кислота	Табл. по 250 мг № 50	249,6	0,027	0,97
Когнум	Табл. по 250 мг № 50	276,46	0,03	0,96
Фенілпірацетам N06BX20				
Ентроп	Табл. по 100 мг № 20	774,8	0,084	0,91
Кортексін N06BX				
Кортексін	Ліофілізат для р-ну д/ін. по 5 мг № 10 у фл.	660	0,071	0,92
Мebікар N96BX21				
Мebікар ІС	Табл. по 0,3 № 20	172,25	0,018	0,98
Адаптол	Капс. по 300 мг № 20	251,23	0,027	0,97
Прамірацетам N06BX16				
Прамістар	Табл. в плів. обол. по 600 мг № 20	370,5	0,04	0,95
Ембріональні тканини мозку великої рогатої худоби (цереброкурин) N06BX22				
Цереброкурин	Р-н д/ін. 2 мг/мл № 10 в амп.	2929,60	0,318	0,68
Церебролізін N06BX26				
Церебролізін	Р-н д/ін. 215,2 мг/мл по 5 мл № 5 в амп	881,4	0,095	0,90

Продовж. табл. 4.4

1	2	3	4	5
Листя Гінкго Білоба N06DX02				
Білобіл	Капсули 0,04 № 60	301,6	0,032	0,96
Білобіл форте	Капсули 80 мг № 60	457,6	0,049	0,95
Білобіл інтенс	Капсули 120 мг № 60	566,8	0,061	0,93
Білоба	Капсули 40 мг № 60	286	0,031	0,96
Гінкго Білоба	Капсули 80 мг № 30	134,55	0,014	0,98
Гінкго Білоба	Капсули 40 мг № 30	64,68	0,007	0,99
Гінкгоба	Капсули 120 мг № 20	173,94	0,018	0,98
Гінкгоба	Капсули 40 мг № 60	68,77	0,007	0,99
Гінкгоба	Капсули 80 мг № 60	325	0,035	0,96
Мемоплант	Табл. по 40 мг № 20	248,3	0,026	0,97
Мемоплант форте	Табл. вкриті плів. обол. по 40 мг № 20	475,8	0,051	0,94
Меморін	Краплі оральні 40 мг по 40 мл у фл.	100,82	0,01	0,98
Танакан	Р-н оральн. 40 мл/мг по 30 мл	241,8	0,026	0,97
Танакан	Табл. по 40 мг № 90	655,2	0,071	0,92
Тебокаїн	Табл. по 120 мг № 20	484,25	0,052	0,94

Розраховані показники  $C_D$  свідчать: доступнішими для хворих є такі препарати: аміналон табл., пірацетам табл., гінкго білоба табл., у яких показник дорівнює 0,99, бо між коефіцієнтом адекватності платоспроможності та поняттям доступності за цінами є обернено пропорційний зв'язок.

Протягом 2019 р. у досліджуваному сегменті, спостерігалось зростання цін на препарати лікарських засобів групи N06BX представлених на ринку України. Це призвело до малодоступності більшості препаратів для населення, враховуючи низький темп підйому прожиткового мінімуму та зростанню заробітної плати.

За матеріалами розділу опубліковано праці [339-342].

## ВИСНОВКИ

1. Проведено маркетингове дослідження вітчизняного ринку інтраназальних лікарських засобів для місцевого і системного застосування. Встановлено, що станом на початок 2016 р., серед зареєстрованих інтраназальних препаратів переважна більшість – 94,7% препарати для місцевого застосування. Частка системних інтраназальних засобів становить тільки – 5,3%. Аналіз конкурентоспроможності показав, що найбільша конкуренція спостерігається у інтраназальних місцевих засобів, практично відсутня конкуренція у інтраназальних системних.

2. Проаналізовано ринок лікарських засобів групи N06BX, в Україні, та встановлено, що препарати вітчизняного виробництва займають 52,91%, зарубіжного – 39,68%, спільні підприємства виробників України з іноземними – 7,41%. В Україні, випуском лікарських засобів, яким властиві церебропротективні властивості, займаються 20 виробників, які випускають 95 найменувань. Лідерами є такі компанії: ПАТ «Фармак» – 13 лікарських засобів з урахуванням форм випуску (13,68%), ТОВ «Фармацевтична компанія Здоров'я» – 11 лікарських засобів (11,57%), ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця»» – препаратів (10,52%).

3. Виявлено, що асортимент лікарських засобів групи N06BX включає: цитиколін, вінпоцетин, пірацетам, фенібут, мебікар та рослинні препарати групи Гінкго Білоба, які представлені різними лікарськими формами: розчини для ін'єкцій, краплі для орального застосування, таблетки, капсули.

4. Аналіз лікарських препаратів з активніючими сполуками синтетичного походження, дозволив виявити, що вони представлені в різних формах: розчини для ін'єкцій, таблетки, розчини для перорального застосування. Найбільшою часткою характеризуються таблетки 39,54% та розчини для ін'єкцій – 37,21%.

5. Аналіз розрахованого нами значення коефіцієнта ліквідності показав, що досліджуваний сегмент ринку характеризується сильною конкуренцією. При дослідженні значень коефіцієнту адекватності платоспроможності визначено, що найменший показник спостерігається у пірацетаму ( $C_{as}=0,003$ ), найбільший показник у цереброкурина ( $C_{as}=0,318$ ).

6. Розраховані коефіцієнти доступності, по групам лікарських засобів N06BX, свідчать про низьку доступність препаратів, що водночас з низькою конкуренцією на ринку інтраназальних лікарських засобів для системного застосування окреслює перспективність створення нових вітчизняних назальних засобів для забезпечення населення ефективними та доступними ліками.

## РОЗДІЛ 5

### НАУКОВЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ НАЗАЛЬНИХ ЗАСОБІВ СИСТЕМНОЇ ДІЇ З ПОХІДНИМ ГЛІЦИНУ

#### 5.1 Експериментальне обґрунтування складу, технології інтраназальної форми у вигляді гелю з похідним гліцину

У сучасній фармації та медицині значна увага приділяється новим перспективним шляхам доставки ліків, таким як назальний. З урахуванням більшої проникності назальної слизової оболонки та значної площі поверхні можливим є швидке досягнення терапевтичного ефекту, крім того таке застосування ліків дозволяє зменшити тривалість всмоктування, прийом препаратів неінвазивний, зручний для пацієнта, не потребує особливих навичок. Це сприятиме підвищенню комплаєнтності лікування. Суттєвою перевагою назальної доставки є можливість цільової доставки активних речовин до центральної нервової системи через ольфакторні нейрони і далі по структурам головного мозку за допомогою механізмів, не пов'язаних з кровотоком, при цьому минаючи пресистемний метаболізм у печінці [343-345].

Враховуючи перспективність використання активної діючої сполуки пептидної природи, для терапії цереброваскулярних захворювань, доцільно проведення розробки нової інтраназальної форми церебропротективної дії на прикладі діючої речовини пептидної природи низької молекулярної маси. В якості АФІ обрано малотоксичну сполуку – N-фенілацетил-1-пролілгліцину етиловий естер (ноопепт), ноотропний ефект якого пов'язаний з утворенням циклопролілгліцину. Циклопролілгліцин, аналогічний за структурою до ендогенного циклічного дипептиду, проявляє антиамнестичну активність, а також має холінопозитивну дію. Крім того, ноопепт здатний позитивно впливати на механізми довготривалої пам'яті за рахунок гальмування окисної



модифікації білків пам'яті, а також їх «випрямлення», використовуючи HSP<sub>70</sub>-механізми [346, 347, 348].

За допомогою розробленої нової інформаційної технології проведено *in silico* прогнозування проникності обраного АФІ через ГЕБ. Встановлено, що більшість моделей машинного навчання: Random forest (score 0,5176), Lightgbm (score 0,545), Extra tree (0,5214), Blender rf lightgbm et (score 0,5234) показують негативний результат, тільки одна модель засвідчила позитивний результат - Gradient Boosting Classifier (score 0,6201). Враховуючи отримані дані, експертною системою запропоновано, до складу модельної рецептури, додати енхансер адсорбції (твін-80), який обрано з бази даних допоміжних речовин. Далі інформаційною системою запропоновано модельні рецептури з гідрофільними компонентами, з одночасною перевіркою можливості виникнення фармацевтичних несумісностей на розроблених моделях машинного навчання (blender tree: rf, et; blener boosting: catboost, lightgbm, xgboost) між діючою речовиною, та запропонованими інгредієнтами рецептури. Для посилення зволожувального ефекту спиртів, враховуючи можливе пересушування назальної порожнини, до кожної композиції додано 5% розчину Бішофіту Полтавського. В результаті обрано набір інгредієнтів (мукоадгезивні компоненти, зволожувачі, енхансер адсорбції) для подальших експериментальних досліджень назального засобу церебропротективної дії.

Враховуючи літературні дані практичного застосування ноопепту, обрано концентрацію в модельних формах – 1%.

5.1.1 Біофармацевтичні дослідження назального гелю з похідним гліцину. Експериментальні дослідження проведено за планом двохфакторного дисперсійного аналізу з повторними спостереженнями, методом рівноважного діалізу крізь напівпроникну мембрану – целофанову плівку Curophan, Type 150 pm,  $11 \pm 0,5$  мкм завтовшки у вертикальних чарунках дифузії Franz Cells (PermeGear, Inc., США). У кожній чарунці експерименту по 3 повтори. Фактори, що досліджувались: фактор А (вид полімеру) – А1 – хітозан 3%, А2 – натрію карбоксиметилцелюлоза 0,3%, А3 – натрію гіалуронат

0,7%, А4 – натрію альгінат 0,5%; фактор В (вид спирту): В1 – без спирту, В2 – сорбіт, В3 – гліцерин, В4 – D-пантенол. В якості діалізного середовища, з урахуванням розчинності ноопепту, використано 5% розчин гліцерину в воді очищеній. Концентрацію ноопепту, після 30 хв, визначено спектрофотометрично [213], температура проведеного дослідження  $37\pm 0,5$  °С, що обумовлено фізіологічними особливостями. Спирти та полімери розчиняли окремо у частині води, за виключенням хітозану, який розчиняли у розчині кислоти лимонної 10%. До отриманих розчинів допоміжних речовин додавали розчин активного компоненту та ретельно перемішували, доводили водою очищеної до відповідної маси. Усі зразки підлягали органолептичному контролю на відсутність ознак будь-яких взаємодій між компонентами (відсутність осаду, поява забарвлення та ін.). Матриця планування експерименту і визначені значення концентрації ноопепту у діалізаті (%) представлені в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

**Матриця планування експерименту і визначені значення  
концентрації ноопепту у діалізаті (%)**

Фактори	В1	В2	В3	В4	Загальна сума
А1	0,012	0,014	0,015	0,011	0,157
	0,012	0,014	0,015	0,012	
	0,011	0,014	0,015	0,012	
А2	0,013	0,014	0,016	0,013	0,167
	0,012	0,015	0,016	0,013	
	0,013	0,014	0,015	0,013	
А3	0,011	0,010	0,013	0,011	0,0135
	0,011	0,011	0,013	0,010	
	0,010	0,011	0,013	0,011	
А4	0,010	0,011	0,013	0,011	0,0137
	0,011	0,012	0,013	0,011	
	0,010	0,011	0,012	0,012	
Загальна сума	0,136	0,151	0,169	0,140	0,596

Результати дисперсійного аналізу наведено у табл. 5.2. Як видно з результатів проведеного дисперсійного аналізу  $F_{\text{експ.}} > F_{\text{табл.}}$  для обох факторів,

отже як полімери, так і спирти-зволожувачі чинять значимий вплив на вивільнення ноопепту з назальних лікарських форм.

Таблиця 5.2

**Дисперсійний аналіз результатів експериментальних даних з визначення вивільнення ноопепту**

Джерело мінливості	Сума квадратів (SS)	Число ступенів свободи (f)	Середній квадрат (MS)	F <sub>експ.</sub>	F <sub>табл.</sub>
Фактор А	0,000061	3	0,0000203	81,20	2,90
Фактор В	0,000055	3	0,0000183	73,50	2,90
АВ-взаємодія	0,000008	9	0,0000009	3,60	2,23
Помилка	0,000008	32	0,0000003	—	—
Загальна сума	0,007532	47	—	—	—

Після проведення перевірки розходження середніх значень результатів, за допомогою множинного рангового критерію Дункана, побудовано наступні ряди переваг: натрій карбоксиметилцелюлоза (хітозан) > альгінат натрію (гіалуронат натрію) за фактором А (вид полімеру); гліцерин > сорбіт > D-пантенол (без спирту) за фактором В (вид спирта-зволожувача).

Таким чином, проведене дослідження дозволило визначити назальні лікарські форми на основі натрій карбоксиметилцелюлози та хітозану, із додаванням гліцерину, як більш перспективні для забезпечення оптимального вивільнення ноопепту. Тому для подальших досліджень було відібрано наступні композиції:

- ✓ композиція 1 містить ноопепту 1,0; бішофіту 5,0; гліцерину 5,0; натрій карбоксиметилцелюлози 0,3; води очищеної до 100,0;
- ✓ композиція 2 містить ноопепту 1,0; гліцерину 5,0; бішофіту 5,0; хітозану 3,0; кислоти лимонної 10,0; води очищеної до 100,0.

Через 10 діб зберігання зразків у прохолодному місці композиція 2 виявилась не стабільною (виділення осаду). Тому для подальших досліджень обрано композицію 1.

Проведеними експериментальними дослідженнями визначено вид основи-носія і зволожувача. Для покращення проникності АФІ через біологічні мембрани використовують енхансери адсорбції. Це речовини, які збільшують проникність мембран для лікарських речовин, що вводяться разом з ними. Особливо це стосується великих гідрофільних макромолекул, таких як пептиди, протеїни, деякі антибіотики, інсулін та ін. З метою покращення проникності мембран для речовин пептидної природи у назальних лікарських формах застосовують наступні групи речовин: солі жовчних кислот натрію глікохолат, натрію деоксіхолат та ін.), жирні кислоти та їх похідні (натрію міридат, пальмітоїл карнітин та ін.), гліцериди (наприклад, фосфоліпіди), саліцилати, хелати (етилендіамінтетраацетат), полімери (хітозан, натрій карбоксиметилцелюлоза та похідні), поверхнево-активні речовини та деякі інші [349-351]. Серед інших енхансерів переважна більшість має недоліки, що пов'язані з можливим подразнюючим ефектом, недостатньою розчинністю у гідрофільних рідинах або доступністю допоміжних речовин. Тому інтерес представляє група поверхнево-активних речовин серед яких найбільш підходящим є твін-80, який добре розчиняється у воді та широко застосовується у складі лікарських форм [352-354].

Враховуючи попередні результати прогнозу *in silico* та наявні літературні дані, щодо перспективності додавання до складу рецептури енхансеру адсорбції твіну-80, для підтвердження гіпотези проведено експериментальні біофармацевтичні дослідження, за планом однофакторного дисперсійного аналізу. У кожній чарунці експерименту по 3 повтори. Досліджуваний фактор (вміст твіну-80): 1 – без твіну-80, 2 – 0,5%, 3 – 1%, 4 – 2%, 5 – 3%. Для всіх композицій визначено вивільнення АФІ через 30 хв (спектрофотометрично), температура проведення дослідження  $37 \pm 0,5$  °C [213].

Матриця планування експерименту і значення концентрації ноопепту у діалізаті (%) представлено у табл. 5.3.

Таблиця 5.3

**Матриця планування експерименту і значення концентрації  
ноопепту у діалізаті (%)**

Номер композиції	Вміст твіну-80 (%)	Номер дослідження			Сума	Середнє
		1	2	3		
1	0	0,013	0,013	0,013	0,039	0,013
2	0,5	0,016	0,017	0,016	0,049	0,016
3	1	0,017	0,018	0,018	0,053	0,018
4	2	0,018	0,018	0,019	0,055	0,018
5	3	0,018	0,018	0,020	0,056	0,019

Результати дисперсійного аналізу наведено у табл. 5.4.

Таблиця 5.4

**Результати дисперсійного аналізу впливу твіну-80 на вивільнення АФІ**

Джерело мінливості	Сума квадратів (SS)	Число ступенів свободи (f)	Середній квадрат (MS)	F <sub>експ.</sub>	F <sub>табл.</sub>
Вміст твіну-80	0,00006	4	0,000015	15	3,5
Помилка	0,00001	10	0,000001	—	—
Загальна сума	0,00423	14	—	—	—

Як видно з представлених результатів проведеного дисперсійного аналізу  $F_{\text{експерим.}} > F_{\text{табл.}}$ , отже концентрація твіну-80 чинить значимий вплив на вивільнення ноопепту з назальних лікарських форм.

Після проведення перевірки розходження середніх значень результатів за допомогою множинного рангового критерію Дункана було побудовано наступний ряд переваг за відсотком вмісту твіну-80: 1% (2%, 3%) > 0,5% > 0%.

Враховуючи одержані дані можливо стверджувати, що додавання твіну-80, до назальної лікарської форми з ноопептом, забезпечувало кращий рівень вивільнення діючої речовини. При цьому збільшення концентрації ПАР більше 1% не чинить значного впливу на вивільнення ноопепту. Тому для подальших досліджень було відібрано композицію, що містить 1% твіну-80.

5.1.2 Обґрунтування вибору консерванту для назального гелю з похідним гліцину. Згідно ДФУ I вид. інтраназальні лікарські форми повинні бути або стерильними або ж містити антимікробні компоненти, які забезпечуватимуть належний рівень мікробної контамінації лікарського засобу. Враховуючи, що в технологічному процесі виготовлення інтраназальної лікарської форми з ноопептом відсутня стадія стерилізації, проводили мікробіологічні дослідження в лабораторії мікробіологічних досліджень НМЛЦ ЗДМУ (завідувач лабораторії к. мед. н., доц. Поліщук Н. М.), під керівництвом доц. Количевої Н. Л., з метою обґрунтування вибору консерванту.

Спочатку здійснювали перевірку необхідності додавання до розробленої назальної форми з ноопептом консерванту. Готували зразки інтраназальної лікарської форми, та відповідно до методик ДФУ I вид. (2.6.12; 2.6.13), проводили дослідження на наявність в зразках аеробних мікроорганізмів, дріжджових та плісневих грибів, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Результати досліджень наведені в табл. 5.5.

Отриманий результат свідчить про необхідність додавання консерванту до дослідної назальної форми з ноопептом, тому що мікробіологічна чистота перевищує нормативні норми ДФУ I вид. для даного класу лікарського засобу. Вподальшому проводили вибір виду та кількості консерванту за допомогою розробленої нами експертної системи та у відповідності до літературних даних. Отримали матрицю планування вибору консерванту (табл. 5.6).

Потім вивчали отримані результати мікробіологічної чистоти модельних назальних гелів з різними консервантами (табл. 5.7).

Таблиця 5.5

**Результати визначення мікробіологічної чистоти інтраназального засобу  
з ноопептом без консерванту**

Найменування композиції	Вимоги ДФУ I вид.	Результат дослідження
Інтраназальна форма з ноопептом без консерванту	Загальне число аеробних мікроорганізмів не більше: (ТАМС) – $10^2$ КУО/г. Загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) – $10^1$ КУО/г. Відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г. Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г.	130

Таблиця 5.6

**Матриця вибору консерванту для назальної композиції з ноопептом**

Компоненти	Номер композиції		
	1	2	3
Ноопепт	1	1	1
Гліцерин	5	5	5
Бішофіт	5	5	5
Твін-80	1	1	1
Натрій КМЦ	0,3	0,3	0,3
Натрію бензоат	–	0,1	–
Бензалконію хлорид	0,02	–	–
Хлоргексидину біглюконат	–	–	0,005
Вода очищена	до 100,0	до 100,0	до 100,0

Таблиця 5.7

**Результати визначення мікробіологічної чистоти експериментальних назальних модельних систем з ноопептом з різними консервантами**

Найменування консерванту, концентрація %	Вимоги ДФУ I вид.	Результат дослідження
1	2	3
Бензалконію хлорид, 0,02 %	Загальне число аеробних мікроорганізмів не більше: (ТАМС) – $10^2$ КУО/г. Загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) – $10^1$ КУО/г. Відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г. Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г.	ТАМС – 1; ТУМС – 0; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> і <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г 0
Натрію бензоат, 0,1%	«те саме»	ТАМС – 2; ТУМС – 0; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> і <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г 0
Хлоргексидину біглюконат, 0,005 %	«-/-»	ТАМС – 1; ТУМС – 1; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> і <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г 0
Germall Plus, 0,1%	«-/-»	ТАМС – 16; ТУМС – 1; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> і <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г 0

Отримані результати дозволили обрати в якості консерванту – бензалконію хлорид, в концентрації 0,02 %, який забезпечував належний рівень мікробної контамінації даного лікарського засобу відповідно до вимог ДФУ 1 вид. категорії 2 (готові лікарські засоби для місцевого застосування).

5.1.3 Термогравіметричні дослідження назального гелю з похідним гліцину. Термогравіметричний аналіз, завдяки чутливим вимірам



зміни маси зразку при зміні температури, може широко застосовуватись при фармацевтичній розробці нових лікарських форм. Такий метод дозволяє отримувати детальну інформацію щодо термодинамічних даних дослідних зразків і проводити оцінку теплових ефектів, як окремих інгредієнтів так і готової лікарської форми з метою вивчення можливої хімічної взаємодії компонентів лікарського засобу в широкому діапазоні температур, а також обґрунтування температурного режиму в технології виготовлення композиції [355-357].

В якості об'єктів термогравіметричних досліджень використовували: окремі інгредієнти назального гелю: ноопепт, полісорбат-80, натрій КМЦ, гліцерин, бензалконію хлорид, Бішофіт Полтавський, а також виготовлений інтраназальний гель без ноопепту, та гель з ноопептом. Термографічний аналіз проводили на приладі дериватограф-«Shimadzu DTG-60» (Японія) з платиново-платинородієвою термопарою при нагріванні зразків в алюмінієвих тиглях (від 15 до 250 °С). В якості еталонної субстанції використовували  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ . Швидкість нагрівання складала 10°C за хв. Маса досліджуваних зразків була від 19,22 мг до 57,21 мг. Отримані данні дериватограф графічно фіксував у вигляді кривих T, DTA, TGA. Крива T на дериватограмі показує зміну температури, а крива TGA – зміну маси зразка в період дослідження. Крива DTA відображає диференціювання теплових ефектів, містить інформацію про ендотермічні та екзотермічні максимуми, може бути використана для якісної оцінки дериватограми.

На початковому етапі дослідження проводили термогравіметричний аналіз окремих компонентів назального гелю, а саме: ноопепту, Бішофіту Полтавського, полісорбату-80, натрій КМЦ, гліцерину, бензалконію хлориду, результати яких представлені на рис. 5.5-5.10.

Як видно з наведених даних (рис. 5.5), діюча речовина ноопепт – є відносно термічно-стійкою сполукою в діапазоні температур від 24 до 250 °С. Втрата маси зразку від початку дослідження до сьомої хвилини експерименту склала всього 0,02 мг (0,09 %), також на сьомій хвилині експерименту, при

температурі 94,36 °С, спостерігається деякий ендотермічний ефект, який може характеризувати температуру плавлення зразку. На тринадцятій хвилині експерименту втрата маси зразку при температурі 163,11 °С становила 0,04 мг (0,18 %), а на двадцять першій хв досліді маса зразку зменшилась на 0,83 мг (3,71 %).

Дериватограма розчину Бішофіту Полтавського (рис. 5.6) висвітлює постійну зміну маси зразку при нагріванні, що, ймовірно, пов'язано з випаровуванням водної фази. Так, вже на третій хвилині експерименту, при температурі 54 °С, зміна маси зразку склала 1,34 мг (3,29%), а на шостій хвилині при температурі 80,10 °С втрата маси становила 6,14 мг (15,09%). Далі маса зразку стрімко зменшувалась і наприкінці експерименту склала 30,05 мг (73,85%).

Дериватограма емульгатора полісорбату-80 (рис. 5.7) свідчить про наявні незначні теплові ефекти та повільну втрату маси зразку. Втрата маси полісорбату-80 від початку експерименту до кінця досліді становила 1,17 мг (3,79 %), що характеризує її як, відносно стабільну та невибагливу, з технологічної точки зору, речовину.

Дериватограма гелеутворювача натрій КМЦ (рис. 5.8) на шостій хвилині досліді, при температурі 76,65 °С, окреслює ендотермічний ефект, втрата маси зразку, при цьому, склала від початку експерименту – 1,16 мг (6,04%). Тому, в технології виготовлення лікарської форми, потрібно дотримуватись температурного режиму для попередження руйнування сполуки.

Дериватограма неводного розчинника – гліцерину (рис. 5.9) характеризує сполуку, як стабільну речовину в діапазоні температур від 22 до 135 °С, втрата маси дослідного зразку від початку експерименту склала 0,24 мг (0,5%).

Дериватограма консерванту бензалконію хлориду наведена на рис. 5.10.

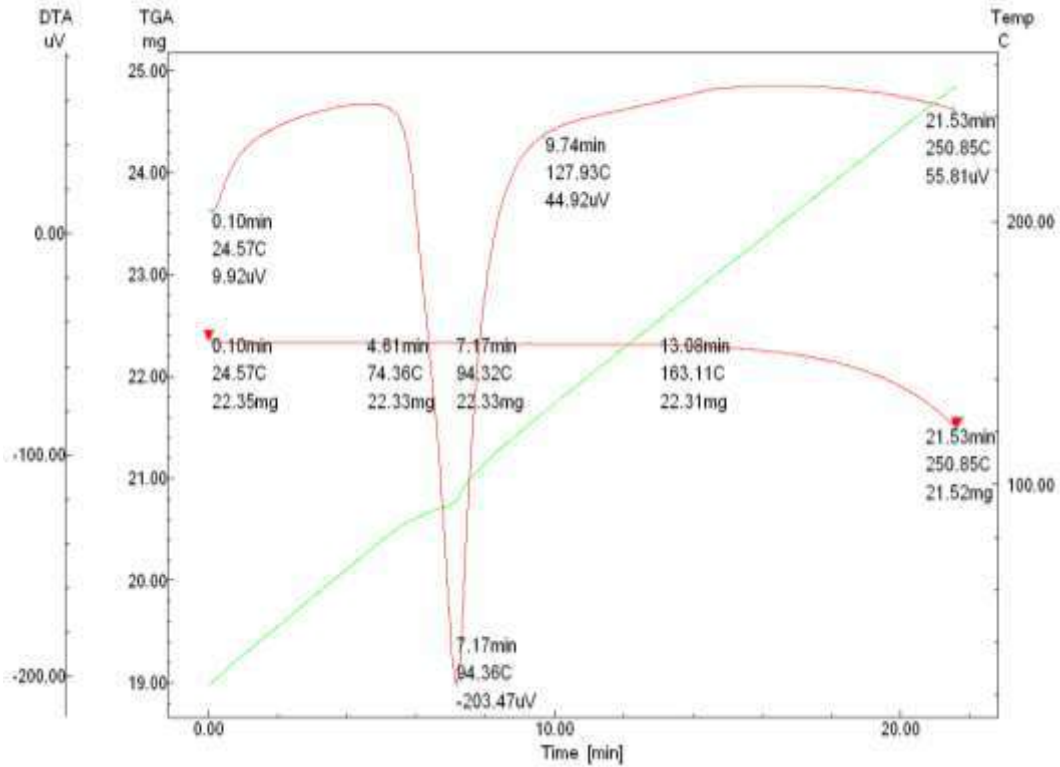


Рис. 5.5. Дериватограма субстанції ноопепту

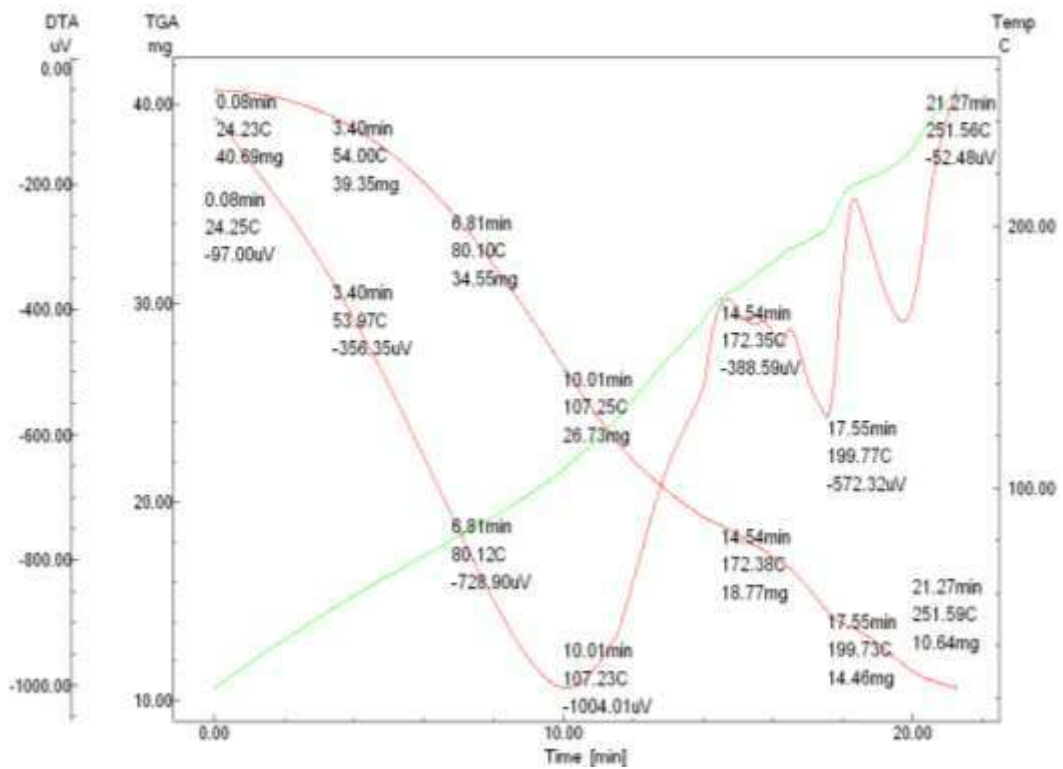


Рис. 5.6. Дериватограма розчину Бішофіту Полтавського стандартизованого

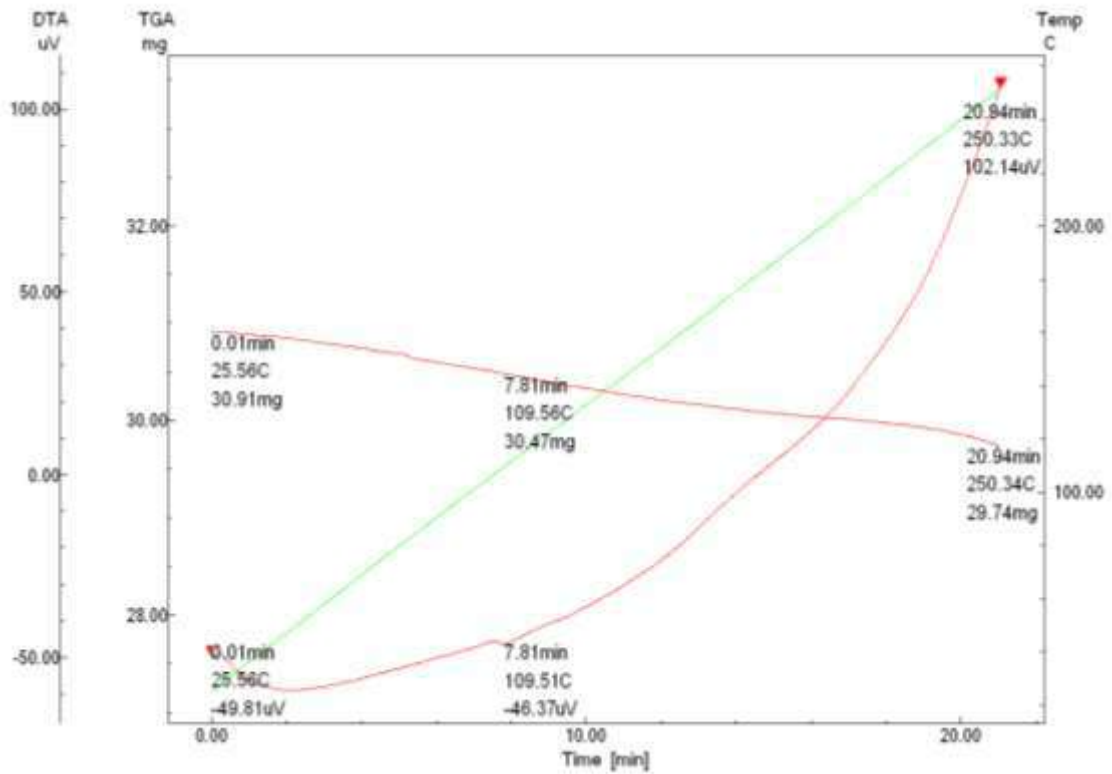


Рис. 5.7. Дериватограма емульгатора полісорбату-80

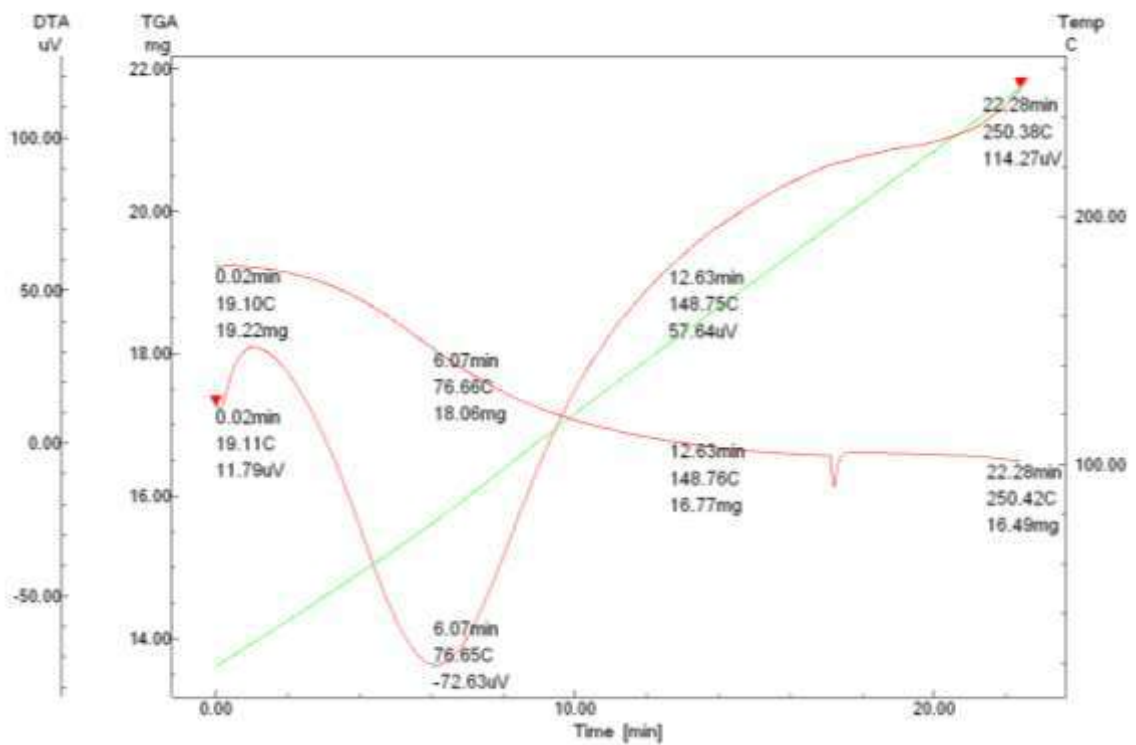


Рис. 5.8. Дериватограма гелеутворювача натрій КМЦ

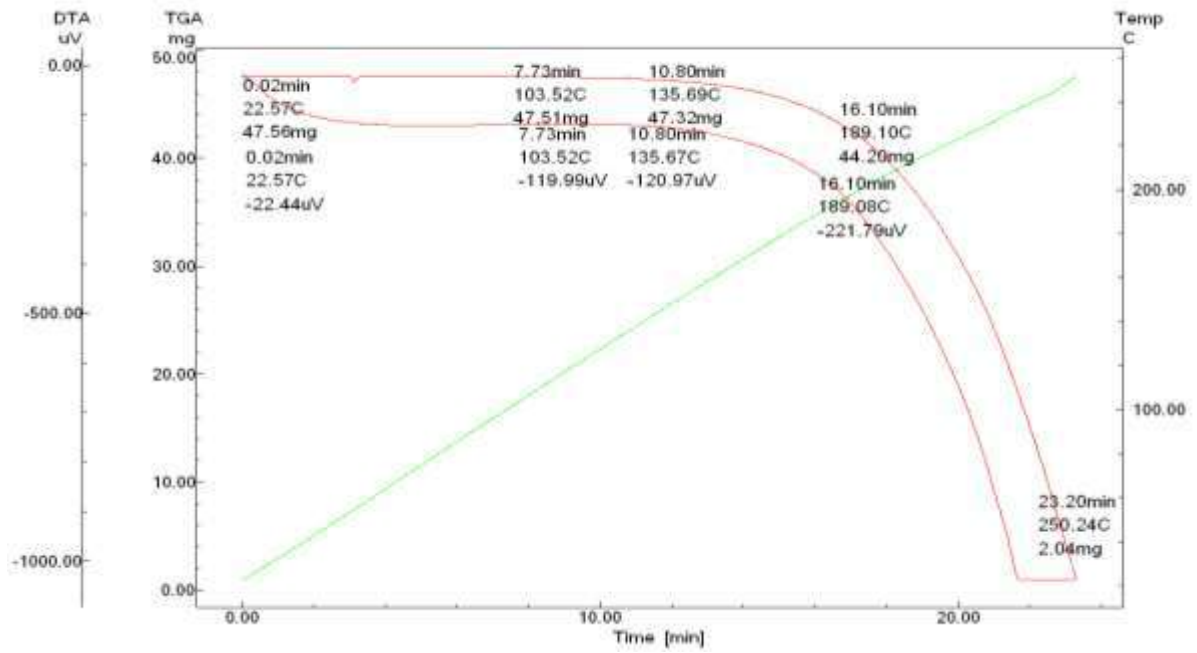


Рис. 5.9. Дериватограма гліцерину

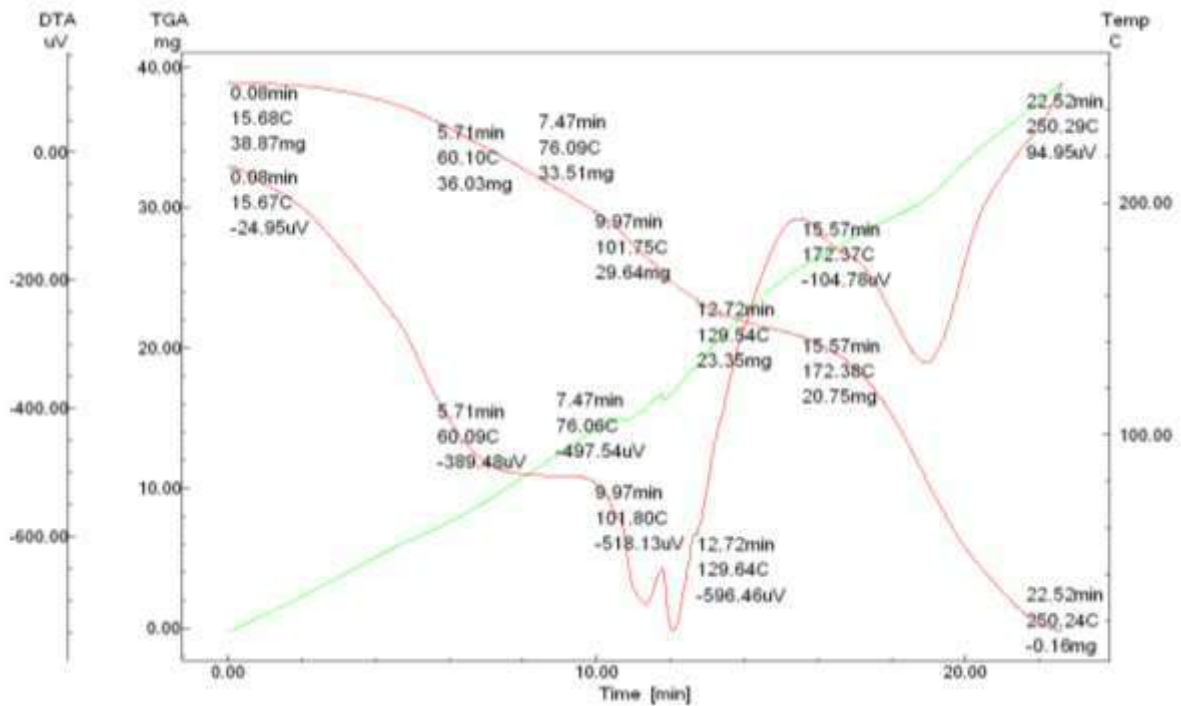


Рис. 5.10. Дериватограма консерванту бензалконію хлориду

Дериватограма консерванту бензалконію хлориду (рис. 5.10) характеризує сполуку як термолабільну, а саме окреслює наявні теплові ефекти, та постійну зміну маси зразку консерванту в процесі експерименту. Вже на п'ятій хв експерименту, при температурі 60,01 °С, маса дослідного зразку змінилась на 2,84 мг (7,31%), а на майже десятій хв при температурі 101, 75 °С – зміна маси склала – 9,23 мг (23,75%). Враховуючи літературні дані про температуру плавлення бензалконію хлориду, та отримані результати можна стверджувати, що в технологічному процесі виготовлення лікарської форми, таку сполуку доцільно вносити до рецептури при мінімальному нагріванні.

На наступному етапі проводили термогравіметричне дослідження готового гелю без ноопепту, який в своєму складі містив Бішофіт Полтавський, полісорбат-80, натрій КМЦ, гліцерин, бензалконію хлорид та воду очищену, а також гель з ноопептом. Отримали наступні дериватограми (рис. 5.11-5.12).

Вивчаючи дериватограми гелів без ноопепту та з ноопептом виявили, що назальні гелі мають подібну динаміку зміни масу зразків та характер теплових ефектів. У дериватограми з ноопетом спостерігається постійна втрата маси дослідного зразку. Так на п'ятій хвилині, від початку експерименту, при температурі 49,03 °С зміна маси склала 2,56 мг (4,47%), на восьмій хвилині 9,82 мг (17,16%), а потім на тринадцятій хвилині при температурі 98, 02 °С 34,85 мг (60,92%). Ймовірно стрімка втрата маси зразку обумовлена наявністю великої кількості водної фази в рецептурі готового гелю з ноопептом. Характер наявних теплових ефектів на дериватограмі гелю з ноопептом співпадають з тепловими ефектами окремих допоміжних компонентів гелевої основи, що, в свою чергу, підтверджує відсутність взаємодії компонентів між собою.

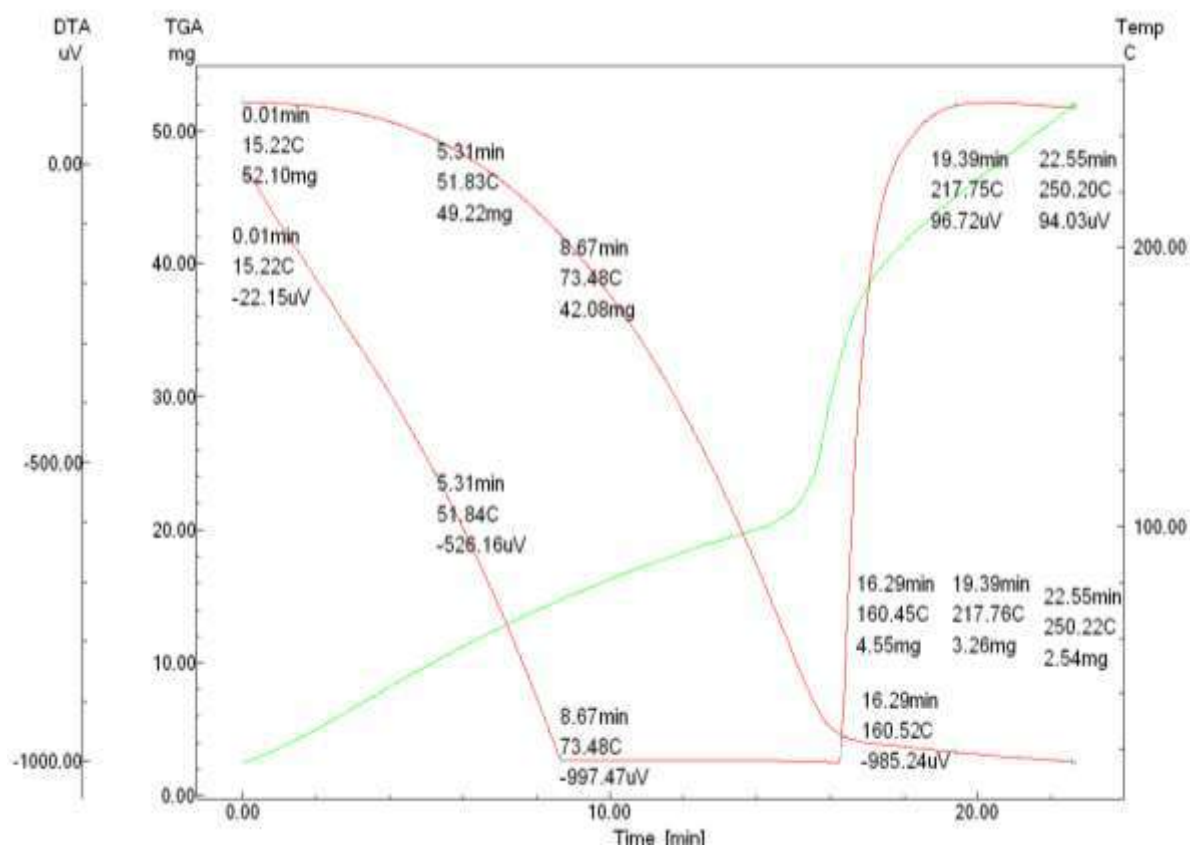


Рис. 5.11. Дериватограма гелю без ноопепту

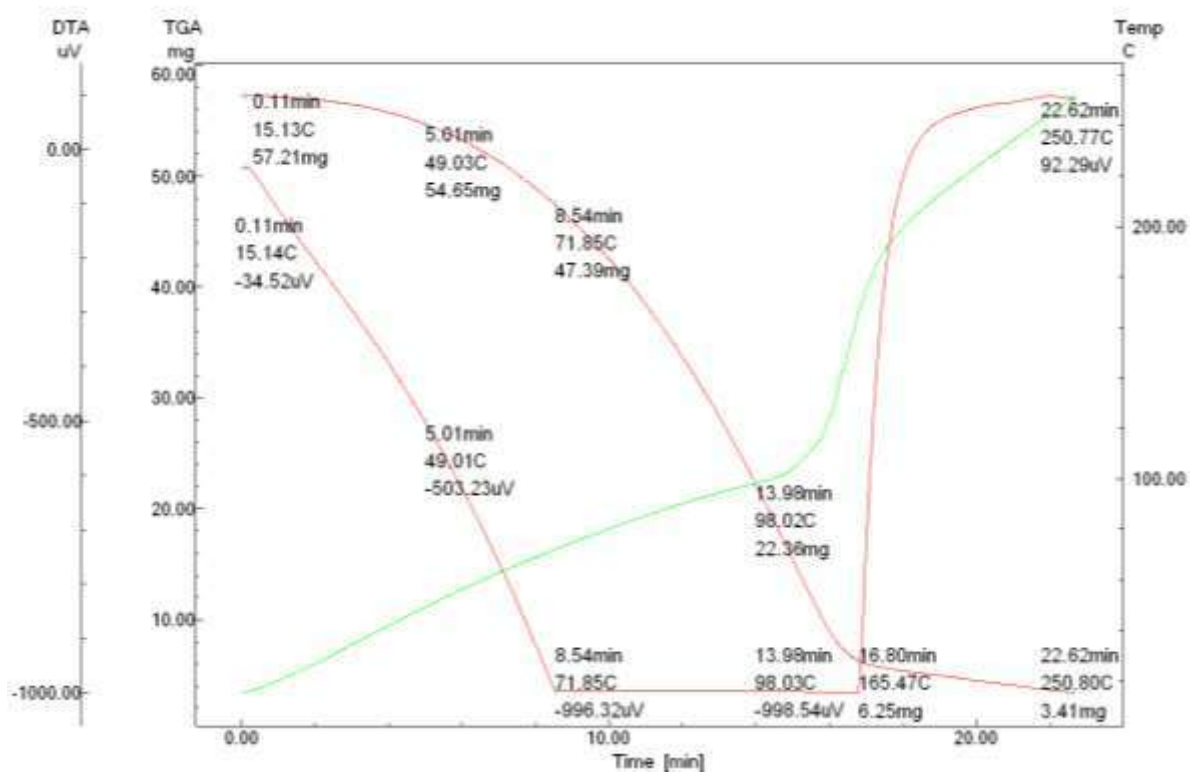


Рис. 5.12. Дериватограма гелю з ноопептом

5.1.4 Реологічні дослідження назального гелю з похідним гліцину. Реологічні дослідження проводили на модульному компактному реометрі MCR 302 ротаційними тестами з використанням коаксіальних циліндрів. З метою всебічної оцінки реологічних характеристик розробленого назального гелю з ноопептом, досліди проводили при різних температурах  $29\pm 0,5$  °C,  $33\pm 0,5$  °C,  $37\pm 0,5$  °C. Отримали реограми плинину назального гелю з ноопептом (рис. 5.13) та реограми в'язкості назального гелю з ноопептом (рис. 5.14).

Отримані реологічні характеристики назального гелю з ноопептом окреслюють наявність у досліджуваного препарату нен'ютонівського типу течії з деякими тиксотропними властивостями, тобто розроблений гель може відновлювати свою структуру після прикладеного зусилля.

Характер реограм течії та реограм в'язкості назального засобу свідчить про рідку консистенцію препарату з низьким порогом течії. Підвищення температури очікувано змінює реологічні характеристики назального гелю з ноопептом. Так при температурі 29 °C початкова в'язкість зразку становила 150 mPa·s, збільшення температури до 33 °C призводило до зменшення початкової в'язкості до 135 mPa·s, а вже при 37 °C початкова в'язкість становила 108 mPa·s. Враховуючи отримані дані можливо припустити, що розроблений гель матиме різну в'язкість при зміні температури в назальній порожнині. Швидкість течії досліджуваного гелю в порожнині носа також матиме мінливий характер та залежатиме від температурного фактору.



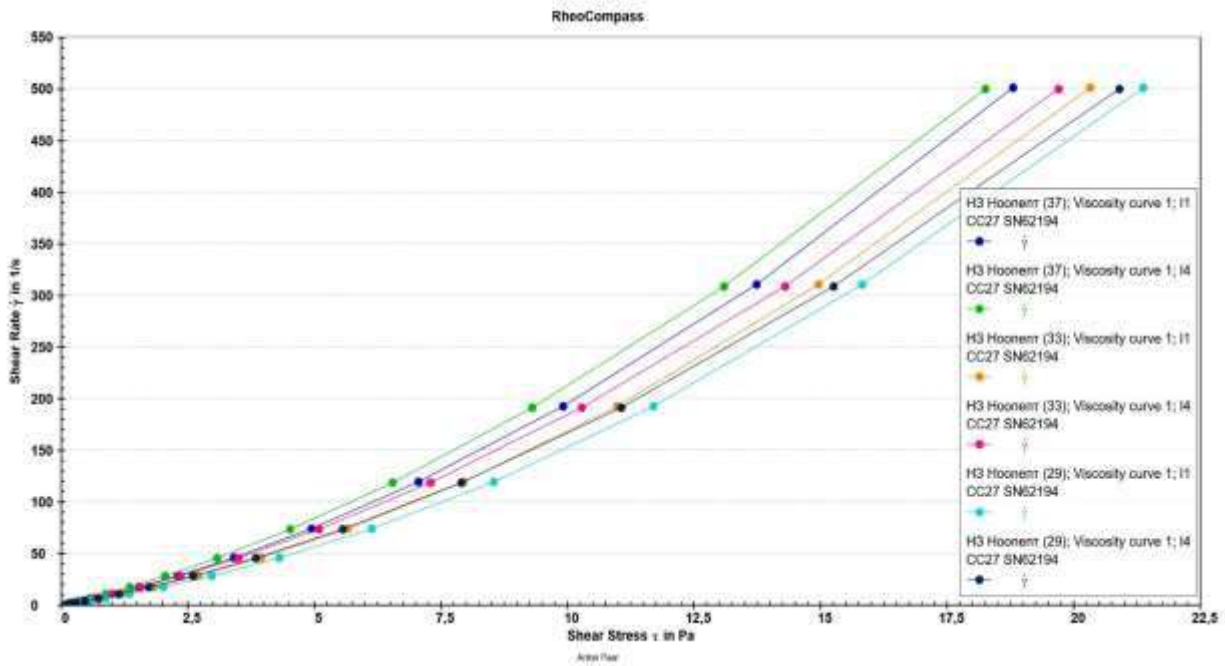


Рис. 5.13. Реограми плинзу назального гелю з ноопептом в діапазоні температур 29 -37 °С

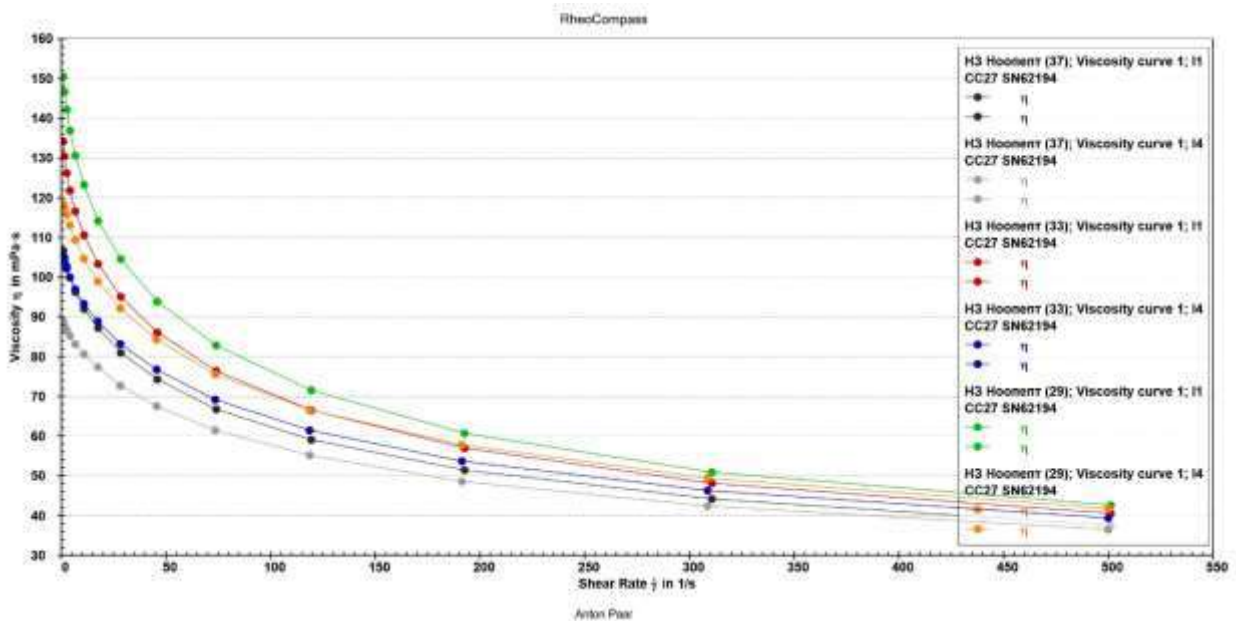


Рис. 5.14. Реограми в'язкості назального гелю з ноопептом в діапазоні температур 29-37 °С

5.1.5 Технологія виготовлення назального гелю в умовах аптеки. Згідно з ДФУ 1.2, 5.N.1.1. та «Вимогами до виготовлення нестерильних лікарських засобів в умовах аптек» (Методичні рекомендації, МОЗ України 2005, видання офіційне друге доповнене й перероблене, затверджені наказом МОЗ України № 398 від 01.07.2015 р) в аптеці забезпечуються умови GPP (належної аптечної практики), щодо приміщення, обладнання, персоналу та контролю якості виготовлюваних нестерильних лікарських засобів.

До складу виготовлюваного інтраназального гелю з етиловим естером N-фенілацетил-1-пролілгліцину входять такі інгредієнти: Бішофіт Полтавський (стандартизований з 20% вмістом магнію хлориду), гліцерин, твін-80, натрій КМЦ, бензалконію хлорид, вода очищена у наступних співвідношеннях:

На 100 г інтраназального гелю необхідно:

Етиловий естер N-фенілацетил-1-пролілгліцину	1,0
Бішофіт Полтавський (стандартизований 20% вмістом магнію хлориду)	5,0
Гліцерин	5,0
Твін-80	1,0
Натрій КМЦ	0,3
Бензалконію хлорид	0,02
Вода очищена	до 100,0

Технологія виготовлення полягає у наступному. У виробничому приміщенні аптеки, для виготовлення нестерильних лікарських засобів, в окрему термостійку ємність, відміряють 40 мл води очищеної і відважують 1,0 г етиловий естер N-фенілацетил-1-пролілгліцину, нагрівають на водяній бані до 60-70 °С при перемішуванні, до розчинення діючої речовини. У зважену порцелянову чашку відміряють 0,3 г натрію КМЦ, додають 38 мл води очищеної. Чашку поміщають на водяну баню і нагрівають при повільному перемішуванні до утворення розчину. Охолоджують. У окрему ємність

відважують 0,02 г бензалконію хлориду та додають 10 мл води очищеної, при перемішуванні розчиняють. До розчину натрію КМЦ додають розчин етилового естеру N-фенілацетил-1-пролілгліцину, розчин бензалконію хлориду, 5 мл Бішофіту Полтавського, 5,0 г гліцерину, перемішують. Після цього додають 1,0 г твіну-80, перемішують. Доводять водою очищеної до маси 100 г, перемішують. Виготовлений інтраназальний гель розфасовують по 10 мл у скляні флакони, закриті гумовою пробкою під алюмінієву обкатку. Готову продукцію маркують і зберігають у прохолодному (8-15°C), захищеному від світла місці. Термін зберігання – 6 місяців.

Виготовлений інтраназальний гель для зовнішнього застосування з етиловим естером N-фенілацетил-1-пролілгліцину підлягає внутрішньо-аптечному контролю якості згідно з методичними рекомендаціями «Вимоги до виготовлення нестерильних лікарських засобів в умовах аптек» (МОЗ України 2005, видання офіційне друге доповнене й перероблене, затверджені наказом МОЗ України № 398 від 01.07.2015 р.) та вимог ДФУ. При виготовленні інтраназального гелю з етиловим естером N-фенілацетил-1-пролілгліцину для назального застосування всі технологічні операції, пов'язані зі змішуванням основи-носія, треба проводити повільно для запобігання зайвої аерації гелю натрій-карбоксиметилцелюлози. Якщо це все ж сталося, потрібно залишити основу на 3-4 год з періодичним легким перемішуванням для видалення з неї повітряних бульбашок.

За результатами проведених фармацевтичних досліджень отриманого назального гелю з етиловим естером N-фенілацетил-1-пролілгліцину отримано патент на корисну модель і розроблено та затверджено інформаційний лист (Випуск з проблеми «Фармація». 2020. № 70) «Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір N-фенілацетил-1-пролілгліцину в умовах аптеки» з метою екстемпорального виготовлення назальної лікарської форми.

5.1.6 Опрацювання специфікації якості та дослідження стабільності назального гелю з етиловим естером N-фенілацетил-*l*-пролілгліцину. Створення специфікації якості, на розроблену лікарську форму, ґрунтується на науково-обґрунтованій доцільності тесту та відповідних вимогах нормативних документів – ДФУ, настанов якості та ін. Враховуючи наявність в ДФУ характеристик видів назальних форм – назальні порошки, назальні промивки, назальні краплі та спреї, назальні м'які лікарські засоби та назальні палички, вподальшому, обрано за основу, методи контролю характерні для виду назальної лікарської форми – назальні м'які засоби (гелі).

Розроблено специфікацію на створений назальний гель з ноопептом (табл. 5.8).

Таблиця 5.8

**Специфікація на інтраназальний гель з етиловим естером  
N-фенілацетил-*l*-пролілгліцину**

Показник	Допустимі норми	Методи контролю
1	2	3
Опис	Прозорий рідкий гель, без запаху	МКЯ, п. 1, ДФУ, ст. «Назальні м'які лікарські засоби»
Ідентифікація		
Етиловий естер N-фенілацетил- <i>l</i> -пролілгліцину	Ультрафіолетовий спектр препарату має максимум поглинання при 258 нм	МКЯ, п. 2
pH	5,0-6,0	МКЯ, п. 3, ДФУ 2.0, 2.2.3.
Однорідність	Гель повинен бути однорідним. У трьох з чотирьох проб не має бути видимих частинок	МКЯ, п. 4, ДФУ, 2.9.40
Маса вмісту флакона	Не менше номінальної	МКЯ, п. 5
Мікробіологічна чистота	Загальне число аеробних мікроорганізмів не більше: (ТАМС) – $10^2$ КУО/г.	МКЯ, п. 6, ДФУ, 2.6.12, 2.6.31

Продовж. табл. 5.8

1	2	3
	Загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) – $10^1$ КУО/г. Відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г. Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г.	
Кількісне визначення		
Етиловий естер N-фенілацетил-1-пропілглицину	Має бути від 0,9 до 1%	МКЯ, п. 7
Упаковка	По 10 мл у скляні флакони, закриті гумовим корком під алюмінієву обкатку	
Маркування	Згідно з оригінал-макетом упаковки	
Зберігання	Зберігають у прохолодному (8-15 °С), захищеному від світла місці	
Термін придатності	При температурі 8-15 °С – 6 місяців. Після розкриття флакону, 1 місяць за температури 8-15 °С	

В подальшому три серії назального гелю з етиловим естером N-фенілацетил-1-пропілглицином зберігали протягом визначеного часу та вивчали відповідні показники якості. Вивчення динаміки мінливості запропонованих характеристик якості розробленого назального гелю, для експериментального підтвердження стабільності лікарської форми наведено в табл. 5.9.

Як видно з наведених експериментальних даних (табл. 5.9), показники якості рідкого назального гелю, у трьох дослідних серіях, не суттєво змінювались протягом шести місяців зберігання при температурі 8-15°C. Після шести місяців зберігання спостерігалось деяке зменшення (більше 15%) кількості діючої речовини в лікарських формах. Тому прогнзований термін зберігання розробленої лікарської форми становить 6 місяців при температурі 8-15°C.

Таблиця 5.9

## Результати аналізу назального гелю з етиловим естером N-фенілацетил-І-пролілглїцину в процесі зберігання

Серія	Термін	Найменування показника / результат аналізу					
		Опис	pH	Однорідність	Маса вмісту фл.	Мікробіологічна чистота	Кількісне визначення, %
Початок		прозорий рідкий гель, без запаху	5,25±0,07	однор.	9,98±0,01	бактерій –0; гриби – відсутні; Escherichia coli, Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus в 1 г відсутні	0,98±0,01
011219	1 місяць	«-/-»	5,24±0,05	«-/-»	9,97±0,01	бактерій – 0; «те саме»	0,98±0,01
	3 місяці	«-/-»	5,31±0,04	«-/-»	9,98±0,01	бактерій – 0; «-/-»	0,97±0,01
	6 місяців	«-/-»	5,3±0,05	«-/-»	9,98±0,01	бактерій – 10; «-/-»	0,95±0,02
	12 місяців	«-/-»	5,25±0,05	«-/-»	9,97±0,01	бактерій – 10; «-/-»	0,85±0,02
021219	1 місяць	«-/-»	5,23±0,05	«-/-»	9,96±0,01	бактерій – 0; «-/-»	0,98±0,01
	3 місяці	«-/-»	5,25±0,04	«-/-»	9,96±0,02	бактерій – 0; «-/-»	0,97±0,01
	6 місяців	«-/-»	5,26±0,03	«-/-»	9,96±0,01	бактерій – 10; «-/-»	0,95±0,02
	12 місяців	«-/-»	5,28±0,04	«-/-»	9,97±0,01	бактерій – 10; «-/-»	0,85±0,02
031219	1 місяць	«-/-»	5,26±0,03	«-/-»	9,97±0,01	бактерій – 0; «-/-»	0,98±0,01
	3 місяці	«-/-»	5,28±0,04	«-/-»	9,96±0,01	бактерій – 0; «-/-»	0,97±0,01
	6 місяців	«-/-»	5,3±0,03	«-/-»	9,98±0,01	бактерій – 10; «-/-»	0,95±0,02
	12 місяців	«-/-»	5,27±0,06	«-/-»	9,96±0,01	бактерій – 10; «-/-»	0,83±0,02

За матеріалами розділу опубліковано роботи: [213, 358-363].

## ВИСНОВКИ

1. В результаті комплексних фізико-хімічних, фармакотехнологічних мікробіологічних та біофармацевтичних досліджень розроблена інтраназальна лікарська форма з ноопептом церебропротективної дії.

2. Визначено, що вид полімерів гідрофільних основ та спирти для зволоження слизової оболонки чинять значимий вплив на вивільнення ноопепту із назальних лікарських форм. Оптимальне вивільнення ноопепту з розроблених лікарських форм забезпечують основи на базі полімерів натрій карбоксиметилцелюлози з додаванням гліцерину.

3. Встановлено, що енансер адсорбції – твін-80 в концентрації 1% чинить значимий вплив на вивільнення ноопепту із назальної лікарської форми.

4. Термогравіметричними дослідженнями діючих та допоміжних речовин інтраназального гелю з ноопептом встановлено, що технологічний процес виготовлення гелю з ноопептом доцільно проводити з урахуванням термолабільних сполук, а саме, консервант, доцільно вводити до рецептури при температурі не вище 40 °С.

5. Виявлено, що розроблена лікарська форма з гелю з ноопептом є сумішшю діючих та допоміжних речовин, інгредієнти яких не взаємодіють між собою, та можуть поєднуватися в одній лікарській формі.

6. Проведеними мікробіологічними дослідженнями обґрунтовано введення до складу рецептури інтраназального гелю з ноопептом консерванту – бензалконію хлориду у концентрації 0,02%.

7. Зважаючи на комплексні дослідження, опрацьовано кінцеву рецептуру інтраназального гелю з ноопептом, яка містить: етиловий естер N-фенілацетил-1-пролілгліцину – 1,0; Бішофіт Полтавський (стандартизований 20% вмістом магнію хлориду) – 5,0; гліцерин – 5,0; твін-80 – 1,0; натрій КМЦ – 0,3; бензалконію хлорид – 0,02; вода очищена до 100,0.

8. Опрацьовану технологію інтраназального гелю з ноопептом церебропротективної дії викладено в інформаційному листі Укрмедпатентінформ МОЗ України «Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір N-фенілацетил-1-пролілгліцину в умовах аптеки». Розроблена рецептура та технологія виготовлення інтраназального гелю з ноопептом пройшла апробацію в умовах екстемпорального виробництва низки аптек.



## РОЗДІЛ 6

НАУКОВЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ  
ОТРИМАННЯ НАЗАЛЬНИХ ЗАСОБІВ СИСТЕМНОЇ ДІЇ З РЕЦЕПТОРНИМ  
АНТАГОНІСТОМ ІНТЕРЛЕЙКІНУ-1В (IL-1Ra)6.1 Експериментальне обґрунтування складу, технології інтраназальної  
форми у вигляді гелю з рецепторним антагоністом інтерлейкіна-1 $\beta$  (IL-1Ra)

При цереброваскулярних захворюваннях, серед вагомих факторів загибелі нервових клітин, вважають глутаматну ексайтотоксичність та окислювальний стрес. Також, в клітинах, відбувається виснаження енергетичних ресурсів, порушення іонного гомеостазу, дисфункція мітохондрій, гіперпродукція активних форм кисню, яка спричиняє утворенню активних радикалів та зменшення активності антиоксидантної системи [310, 364, 365].

До речовин, які в осередку ішемії, крім дегенеративного впливу, забезпечують життєздатність клітин – відносять цитокіни, нейротрофічні фактори та модуляторні нейропептиди. Цитокіни представляють собою багатофункціональні поліпептидні медіатори, які в свою чергу поділяються на протизапальні (інтерлейкіни IL-1, IL-6, IL-8, фактор некрозу пухлин та інш.) та регуляторні (фактори росту, IL-10, IL-4). Вважається, що цитокіни IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$ , FNO $\alpha$  є ключовими медіаторами мікрогліальних нейроімунних функцій, які продукуються у відповідь на ішемію головного мозку. Відповідно, перспективним напрямком церебропротективної терапії є корекція дефіциту протизапальних речовин, в тому числі з використанням антагоністу рецепторів інтерлейкіну-1 (IL-1Ra) [310, 366, 367].

Антагоніст рецепторів інтерлейкіну-1 (IL-1Ra) – активний фармацевтичний інгредієнт, який отримують методом генної трансформації *Escherichia coli*, забезпечує нейропротекторний ефект, а саме – гальмування процесів окислювальної модифікації білків, нормалізацію функціональної

активності мітохондрій, енергетичного обміну, неврологічного статусу в постішемичному періоді [367-370].

Назальний шлях введення є найбільш перспективним неінвазивним методом доставки діючих речовин до головного мозку, для препаратів церебропротективної дії, за рахунок анатомічних особливостей розташування нервів: n. olfactorii або гілки трійчастого нерву n. ophthalmicus, які починаються в головному мозку і закінчуються в порожнині носа [371-373].

Тому, з метою розширення асортименту фармакотерапевтичних засобів – нейропротекторів, розробка нової інтраназальної форми, на прикладі діючої речовини пептидної природи високої молекулярної маси, з активним фармацевтичним інгредієнтом – рецепторним антагоністом інтерлейкіну-1 (IL-1Ra) є актуальним та перспективним.

За допомогою розробленої нової інформаційної технології проведено *in silico* прогнозування проникності обраного АФІ через ГЕБ. Встановлено, що всі моделі машинного навчання: Random forest (score 0,6787), Lightgbm (score 0,6101), Extra tree (0,6009), Gradient Boosting Classifier (score 0,6904), Blender rt lightgbm et (score 0,6725) висвітлюють негативний результат. Враховуючи отримані дані, експертною системою запропоновано до складу модельної рецептури, додати енхансер адсорбції (твін-80), який обрано з бази даних допоміжних речовин. Далі інформаційною системою запропоновано модельні рецептури з гідрофільними компонентами, проведено перевірку можливості виникнення фармацевтичних несумісностей на розроблених моделях машинного навчання (blender tree: rf, et; blener boosting: catboost, lightgbm, xgboost) між IL-1Ra, та запропонованими інгредієнтами рецептури. *In silico* моделюванням встановлено, що використання в якості мукоадгезивного компоненту хітозану та альгілату натрію з IL-1Ra, викликатиме несумісність, ймовірно пов'язану особливостями структури молекули АФІ.

В результаті, обрано набір інгредієнтів (мукоадгезивні компоненти, зволожувачі, енхансер адсорбції) для подальших експериментальних досліджень назального засобу церебропротективної дії.

Враховуючи літературні дані щодо практичного застосування IL-1Ra, було обрано його концентрацію в модельних формах – 0,5% [366, 367, 368, 369].

6.1.1 Обґрунтування вибору допоміжних речовин для назальної форми з IL-1Ra. При розробці нового назального засобу необхідно обрати таку композицію допоміжних речовин, яка буде забезпечувати інтенсивне вивільнення діючої речовини з лікарської форми для забезпечення швидкого терапевтичного ефекту. Тому, з метою обґрунтування вибору допоміжних речовин, для назального гелю рецепторного антагоніста інтерлейкіна-1  $\beta$ , вивчено вплив фармацевтичних факторів (полімери та спирти) на інтенсивність вивільнення IL-1Ra з назальної форми.

Експериментальні дослідження проведено за планом двохфакторного дисперсійного аналізу, з повторними спостереженнями, методом рівноважного діалізу крізь напівпроникну мембрану – целофанову плівку Curophan, Type 150 pm,  $11 \pm 0,5$  мкм завтовшки у вертикальних чарунках дифузії Franz Cells (PermeGear, Inc., США). У кожній чарунці експерименту по 3 повтори. Фактори, що досліджувались: фактор А (вид полімеру) – А1 – хітозан 3%, А2 – натрію карбоксиметилцелюлоза 0,3%, А3 – натрію гіалуронат 0,7%, А4 – натрію альгінат 0,5%; фактор В (вид спирту): В1 – без спирту, В2 – сорбіт, В3 – гліцерин, В4 – D-пантенол.

Сирти та полімери розчиняли окремо у частині води, за виключенням хітозану, який розчиняли у розчині кислоти лимонної 10%. До отриманих розчинів допоміжних речовин додавали розчин активного компоненту та ретельно перемішували, доводили водою очищеної до відповідної маси. Усі зразки підлягали органолептичному контролю на відсутність ознак будь-яких взаємодій між компонентами (відсутність осаду, поява забарвлення та ін.).

Вивільнення IL-1Ra досліджено методом рівноважного діалізу, в якості діалізного середовища використано воду очищену. Концентрацію IL-1Ra, після 30 хвилин, визначено спектрофотометрично [213], температура проведення

дослідження  $37 \pm 0,5$  °С. Наважку брали – 4,0, об'єм чарунки 25 мл, максимальна очікувана концентрація 0,8 мг/мл (0,08%).

Матриця планування експерименту і отримані значення концентрації ІЛ-1Ra у діалізаті (мг/мл) наведено у табл. 6.1.

Таблиця 6.1

**Матриця планування експерименту та значення концентрації ІЛ-1Ra  
в діалізаті (мг/мл)**

Фактор	B1	B2	B3	Загальна сума
A1	осад	осад	осад	–
A2	0,012	0,26	0,66	2,98
	0,012	0,26	0,66	
	0,016	0,30	0,80	
A3	0,012	0,008	0,20	0,73
	0,008	0,004	0,20	
	0,008	0,008	0,28	
A4	осад	осад	осад	–
A5	0,02	0,008	0,08	0,31
	0,02	0,016	0,08	
	0,016	0,008	0,064	
Загальна сума	0,124	0,872	3,024	4,02

Після виготовлення модельних форм, експериментальними дослідженнями підтверджено *in silico* прогноз фармацевтичної несумісності у модельних формах з хітозаном та альгінатом натрію. Тому, за результатами органолептичного контролю, для дисперсійного аналізу, було виключено усі композиції на основі розчину хітозану (фактор А1) та натрію альгінату (фактор А4). Результати дисперсійного аналізу представлено у табл. 6.2.

Виходячи з представлених результатів дисперсійного аналізу  $F_{\text{експ.}} > F_{\text{табл.}}$  для факторів А і В, тобто як полімери, так і зволожувачі чинять значущий вплив на вивільнення діючої речовини з експериментальних композицій.

Таблиця 6.2

**Дисперсійний аналіз результатів експериментальних даних з  
визначення вивільнення ІЛ-1Ra**

Джерело мінливості	Сума квадратів (SS)	Число ступенів свободи (f)	Середній квадрат (MS)	F <sub>експ.</sub>	F <sub>табл.</sub>
Фактор А	0,458	2	0,229	22,09	3,60
Фактор В	0,504	2	0,252	24,30	3,60
АВ-взаємодія	0,335	4	0,084	8,09	2,90
Помилка	0,187	18	0,010	—	—
Загальна сума	1,914	26	—	—	—

Було проведено перевірку розходження середніх значень результатів за допомогою множинного рангового критерію Дункана. В результаті побудовано наступні ряди переваг: натрій карбоксиметилцелюлоза > гіалуронат натрію (гідроксиетилцелюлоза) за фактором А; D-пантенол > сорбіт > гліцерин за фактором В.

Враховуючи вищезазначене, для назальної форми з ІЛ-1Ra в якості допоміжних речовин доцільно використовувати мукоадгезивний полімер – натрієву сіль карбоксиметилцелюлози, а також спирт-зволожувач D-пантенол.

Рецептура такої назальної форми складається з: ІЛ-1Ra 0,5%, твіну-80 2,0, натрій карбоксиметилцелюлози 0,3%, D-пантенолу 5,0, води очищеної до 100,0.

6.1.2 Обґрунтування вибору консерванту для назального гелю з рецепторним антагоністом інтерлейкіна-1 $\beta$  (ІЛ-1ra). Серед вимог ДФУ І вид. до назальних лікарських засобів є мікробіологічна стабільність, а саме наявність стадії стерилізації або антимікробних засобів (консервантів) у складі рецептури. Враховуючи термолабільність АФІ в назальному засобі доцільно до складу рецептури додати консервант, який забезпечуватиме мікробіологічну стабільність. Мікробіологічні дослідження проведено в лабораторії мікробіологічних досліджень, НМЛЦ Запорізького державного медичного

університету (завідувач лабораторії к. мед. н., доц. Поліщук Н. М.), під керівництвом доц. Количевої Н. Л., з метою обґрунтування вибору консерванту.

На початку дослідження проводили вивчення мікробіологічної стабільності назальної лікарської форми без консерванту, та відповідно до методик ДФУ І вид. (2.6.12, 2.6.13) проводили дослідження на наявність в зразках в зразках аеробних мікроорганізмів, дріжджових та плісневих грибів, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Результати досліджень наведені в табл. 6.3.

Таблиця 6.3

**Результати визначення мікробіологічної чистоти дослідних серій  
інтраназального засобу з ноопептом**

Найменування композиції	Вимоги ДФУ І вид.	Результат дослідження
Інтраназальна форма з ІЛ-1Ra без консерванту	Загальне число аеробних мікроорганізмів не більше: (ТАМС) – $10^2$ КУО/г. Загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) – $10^1$ КУО/г. Відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г. Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г.	ТАМС – $4,1 \times 10^2$ ; ТУМС – $1,2 \times 10^1$

Враховуючи отримані дані, до рецептури доцільно вводити консервант. Вподальшому проводили вибір виду та кількості консерванту за допомогою розробленої нами експертної системи та у відповідності до літературних даних [354]. Отримали матрицю планування вибору консерванту (табл. 6.4). Оцінку мікробіологічної чистоти проводили відповідно до ДФУ І вид. (2.6.12, 2.6.13).

В подальшому вивчали отримані результати мікробіологічної чистоти модельних назальних гелів з ІЛ-1Ra з різними консервантами (табл. 6.5).

Отримані результати дозволили обрати в якості консерванту – бензалконію хлорид в концентрації 0,02 %, який забезпечував належний рівень мікробної контамінації даного лікарського засобу відповідно до вимог ДФУ І вид. категорії 2 (назальні лікарські засоби).

Таблиця 6.4

## Матриця вибору консерванту для назальної композиції з ІЛ-1Ra

Компоненти	Номер композиції				
	1	2	3	4	5
ІЛ-1Ra	10 мл	10 мл	10 мл	10 мл	10 мл
D-пантенол	5	5	5	5	5
Твін-80	2	2	2	2	2
Натрій КМЦ	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Натрію бензоат	–	0,1	–	–	–
Бензалконію хлорид	–	–	–	–	0,02
Хлоргексидину біглюконат	–	–	0,005	–	–
Germall Plus®	–	–	–	0,1	–
Вода очищена	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0

Таблиця 6.5

**Результати визначення мікробіологічної чистоти експериментальних назальних модельних систем з ІЛ-1Ra з різними консервантами**

Найменування консерванту, концентрація %	Вимоги ДФУ І вид.	Результат дослідження
1	2	3
Бензалконію хлорид, 0,02%	Загальне число аеробних мікроорганізмів не більше: (ТАМС) – $10^2$ КУО/г. Загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) – $10^1$ КУО/г. Відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г. Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г.	ТАМС – 0; ТУМС – 0; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> і <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г 0
Натрію бензоат, 0,1%	«те саме»	ТАМС – 6,2; ТУМС – 3; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> і <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г 0

Продовж. табл. 6.5

1	2	3
Хлоргексидину біглюконат, 0,005%	«-//-»	ТАМС – 1,2; ТУМС – 3; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> і <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г 0
Germall Plus, 0,1%	«-//-»	ТАМС – 2; ТУМС – 9; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> і <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г 0

6.1.3 Біофармацевтичні та термогравіметричні дослідження назального гелю з рецепторним антагоністом інтерлейкіна-1 $\beta$  (IL-1Ra). На основі попередніх наших експериментальних досліджень було визначено склад основи-носія назального лікарського засобу, а також необхідність додавання консерванту. Розроблена рецептура початково забезпечувала задовільний рівень вивільнення діючої речовини. Однак, з урахуванням пептидної природи біологічно активного компоненту IL-1Ra, потрібно враховувати можливу недостатню стабільність при зберіганні препарату зі зміною рН середовища. Тому, в подальшому, проведено вивчення стабільності композиції при зберіганні за органолептичними показниками, значенням рН та кількісним вмістом діючої речовини. Рецептура такої композиції містила: IL-1Ra 0,5%, твін-80 2%, натрій карбоксиметилцелюлоза 0,3%, D-пантенол 5%, бензалконію хлорид 0,02%, вода очищена до 100,0. На рис. 6.1 показано динаміку зміни рН зазначеної композиції при зберіганні у холодильнику (5 °C $\pm$ 3). В табл. 6.5 представлено результати кількісного вмісту активного компоненту.



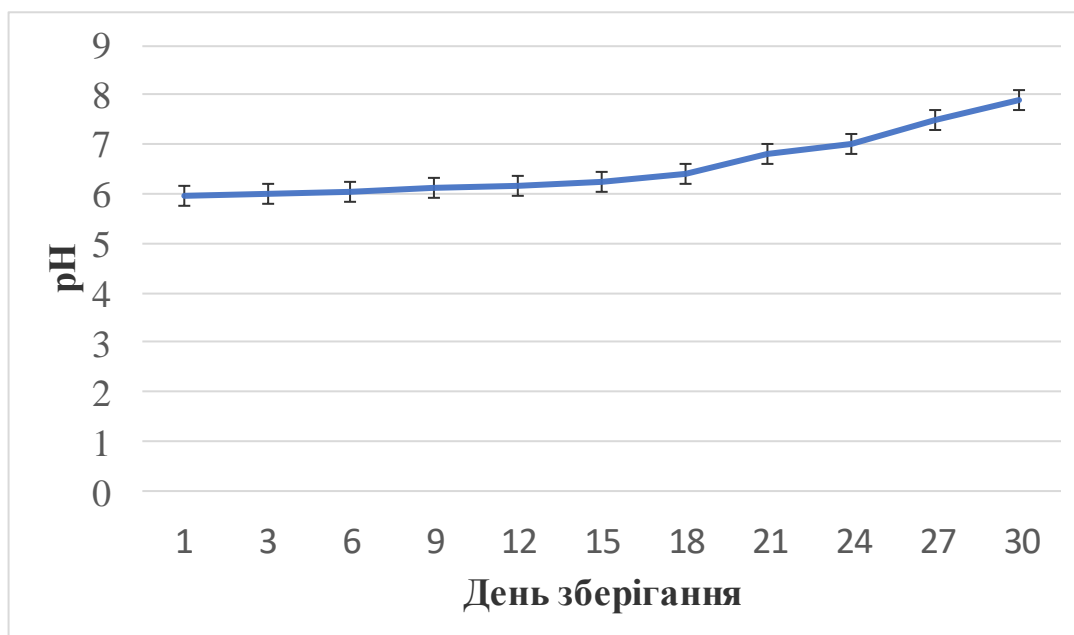


Рис. 6.1. Динаміка зміни рН назальної композиції з ІЛ-1Ra при зберіганні у холодильнику

Таблиця 6.6

**Результати кількісного вмісту ІЛ-1Ra у назальній композиції при зберіганні у холодильнику ( $x \pm SE$ ,  $P < 0,05$ )**

День	1	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
C, %	0,496 $\pm 0,01$	0,493 $\pm 0,01$	0,496 $\pm 0,01$	0,493 $\pm 0,01$	0,486 $\pm 0,01$	0,486 $\pm 0,01$	0,476 $\pm 0,01$	0,476 $\pm 0,01$	0,466 $\pm 0,01$	0,446 $\pm 0,01$	0,446 $\pm 0,01$

Представлені результати наочно демонструють необхідність додавання буферного розчину до досліджуваної назальної форми, для стабілізації показників рН.

Для забезпечення тривалого терміну зберігання назального лікарського засобу з ІЛ-1Ra було приготовано дослідні композиції із тим самим вмістом діючих та допоміжних речовин, але із застосуванням в якості розчинника не води очищеної, а фосфатних буферних розчинів у діапазоні рН, близькому до нормального значення рН назальної порожнини. Також за результатами наших попередніх досліджень, з метою підвищення стабільності препарату, було

введено до складу композиції трилон Б. Склад експериментальних композицій представлений у табл. 6.7.

Таблиця 6.7

**Склад експериментальних композицій назального лікарського засобу з  
IL-1ra**

Буферний розчин / значення рН / склад	фосфат- ний буфер 5.5	фосфат- ний буфер 6.0	фосфат- ний буфер 6.5	фосфат- ний буфер 7.0	фосфат- ний буфер 7.5
	рН 5,5-5,9	рН 6,0-6,4	рН 6,5-6,9	рН 7,0-7,4	рН 7,5-7,8
Напівфабрикат-розчин IL-1Ra	10 мл	10 мл	10 мл	10 мл	10 мл
Натрій КМЦ	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
D-пантенол	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Бензалконію хлорид	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Трилон Б	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012
Твін-80	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Фосфатний буферний розчин відповідного рН (ДФУ 2 вид.)	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0	до 100,0

На наступному етапі, проводили визначення кількісного вмісту IL-1Ra у експериментальних композицій, в різних діапазонах рН, при зберіганні в умовах холодильника. Отримані результати представлені у табл. 6.8.

За даними табл. 6.8 можна виявити оптимальний діапазон рН для експериментальної композиції: 6,0-7,0. Тому, в подальшому, доцільним є використання фосфатного буферного розчину з рН 6.0 за ДФУ 2 вид. (у складі – динатрій гідрофосфат та кислота лимонна), який дозволяє досягти оптимальних значень.

Таблиця 6.8

**Динаміка зміни кількісного вмісту ІЛ-1Ra при зберіганні дослідних  
назальних композицій з рН 5,5-7,8**

День зберігання	Діапазон рН / С% ІЛ-1Ra				
	5,5-5,9	6,0-6,4	6,5-6,9	7,0-7,4	7,5-7,8
1	0,501 ± 0,001%	0,500 ± 0,002%	0,500 ± 0,001%	0,502 ± 0,002%	0,501 ± 0,002%
3	0,501 ± 0,001%	0,501 ± 0,002%	0,501 ± 0,001%	0,500 ± 0,001%	0,500 ± 0,001%
9	0,502 ± 0,002%	0,500 ± 0,001%	0,500 ± 0,002%	0,500 ± 0,002%	0,500 ± 0,002%
12	0,501 ± 0,002%	0,500 ± 0,001%	0,501 ± 0,002%	0,494 ± 0,003%	0,496 ± 0,001%
15	0,495 ± 0,002%	0,500 ± 0,002%	0,500 ± 0,001%	0,486 ± 0,0029%	0,487 ± 0,002%
18	0,494 ± 0,002%	0,501 ± 0,002%	0,500 ± 0,001%	0,484 ± 0,002%	0,478 ± 0,001%*
21	0,488 ± 0,001%	0,500 ± 0,001%	0,500 ± 0,002%	0,474 ± 0,002%*	0,470 ± 0,002%*

Примітка. \* посилення опалесценції ( $\bar{x} \pm \Delta x$ ,  $P < 0,05$ )

Для підтвердження потенційної високої активності засобу доцільним є вивчення деяких характеристик фармацевтичної доступності (показників кінетики) розробленої лікарської форми.

Результати дослідження кінетики вивільнення активного компоненту із назальної лікарської форми представлені у табл. 6.9. Згідно отриманих результатів було побудовано графік залежності вивільнення ІЛ-1Ra від часу (рис. 6.2), а також подібний графік у логарифмічному масштабі (рис. 6.3).

**Результати дослідження кінетики вивільнення ІЛ-1Ra із назальної лікарської форми**

Концентрація ІЛ-1Ra у діалізаті ( $C_{max}$ %) через									
5 хв		10 хв		15 хв		20 хв		25 хв	
29 °C	37 °C	29 °C	37 °C	29 °C	37 °C	29 °C	37 °C	29 °C	37 °C
0,011	0,008	0,015	0,018	0,025	0,033	0,039	0,049	0,058	0,071
0,01	0,009	0,014	0,02	0,026	0,031	0,038	0,049	0,057	0,071
0,01	0,012	0,015	0,02	0,024	0,029	0,038	0,05	0,057	0,073
0,01	0,011	0,016	0,022	0,026	0,028	0,04	0,052	0,059	0,072
0,01	0,01	0,016	0,02	0,026	0,030	0,04	0,05	0,059	0,073
0,01± 0,0012	0,01± 0,0012	0,015± 0,0023	0,020± 0,0008	0,025± 0,0025	0,03± 0,0006	0,039± 0,0028	0,048± 0,0008	0,058± 0,0028	0,072± 0,0008

Примітка. Максимально-допустима концентрація в 1 чарунці експерименту, з урахуванням розведень,  $C_{max}\% = 0,08\%$  ( $\bar{x} \pm \Delta x$ ,  $P < 0,05$ )

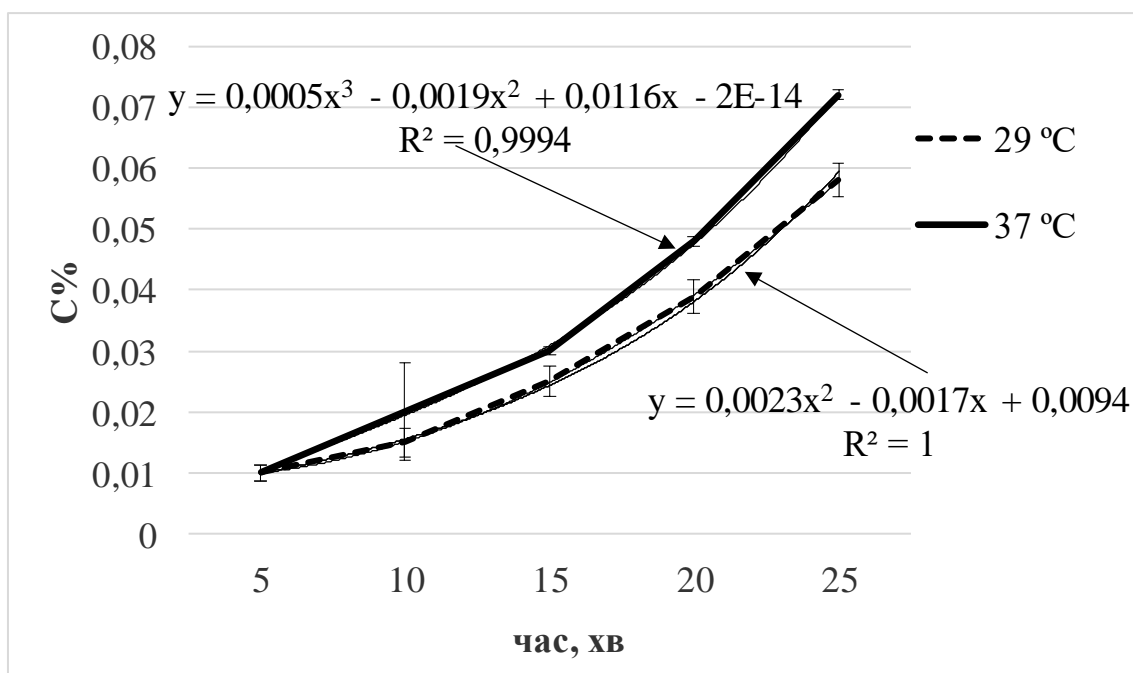


Рис. 6.2. Динаміка вивільнення ІЛ-1ra з назальної форми

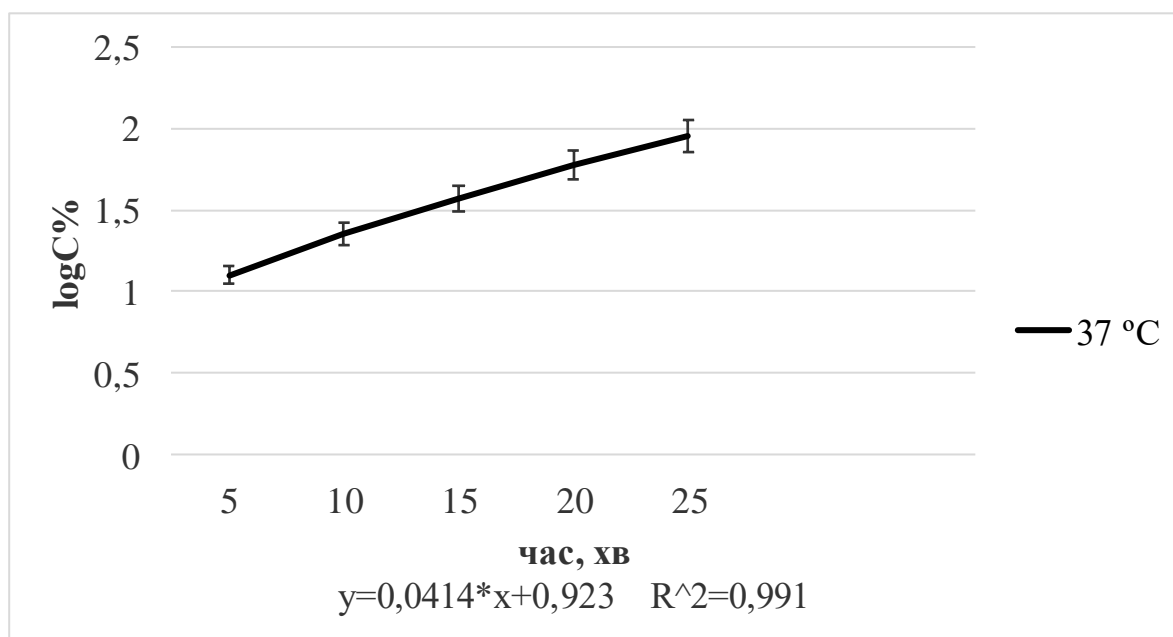


Рис. 6.3. Графік залежності  $\log$  % вивільнення ІЛ-1Ra від часу

Згідно отриманих результатів можна зробити висновок, що вивільнення ІЛ-1Ra з назальної форми, протягом 25 хв, підпорядковується рівнянню першого порядку, тому, в досліді *in vivo*, ймовірно доцільно використати однокамерну модель фармакокінетики. Розраховані рівняння дозволять прогнозувати вивільнення діючої речовини в будь-який проміжок часу з високою точністю ( $R^2 > 0,99$ ). За результатами дослідження розраховано показники константи вивільнення ( $K_b = 0,04$ ) та часу напіввивільнення (17 хв), які свідчать, що кінетика вивільнення ІЛ-1Ra йде інтенсивно, так вже після 17 хв вивільнилось більше половини початкової кількості ІЛ-1Ra.

Враховуючи ймовірність впливу різних концентрацій енхансеру назальної адсорбції polysorbate-80 на інтенсивність вивільнення АФІ з назальної форми проведено додаткові біофармацевтичні дослідження за планом однофакторного дисперсійного аналізу з повторними спостереженнями, змінний фактор (А) – різна концентрація polysorbate-80 у досліджуваній назальній формі (А1 – 0%, А2 – 0,5%, А3 – 1%, А4 – 2%, А5 – 3%). У кожній чарунці експерименту по 3 повтори. Параметром оптимізації обрано визначену концентрацію активної речовини у діалізаті (воді очищеній) після 30 хв рівноважного діалізу крізь напівпроникну мембрану – целофанову плівку

«Купрофан» у вертикальних чарунках дифузії Франца дев'ятипозиційній станції (PermeGear, Inc., США).

Наважку виготовлених зразків назальних гелів кількісно внесено до донорних камер чарунок пристрою дифузії Франца. Через встановлений проміжок часу відібрано аліквоту гідролізату з акцепторної камери пристрою дифузії Франца та кількісно визначено концентрацію діючої речовини у діалізаті. Отримано наступні результати (табл. 6.10).

Таблиця 6.10

**Матриця планування та результати дослідження концентрації активної речовини (IL-1Ra) у діалізаті**

С (IL-1Ra) у діалізаті, мг/мл				
A1	A2	A3	A4	A5
0,42	0,5	0,58	0,61	0,61
0,4	0,5	0,55	0,62	0,61
0,4	0,52	0,56	0,63	0,62
0,406±0,0497	0,506±0,0497	0,563±0,0657	0,62±0,0430	0,613±0,0248

Отримані результати підлягали дисперсійному аналізу з метою встановлення можливого впливу фактору А на динаміку вивільнення IL-1Ra з модельних назальних форм. Отримано наступні дані (табл. 6.11).

Таблиця 6.11

**Результати дисперсійного аналізу впливу твіну-80 на вивільнення IL-1Ra**

Джерело мінливості	Сума квадратів (SS)	Число ступенів свободи (f)	Середній квадрат (MS)	F <sub>експ.</sub>	F <sub>табл.</sub>
Фактор А (polysorbate-80)	0,0935	4	0,0233	184,68	3,5
Помилка	0,001	10	0,0001	—	—
Загальна сума	0,0948	14	—	—	—

Як видно з представлених результатів проведеного дисперсійного аналізу  $F_{\text{експ.}} > F_{\text{табл.}}$ , тобто вміст polysorbate-80 чинить значимий вплив на вивільнення антагоністу. Для визначення оптимальної концентрації polysorbate-80, в назальних формах, використано множинний ранговий критерій Дункана, за допомогою якого побудовано ряд преваг:

$$2\% (3\%) > 1\% > 0,5\% > 0\%.$$

Тобто обрана концентрація енансеру адсорбції – 2 % з урахуванням природи активної діючої сполуки, в моделі *in vitro* задовільно вивільняє АФІ з модельної системи.

Враховуючи особливості технологічного процесу, при створенні нової гелевої лікарської форми, необхідно обґрунтувати температурний режим виготовлення основи носія, введення діючої речовини до основи, а також спрогнозувати можливу хімічну взаємодію окремих компонентів в лікарській формі. Тому актуальним є застосування термогравіметричного аналізу в фармацевтичній технології [355-357]. В якості об'єктів термогравіметричних досліджень використовували: напівфабрикат-розчин рецепторного антагоністу інтерлейкіну-1 (IL-1Ra), натрій карбоксиметилцелюлоза, твін-80, D-пантенол, трилон Б, бензалконію хлорид. Для забезпечення відповідного значення рН застосовували фосфатний буферний розчин (рН 6,0), за рецептурою згідно ДФУ 2 вид. Крім окремих компонентів готового назального гелю, готували також назальний гель без IL-1Ra, а також гель з IL-1Ra.

Термографічний аналіз проводили на приладі дериватограф – «Shimadzu DTG-60» (Японія) з платиново-платинородієвою термодією при нагріванні зразків в алюмінієвих тиглях (від 15 до 250 °C). В якості еталонної субстанції використовували  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ . Швидкість нагрівання складала 10 °C за хв. Маса досліджуваних зразків була від 19,22 мг до 52,91 мг. Отримані данні дериватограф графічно фіксував у вигляді кривих T, DTA, TGA. Крива T на дериватограмі показує зміну температури, а крива TGA – зміну маси зразка в період дослідження. Крива DTA відображає диференціювання теплових

ефектів, містить інформацію про ендотермічні та екзотермічні максимуми, може бути використана для якісної оцінки дериватограми.

Дослідження складалось з двох етапів. На першому етапі проводили вивчення дослідних зразків – окремих інгредієнтів готового назального гелю – діючої та допоміжних речовин, а саме: ІІ-1Ra, натрій карбоксиметилцелюлоза, твін-80, D-пантенол, трилон Б, бензалконію хлорид, фосфатний буферний розчин (рН 6.0) (рис. 6.4-6.10). Отримано параметри термогравіметричного аналізу у вигляді графічного зображення – дериватограм.

Дериватограма ІІ-1Ra (рис. 6.4) характеризує сполуку, як досить термолабільну речовину. Втрата маси зразку від початку дослідження до четвертої хв експерименту (48,06 °С) склала 2,14 мг (5,91%), далі спостерігали стрімку динаміку втрати маси зразку. На сьомій хв дослідження маса зменшилась на 10,15 мг (28,02%), потім на одинадцятій хв (86,84 °С) – 20,88 (57,65%) і після тринадцятої хв (126,22 °С) – 33,12 мг (91,44 %). Враховуючи природу напівфабрикату – розчину ІІ-1Ra, втрата маси зразку ймовірно може бути пов'язана з наявністю значної кількості гідрофільної фази в напівфабрикаті.

Дериватограма гелеутворювача натрій карбоксиметилцелюлози (рис. 6.5) висвітлює ендотермічний ефект при температурі близько 76 °С. При цьому, від початку експерименту, спостерігається втрата маси зразку – 1,16 мг (6,04%). Тому, в технологічному процесі виготовлення лікарської форми, потрібно дотримуватись температурного режиму для попередження руйнування сполуки.

Дериватограма сурфактанту твін-80 (рис. 6.6) окреслює незначні теплові ефекти та повільну втрату маси зразку. Втрата маси сурфактанту від початку експерименту до кінця дослідження становила 1,17 мг (3,79 %), що характеризує її як, відносно стабільну та невибагливу, з технологічної точки зору, речовину.

Дериватограма зволожувача D-пантенолу (рис. 6.7) характеризує сполуку, як відносно термостабільну речовину в діапазоні температур від 20 °С до 108 °С. Втрата маси зразку від початку дослідження до восьмої хвилини експерименту (108,44 °С) становила 1,35 мг (2,55%). При температурі вище 139 °С зміна маси зразку склала 4,96 (9,37%).



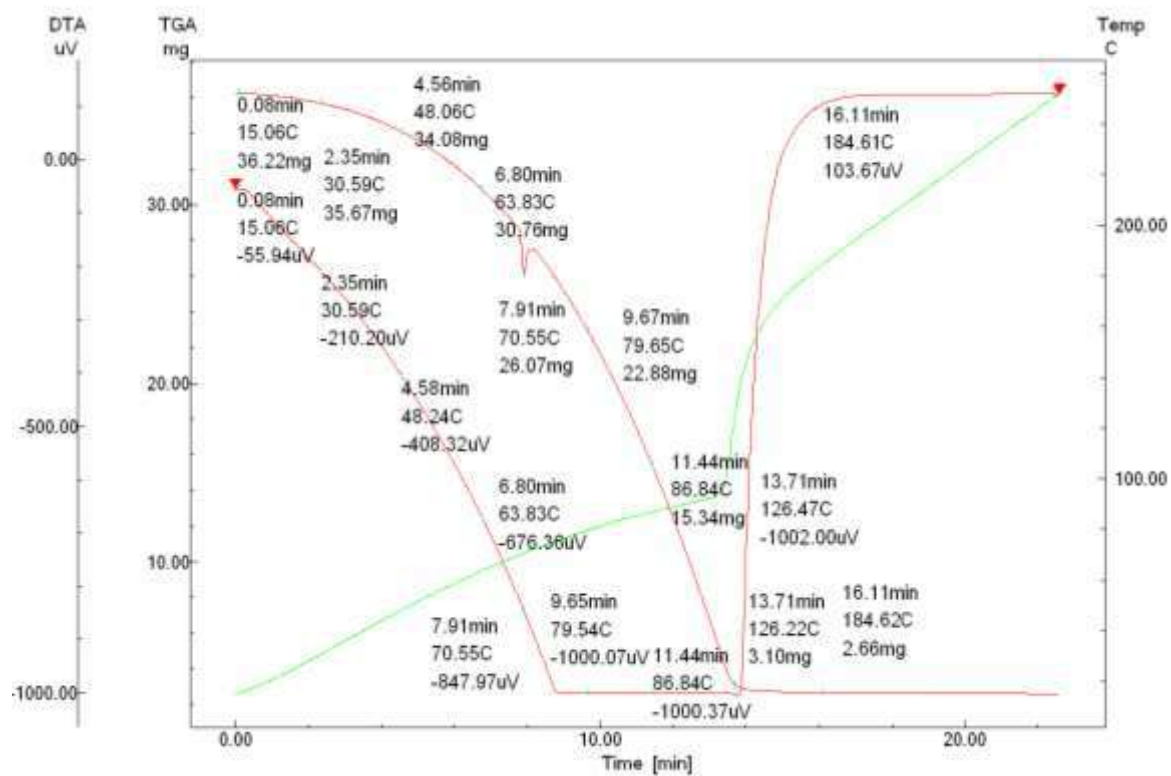


Рис. 6.4 Дериватограма напівфабрикату IL-1Ra

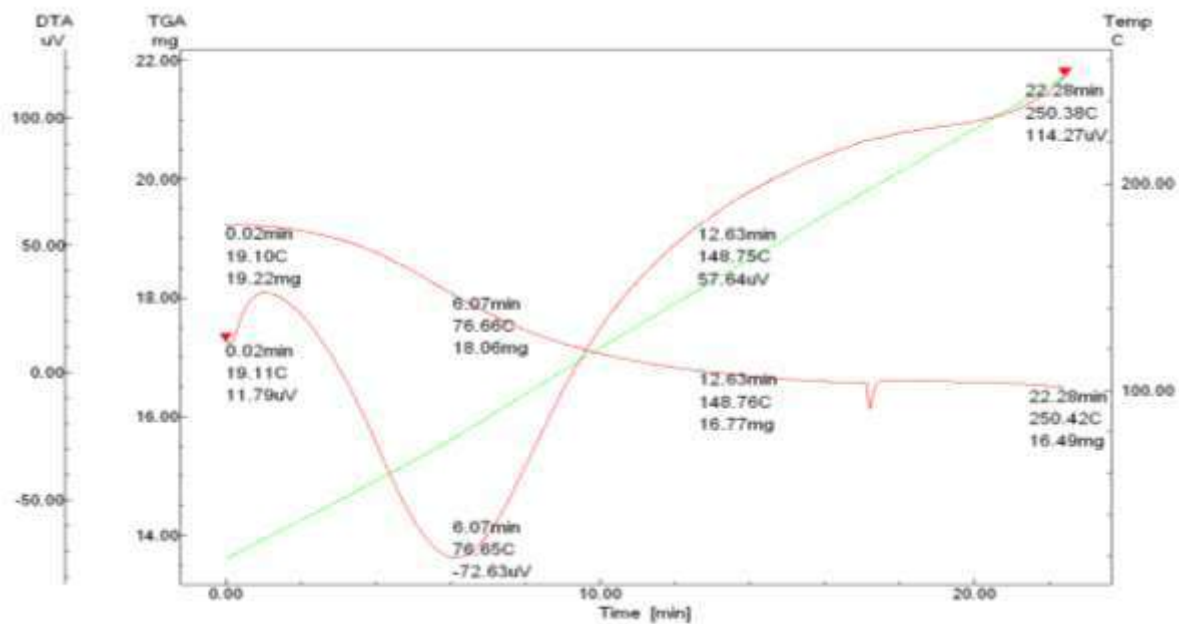


Рис. 6.5. Дериватограма гелетворювача натрій карбоксиметилцелюлози

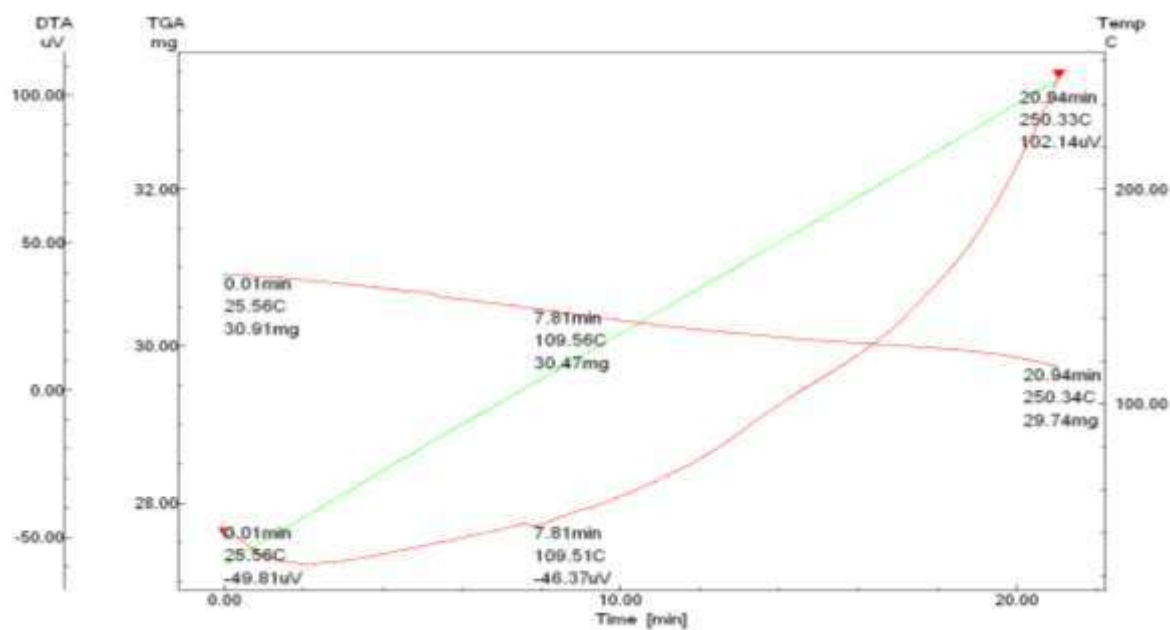


Рис. 6.6. Дериватограма сурфактанту твін-80

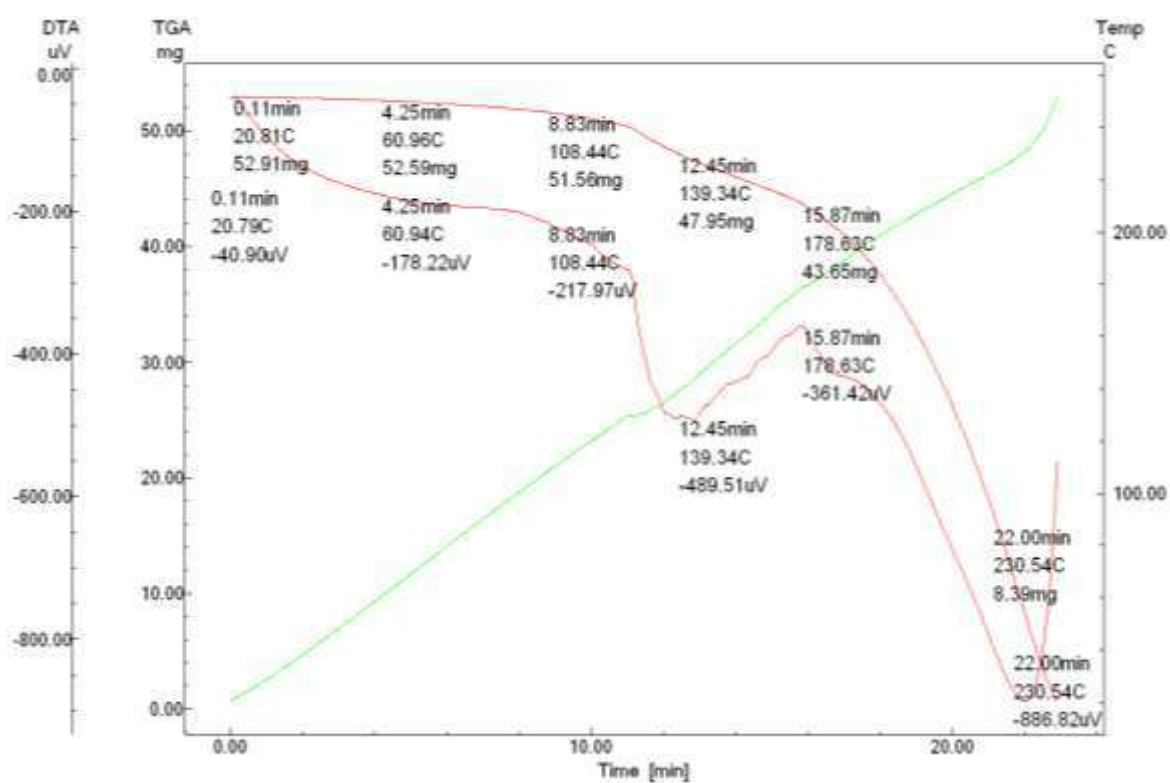


Рис. 6.7. Дериватограма зволожувача D-пантенолу

Дериватограма стабілізатора трилон Б (рис. 6.8) показує слабку динаміку зміни маси до 11-ї хвилини експерименту 134,97 °С. Втрата маси зразку від початку дослідження склала всього 0,32 мг (1,13%). Після 11-ї хв спостерігали більш інтенсивне зменшення маси зразку, яка становила при 185, 95 °С – 1,95 мг (6,9%). При цьому спостерігався також ендотермічний ефект (-183,30 uV), який ймовірно характеризує температуру плавлення сполуки.

Дериватограма консерванту бензалконію хлориду (рис. 6.9) дозволяє характеризувати речовину, як термолабільну. Спостерігається постійна втрата маси зразку в процесі експерименту. На 5-й хвилині експерименту, при температурі 60,01 °С, маса дослідного зразку змінилась на 2,84 мг (7,31%), а на майже 10-й хвилині при температурі 101, 75 °С – зміна маси склала – 9,23 мг (23,75%). Довідкові дані літератури про температуру плавлення бензалконію хлориду корелюють з отриманими результатами, тобто можна зробити припущення, що технологія виготовлення лікарської форми повинна враховувати мінімальне нагрівання, з метою попередження руйнування консерванту.

Дериватограма фосфатного буферного розчину (рис. 6.10) очікувано показує поступову зміну маси зразку при нагріванні, що, ймовірно, пов'язано з випаровуванням водної фази. На 5-й хвилині експерименту, при температурі 62,23 °С, зміна маси зразку склала 5,33 мг (12,49%), а на 11-й хвилині при температурі 88,35 °С втрата маси становила 26,05 мг (60,95%). Далі маса зразку стрімко зменшувалась, на 13-й хвилині при температурі 129,88 °С зміна становила 40,66 мг (95,13%).

На другому етапі готували зразки назальних гелів: назальний гель з необхідною кількістю допоміжних речовин, крім діючої речовини – IL-1Ra, а також назальний гель, який містив IL-1Ra та необхідну кількість допоміжних речовин. Отримали наступні дериватограми (рис. 6.11-6.12).

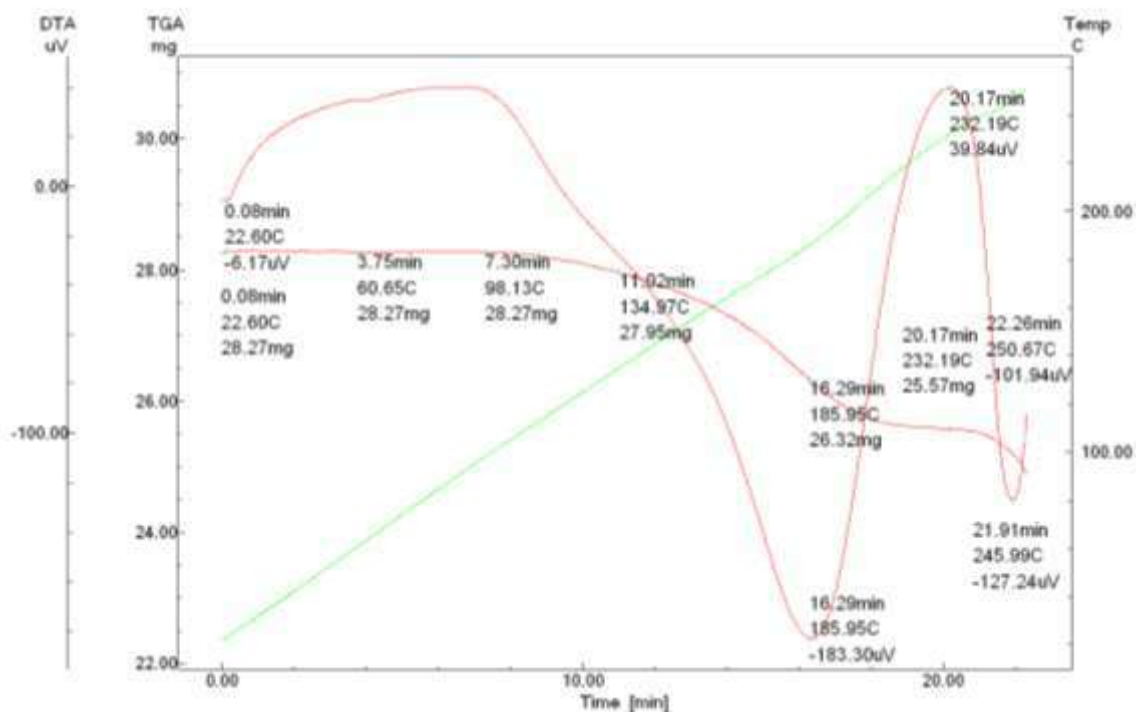


Рис. 6.8. Дериватограма стабілізатора трилон Б

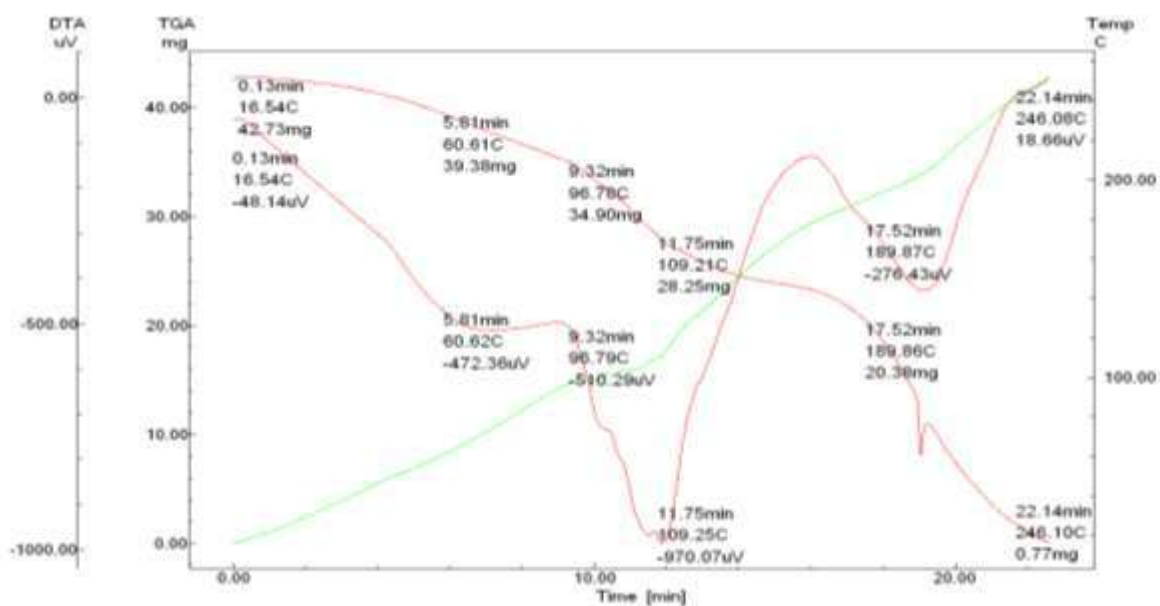


Рис 6.9. Дериватограма консерванту бензалконію хлориду

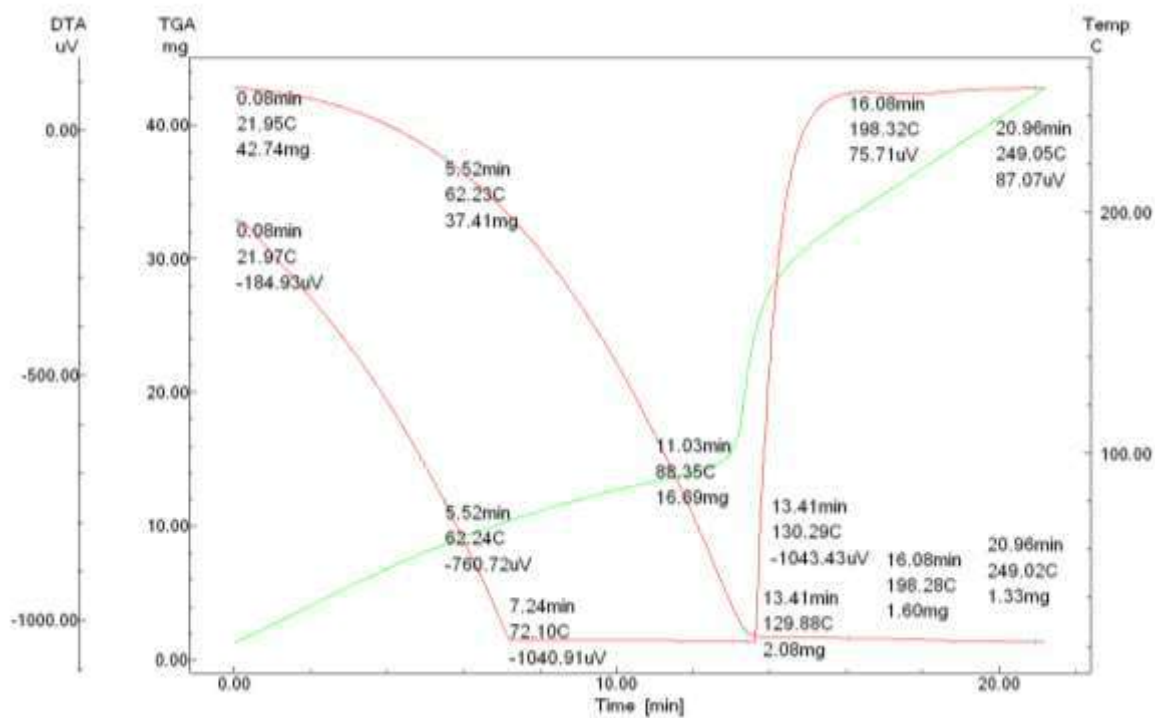


Рис. 6.10. Дериватограмма фосфатного буферного розчину 6.0

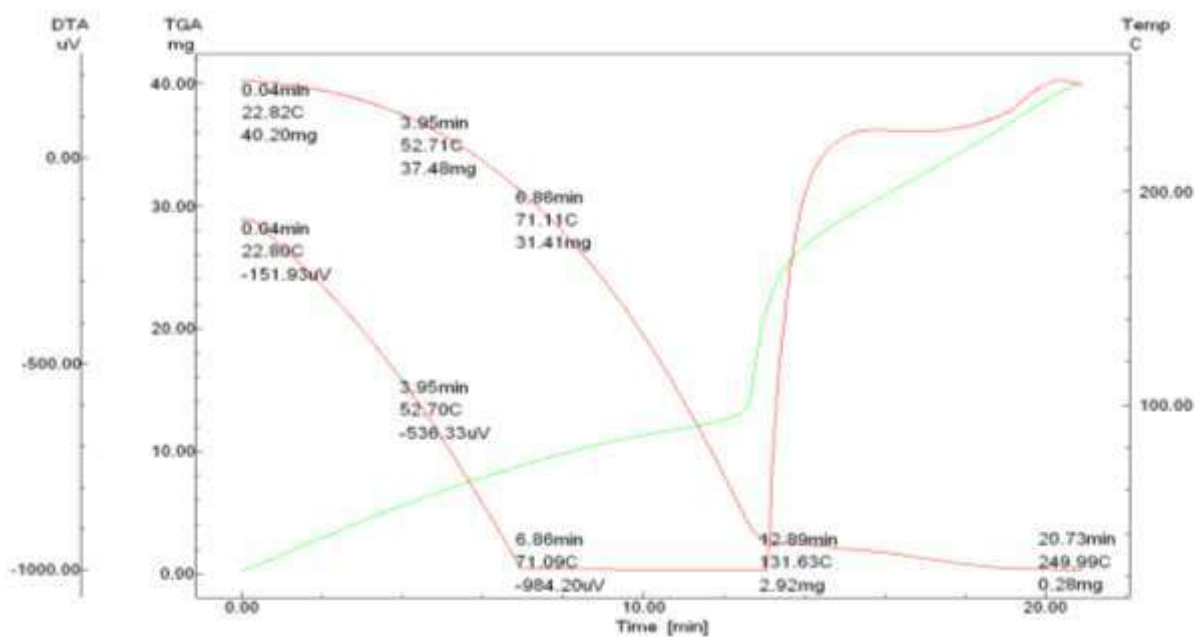


Рис. 6.11. Дериватограмма назального гелю без IL-1Ra

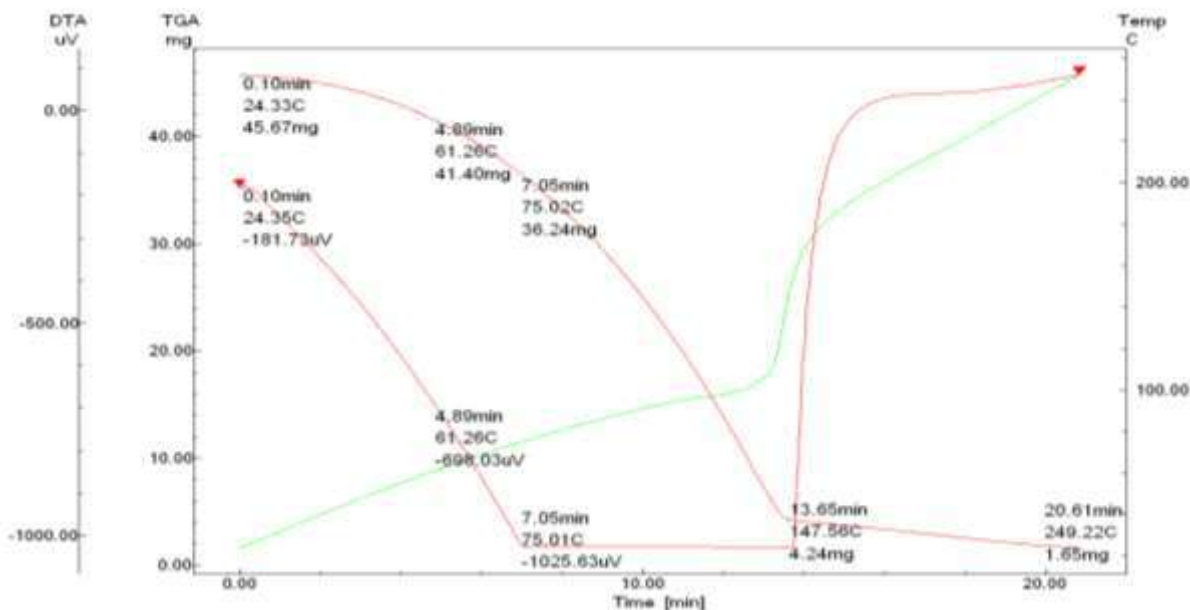


Рис. 6.12. Дериватограма назального гелю з ІЛ-1Ra

Порівнюючи дериватограму назального гелю, в складі якого відсутня активна сполука - ІЛ-1Ra (рис. 6.11) та дериватограму з назального гелю з ІЛ-1Ra (рис. 6.12), виявили, що зазначені зразки характеризуються подібним профілем динаміки зміни маси та характером теплових ефектів. Наприклад, у дериватограми з ІЛ-1Ra спостерігається постійна втрата маси дослідного зразку. Так на 4-й хвилині, від початку експерименту, при температурі 61,26 °С зміна маси склала 4,27 мг (9,35%), на 7-й хвилині 9,43 мг (20,65%), а потім на 13-й хвилині при температурі 147,56 °С 41,43 мг (90,72%). Ймовірно втрата маси зразку обумовлена наявністю великої кількості водної фази в рецептурі назального гелю з ІЛ-1Ra. Характер наявних теплових ефектів на дериватограмі гелю з ІЛ-1Ra співпадають з тепловими ефектами окремих допоміжних компонентів гелевої основи, що, в свою чергу, підтверджує відсутність взаємодії компонентів між собою.

6.1.4 Реологічні дослідження назального гелю з рецепторним антагоністом інтерлейкіна-1 $\beta$  (ІЛ-1Ra). Враховуючи ймовірність впливу різних концентрацій енхансеру назальної адсорбції polysorbate-80 на консистентні властивості АФІ з назальної форми – актуальним є проведення реологічних досліджень.

Перед початком запланованих реологічних досліджень виготовляли зразки інтраназальних гелів з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$  та інших компонентів. Зразки відрізнялись між собою різною концентрацією polysorbate-80 (фактор А). Отримані гелі залишали на добу в прохолодному місці при температурі 2-8 °С з метою стабілізації структури гелю та нівелювання температури зовнішнього середовища на структурно-механічні властивості.

На наступному етапі проводили реологічні дослідження дослідних зразків назальних гелів з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$ . Отримали реограми плинину в координатах залежності напруги зсуву від швидкості зсуву, які мають висхідні та низхідні криві з нелінійним характером течії, та петлями гістерезису (рис. 6.13). Висхідні криві характеризують реологічні властивості зразків при збільшенні швидкості обертання. Низхідні криві відображають реологічні властивості при зменшенні швидкості обертання.

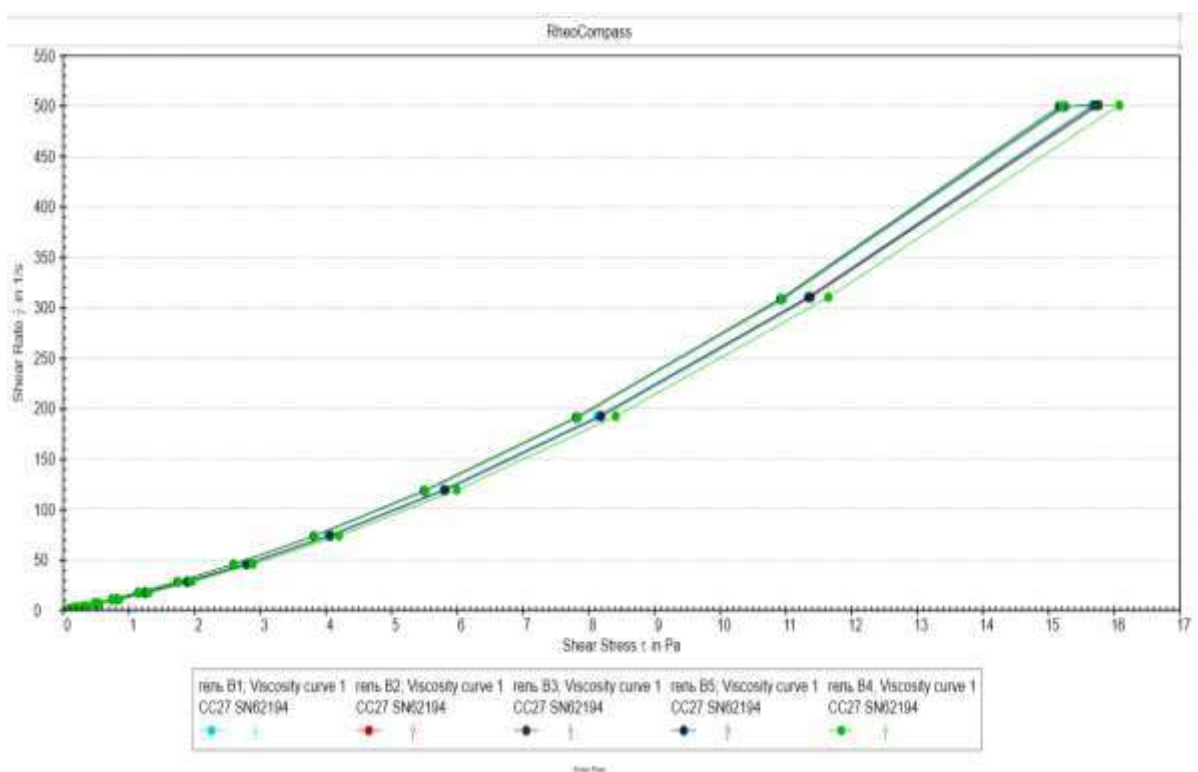


Рис. 6.13. Реограми плинину назальних гелів з ІЛ-1Ra (гель В1 (фактор А1), гель В2 (фактор А2), гель В3 (фактор А3), гель В4 (фактор А4), гель В5 (фактор А5))

Згідно отриманих даних реограм, петлі гістерезису свідчать про наявність тиксотропних властивостей, тобто можливість відновлення систем після прикладеної напруги, наприклад, у промисловому виробництві після технологічних процесів перемішування, гомогенізації та пакування. Характер отриманих кривих характеризує назальні зразки, як неньютонівські рідини з низькими показниками в'язкості, у яких тривала механічна обробка суттєво не впливає на якість. Реологічні характеристики дослідних гелів свідчать про недоцільність використання упаковки у вигляді туб, у зв'язку можливим швидким витіканням препарату при застосуванні.

Проводили вивчення впливу фактору А на характеристику реологічних показників назальних лікарських форм. В якості параметру оптимізації експерименту обрали площу петлі гістерезису (Pa/s) (табл. 6.12).

Таблиця 6.12

### Результати дисперсійного аналізу експерименту

Джерело мінливості	Сума квадратів (SS)	Число ступенів свободи (f)	Середній квадрат (MS)	F <sub>експ.</sub>	F <sub>табл.</sub>
Фактор А (polysorbate-80)	2,2666	4	0,5666	0,62832	3,5
Помилка	9,0186	10	0,9018	—	—
Загальна сума	11,2853	14	—	—	—

Відповідно до отриманих даних однофакторного дисперсійного аналізу встановили, що фактор А в даній рецептурі ( $F_{\text{експ.}} < F_{\text{табл.}}$ ) достовірно не впливає на структурно-механічні (тиксотропні) властивості.

На наступному етапі, з метою всебічної оцінки реологічних характеристик розробленого назального гелю з ІЛ-1Ra, досліди проводили при різних температурах  $29 \pm 0,5$  °C,  $33 \pm 0,5$  °C,  $37 \pm 0,5$  °C. Отримали реограми плинуну назального гелю з ІЛ-1Ra (рис. 6.14) та реограми в'язкості назального гелю з ІЛ-1Ra (рис. 6.15).



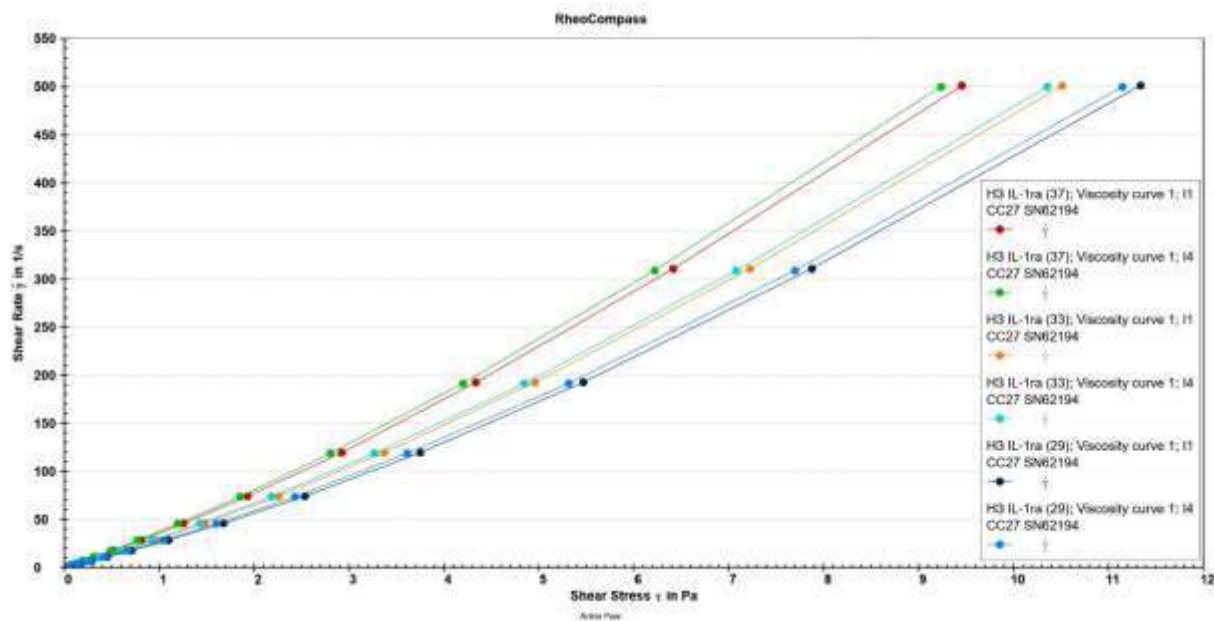


Рис. 6.14. Реограми плинун назального гелю з ІЛ-1Ра в діапазоні температур 29-37 °С

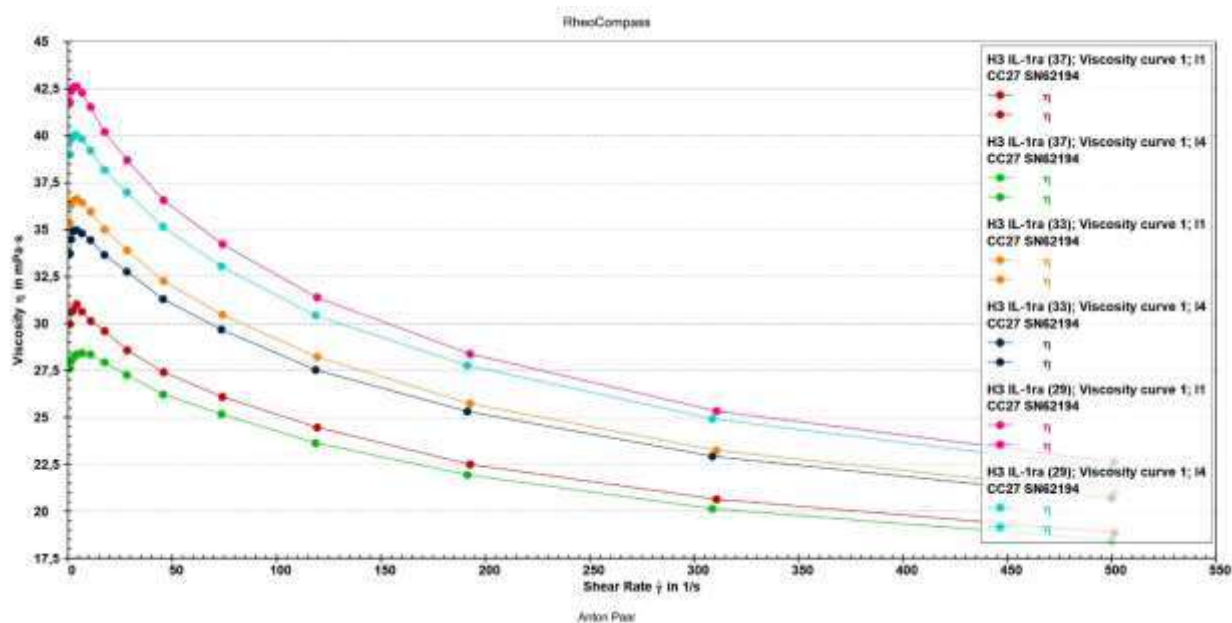


Рис. 6.15. Реограми в'язкості назального гелю з ІЛ-1Ра в діапазоні температур 29-37 °С

Отримані реологічні характеристики назального гелю з ІЛ-1Ра окреслюють наявність у досліджуваного препарату нен'ютонівського типу течії з деякими тиксотропними властивостями, тобто розроблений гель може відновлювати свою структуру після прикладеного зусилля.

Характер реограм течії та в'язкості назального засобу свідчить про рідку консистенцію препарату з низьким порогом течії. Підвищення температури очікувано змінює реологічні характеристики назального гелю з ІЛ-1Ra. Так при температурі 29 °С початкова в'язкість зразку становила 42,5 mPa·s, збільшення температури до 33 °С призводило до зменшення початкової в'язкості до 36 mPa·s, а вже при 37 °С початкова в'язкість становила 32 mPa·s. Враховуючи отримані дані можливо припустити, що розроблений гель матиме різну в'язкість при зміні температури в назальній порожнині. Швидкість течії досліджуваного гелю в порожнині носа також матиме мінливий характер та залежатиме від температурного фактору.

6.1.5 Технологія виготовлення назального гелю в умовах промислового виробництва. За результатами попередніх досліджень обрано склад назального гелю з антагоністом інтерлейкіну 1 $\beta$  (ІЛ-1Ra) (рис. 6.13).

Таблиця 6.13

#### Рецептура назальної композиції з ІЛ-1Ra

Найменування	Кількість
Напівфабрикат-розчин ІЛ-1Ra	10 мл
Натрій КМЦ	0,3
Д-пантенол	5,0
Бензалконію хлорид	0,02
Трилон Б	0,012
Твін-80	2,0
Динатрію гідрофосфат	4,52
Кислота лимонна	0,77
Вода очищена	до 100

Опрацювання технології виготовлення назального рідкого гелю з ІЛ-1Ra, в умовах промислового виробництва, обумовлює розробку технологічної та апаратурної схеми, вивчення параметрів технологічного процесу, температурного та часового режиму, контрольних точок тощо. Попередніми дослідженнями, до

складу рецептури, додано термолабільні сполуки, мукоадгезивний компонент (гелеутворювач), який при певних умовах може призводити до погіршення однорідності виготовленої ЛФ. Технологічні операції з такими допоміжними та діючими речовинами потрібно додатково враховувати в контрольних точках виробництва. У складі препарату застосовують фосфатний буфер рН 6,0 (ДФУ 2 вид., 4002400 складу: 63,2 мл розчину 71,5 г/л динатрію фосфату і 36,8 мл 21 г/л кислоти лимонної).

За результатами досліджень фармацевтичної розробки розроблено проект технологічного промислового регламенту на виробництво назального гелю з антагоністом інтерлейкіну $1-\beta$ , який апробовано ТОВ «Мобіль медікал» в умовах промислового виробництва. Блок-схема технологічного процесу виготовлення інтраназальної форми з ІЛ-1Ra наведена на рис. 6.16, яка включає наступні технологічні стадії та операції.

#### ДР.1. Санітарна підготовка виробництва

Обладнання повинно бути розташоване таким чином, щоб до нього був забезпечений вільний доступ. При розташуванні обладнання не можна залишати важкодоступні для прибирання ділянки, в яких може накопичуватися сміття та пил. Поверхня обладнання повинна легко очищуватися. Необхідно суворо обмежувати вхід стороннім в виробниче приміщення, а також обмежувати пересування персоналу. Перед початком роботи працівники одягають технологічний одяг і індивідуальні засоби захисту. Періодичність профілактичних, санітарно-гігієнічних заходів, а також миття технологічного обладнання проводиться у відповідності з узгодженим графіком. Стадія також включає підготовку дезинфікуючих та миючих розчинів. Підготовка виробничих приміщень, обладнання містить заходи їх очищення миючим розчином та розчином для дезінфекції. Після очистки обладнання промивають п'ятикратною кількістю води очищеної.

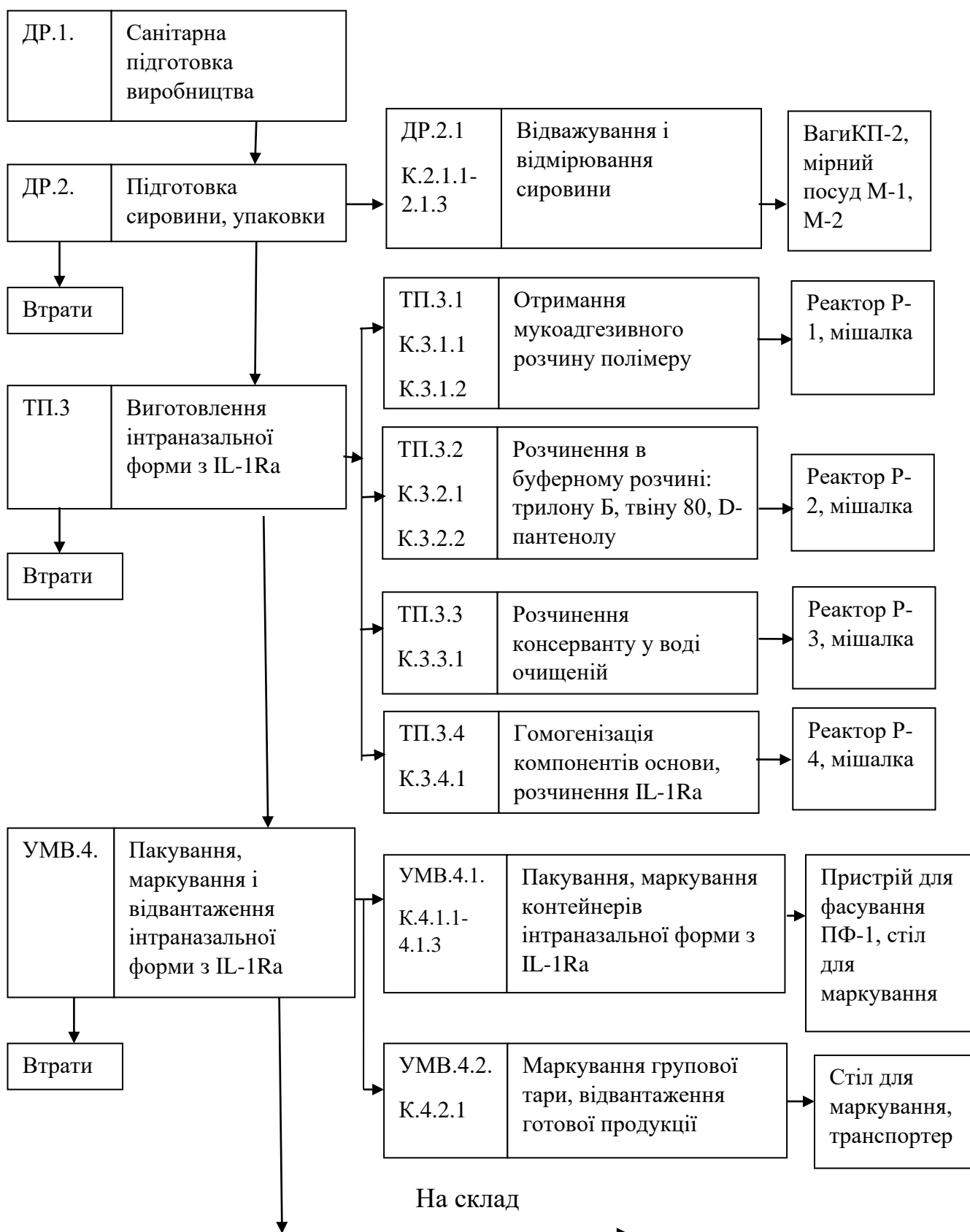


Рис. 6.16. Блок-схема технологічного процесу виготовлення інтраназальної форми з ІЛ-1Ра

Підготовку повітря виробничих приміщень здійснюють на припливній вентиляційній системі, яка містить систему трьохступеневої очистки і кондиціонування повітря (фільтри). Повітря повинно мати відносну вологість не більше 60%, та температуру не більше  $23 \pm 2$  °С.

#### ДР.2. Підготовка сировини, упаковки

Всі інгредієнти і пакувальні матеріали повинні надходити на підприємство в тарі і упаковці згідно відповідної нормативної документації (НД), відповідати вимогам діючої НД, а також мати сертифікати якості. При отриманні скляних флаконів, проводять їх мийку, обробку миючим засобом та сушку. Підготовку води очищеної здійснюють за допомогою системи виробництва води очищеної.

#### ДР.2.1. Відважування і відмірювання сировини

Сировина зі складу підприємства надходить в тарі постачальника на вантажних візках в цех. Перед початком роботи майстер цеху з апаратчиком переконуються в наявності етикетки на упаковці сировини, а також в наявності аналітичного листка на дану серію. На товарних вагах в рамку вставляють етикетку на якій вказують назву виробу і сировини, номер серії, підпис відповідальної особи. На товарні ваги ставлять таровану ємкість, в яку завантажують П-1Ra (К.2.1.1). Рецептурні кількості води очищеної з урахуванням густини в проміжній ємкості (К.2.1.1-2.1.3). Відміряні і відважені порції сировини перевозять або переносять для завантаження реакторів-змішувачів (стадія ТП.3). Мірний посуд і ваги повинні бути повірені відповідним чином в територіальному державному центрі стандартизації, метрології, сертифікації.

#### ТП.3. Приготування інтраназальної форми з П-1Ra

Стадія виготовлення складається з чотирьох операцій: ТП.3.1, ТП.3.2., ТП.3.3., ТП. 3.4.

ТП.3.1.Отримання мукоадгезивного розчину полімеру. У реакторі-змішувачі Р-1, з малообертовою мішалкою (до 80 об/хв) і підігрівом, поміщають частину води очищеної та додають відважену кількість натрій КМЦ, залишають для набрякання, потім нагрівають і перемішують до повного розчинення

полімеру (К.3.1.1- К.3.1.2). На реактор, в рамку вставляють етикетку, на якій вказують: назву препарату, номер серії, час завантаження, дату, час початку і кінця операції, підпис відповідальної особи.

ТП.3.2.Розчинення в буферному розчині: трилону Б, твіну 80, Д-пантенолу. До реактора-змішувача Р-2, з малообертовою мішалкою (до 80 об/хв) і підігрівом вносять частину води очищеної та розчиняють динатрію гідрофосфат, кислоту лимонну, трилон Б, Д-пантенол і твін-80. Фільтрують. Контролюють рН (К.3.2.1- К.3.2.2). На реактор, в рамку вставляють етикетку, на якій вказують: назву препарату, номер серії, час завантаження, дату, час початку і кінця операції, підпис відповідальної особи.

ТП.3.3.Розчинення консерванту у воді очищеній. До реактора-змішувача Р-3, з малообертовою мішалкою (до 80 об/хв) і підігрівом вносять частину води очищеної, розчиняють бензалконію хлорид, фільтрують (К.3.3.1). На реактор, в рамку вставляють етикетку, на якій вказують: назву препарату, номер серії, час завантаження, дату, час початку і кінця операції, підпис відповідальної особи.

ТП. 3.4. Гомогенізація компонентів основи, розчинення ІІ-1Ra. У реактор змішувач Р-4 по трубопроводах транспортують вміст реакторів Р1-Р3. Вміст реактора перемішують за допомогою мішалки на тихому ході, додають відмірену кількість напівфабрикату-розчину ІІ-1Ra і перемішують до утворення однорідного розчину.

Після завершення процесу хімік відділу контролю якості бере зразок на аналіз по п. 1-4 таблиці. При позитивних результатах аналізу – вміст реактору надходить на стадію УМВ.4. (К.4.1.1)

УМВ.4 Упаковка, маркування і відвантаження інтраназальної форми з бішофітом

Стадія упаковки, маркування і відвантаження готової продукції складається з таких операцій:

УМВ.4.1. Фасування, упаковка, маркування контейнерів інтраназальної форми з ІІ-1Ra

УМВ.4.2. Маркування групової тари, відвантаження готової продукції

УМВ.4.1. Фасування, упаковка, маркування контейнерів інтраназальної форми з ІЛ-1Ra

Операцію починають після отримання позитивного рішення з відділу контролю якості про відповідність зовнішнього виду, кольору, запаху, рН, масової частки води та летких речовин вмісту реактора вимогам специфікації.

Фасування виробу здійснюють за ГОСТ 288303 в тару, дозволена Міністерством охорони здоров'я України, яка забезпечує збереження продукції масою нетто до 10 г, за допомогою фасувального пристрою будь-якої моделі, яка зможе забезпечувати наступні відхилення по масі нетто:

при масі:

до 15 г – мінус 7%;

від 15 г і вище –  $\pm 5\%$  від маси, вказаної на тарі.

Під час проведення операції проводиться візуальний контроль чистоти виробів, перевірка цілісності тари і її герметичності. Відбраковані контейнери і кришки утилізують (К.4.1.1).

В процесі роботи періодично проводять контроль маси нетто вмісту контейнерів. При невідповідності фактичної маси нетто вимогам НД проводять регулювання фасувального пристрою (К.4.1.1).

Заповнені виробом контейнери передають на стіл маркувальний для наклеювання на них етикеток. Наклеювання етикеток також може здійснюватися за допомогою машини етикетувальної.

На кожній одиниці споживчої тари виробу вказують:

- найменування виробу;
- склад;
- діючі технічні умови;
- найменування підприємства-виробника і його місцезнаходження;
- місяць і рік виготовлення;
- масу нетто;
- спосіб застосування;
- умови зберігання;

- термін придатності;
- штрих-код по ДСТУ 3145 і ДСТУ 3146.

Заповнені контейнери упаковують в групову тару (К.4.1.3).

В процесі роботи періодично проводять контроль тексту маркування на етикетці упаковки, правильність упаковки групової тари.

Заповнена групова тара по транспортеру або вручну переноситься на відвантаження готової продукції.

#### УМВ.4.2. Маркування групової тари, відвантаження готової продукції

Маркування групової тари проводять на столі маркувальному.

На груповій тарі вказується:

- найменування продукції;
- діючі технічні умови;
- найменування підприємства-виробника і його місцезнаходження;
- кількість одиниць продукції, які знаходяться в груповій тарі;
- місяць і рік виготовлення;
- маніпуляційні знаки за ГОСТ 14192:
  - «Обмеження температури»;
  - «Верх»;
  - «Крихке. Обережно» (при використанні скляної тари для упаковки);
  - «Берегти від попадання прямих сонячних променів».

В процесі здійснення операції контролер відділу контролю якості перевіряє текст маркування на етикетці групової упаковки (К.4.2.1).

При відповідності вищевказаних параметрів продукції, її передають на склад готової продукції за допомогою вантажних каталок.

Засіб повинен зберігатися на складах виробника (споживача) в захищеному від світла місці і транспортуватися при температурі не нижче 2 °С.

Контрольні параметри технологічного процесу виробництва інтраназальної форми з IL-1Ra наведені в табл. 6.14.



Таблиця 6.14

**Контрольні параметри технологічного процесу виробництва  
інтраназальної форми з ІЛ-1Ra**

Номер контрольної точки (найменування стадії)	Об'єкт контролю та показник контролю	Місце контролю
1	2	3
ДР.1. Санітарна підготовка виробництва	В відповідності с ТхР 64-XXXXXXXX-00X-2021	
ДР.2.1. Відважування і відмірювання сировини	К.2.1.1 – рецептурна маса ІЛ-1Ra	Фізичний, ваги КП-1
	К.2.1.2 – рецептурна маса води очищеної	Фізичний, ваги КП-1
	К.2.1.3 – рецептурна маса консерванту, буферного розчину: трилону Б, твіну 80, D-пантенолу	Фізичний, ваги КП-1
ТП.3. Приготування інтраназальної форми з ІЛ-1Ra	К.3.1.1 – рецептурні кількості мукоадгезивного полімеру, води очищеної	Фізичний, реактор № 1
	К.3.1.2 – повнота набухання полімеру	Фізичний, реактор № 1
	К.3.2.1 – рецептурні кількості буферного розчину, трилону Б, твіну 80, D-пантенолу. Повнота розчинення.	Фізичний, реактор № 2
	К.3.2.2 – рН суміші буферного розчину та трилону Б, твіну 80, D-пантенолу	Фізичний, реактор № 2, рН метр
	К.3.3.1 – рецептурні кількості води очищеної та бензалконію хлориду. Повнота розчинення.	Фізичний, реактор № 3, термометр
	К.3.4.1 – вміст реакторів Р1-Р3, однорідність змішування. Рецептурна кількість ІЛ-1Ra.	Фізичний, реактор № 4
	якість напівфабрикату:	

Продовж. табл. 6.14

1	2	3
	К.3.4.2 – зовнішній вигляд, колір	ДФУ І вид.
	К.3.4.3 – рН	ДФУ І вид.
	К.3.4.4 – Однорідність	ДФУ І вид.
	К.3.4.5 – Однорідність дозованих одиниць	ДФУ І вид.
	К.3.4.6 – масова частка ІL-1Ra, %	ДФУ І вид. МКЯ
	– загальна кількість мікроорганізмів (мезофільних аеробних, та факультативно анаеробних), КОЕ/г.	ДФУ І вид. (2.6.12; 2.6.13), ДСТУ 3438, ДСТУ 3031-3034
	– кількість дріжджів та пліснявих грибів, КОЕ/г	ДФУ І вид. (2.6.12; 2.6.13), ДСТУ 3438, ДСТУ 3031-3034
	– вміст <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г гелю	ДФУ І вид. (2.6.12; 2.6.13), ДСТУ 3438, ДСТУ 3031-3034
	– вміст <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г гелю	ДФУ І вид. (2.6.12; 2.6.13), ДСТУ 3438, ДСТУ 3031-3034
	– вміст <i>Enterobacteriaceae</i> в 1 г гелю	ДФУ І вид. (2.6.12; 2.6.13), ДСТУ 3438, ДСТУ 3031-3034
УМВ.4.1. Упаковка, маркування і відвантаження інтраназальної форми з ІL-1Ra	К.4.1.1 – пристрій для фасування ПФ-1, тара. Метод контролю фізичний	тара мірна М-3
	К.4.1.2 – герметичність тари	Візуально
	К.4.1.3 – кількість контейнерів в груповій тарі	Візуально
УМВ.4.2. Маркування групової тари, відвантаження готової продукції	К.4.2.1 – контроль тексту маркування групової тари	Візуально

Дотримання технології та умов виготовлення інтраназальної форми з ІЛ-1Ra сприятиме забезпеченню його задовільних споживчих та фармакотерапевтичних властивостей.

6.1.6 Опрацювання специфікації якості та дослідження стабільності назального гелю з ІЛ-1Ra. Розробка специфікації якості, на розроблену лікарську форму, ґрунтується на науково-обґрунтованій доцільності тесту та відповідних вимогах нормативних документів – ДФУ, настанов якості та інших. Враховуючи наявність в ДФУ характеристик видів назальних форм – назальні порошки, назальні промивки, назальні краплі та спреї, назальні м'які лікарські засоби та назальні палички, вподальшому, обрано за основу, методи контролю характерні для виду назальної лікарської форми – назальні м'які засоби (гелі).

Розроблено специфікацію на створений назальний гель з ІЛ-1Ra (табл. 6.15).

Таблиця 6.15

### Специфікація на інтраназальний гель з ІЛ-1Ra

Показник	Допустимі норми	Методи контролю
1	2	3
Опис	Прозорий, або з наявністю незначної опалесценції рідкий гель, без запаху	МКЯ, п. 1, ДФУ, ст. «Назальні м'які лікарські засоби»
Ідентифікація		
ІЛ-1Ra	Ультрафіолетовий спектр препарату має максимум поглинання при 280 нм	МКЯ, п. 2
pH	6,0-6,5	МКЯ, п. 3, ДФУ 2.0, 2.2.3.
Однорідність	Гель повинен бути однорідним. У трьох з чотирьох проб не має бути видимих частинок	МКЯ, п. 4, ДФУ, 2.9.40
Маса вмісту флакона	Не менше номінальної	МКЯ, п. 5

Продовж. табл. 6.15

1	2	3
Мікробіологічна чистота	Загальне число аеробних мікроорганізмів не більше: (ТАМС) – $10^2$ КУО/г. Загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) – $10^1$ КУО/г. Відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г. Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г.	МКЯ, п. 6, ДФУ, 2.6.12, 2.6.31
Кількісне визначення		
П-1Ra (перерахунок на суху речовину)	Має бути від 0,45 до 0,5%	МКЯ, п. 7
Упаковка	По 10 мл у скляні флакони, закриті гумовою пробкою під алюмінієву обкатку	
Маркування	Згідно з оригінал-макетом упаковки	
Зберігання	Зберігають у прохолодному (2-8 °С), захищеному від світла місці.	
Термін придатності	При температурі 2-8°С – 24 місяців. Після розкриття флакону, 1 місяць за температури 2-8°С.	

Вподальшому, три серії назального гелю з П-1Ra зберігали протягом визначеного часу та визначали показники їх якості. Вивчення динаміки мінливості запропонованих характеристик якості розробленого назального гелю, для експериментального підтвердження стабільності лікарської форми наведено в табл. 6.16.

Наведені експериментальні дані (табл. 6.16), трьох дослідних серій назального гелю з П-1Ra висвітлюють слабку динаміку зміни показників якості протягом 24 місяців зберігання. Зміна кількісного вмісту АФІ в назальній формі була не більше 1,4%, рН не більше 1,2 %, мікробіологічна чистота не більше 10%, що відповідає граничним значенням показників якості специфікації на розроблену лікарську форму та дозволяє прогнозувати термін придатності при температурі 2-8°С – 24 місяці.

Таблиця 6.16

## Результати аналізу назального гелю з ІЛ-1Ra в процесі зберігання

Серія	Термін	Найменування показника / результат аналізу					
		Опис	pH	Однорідність	Маса вмісту фл.	Мікробіологічна чистота	Кільк. визначення, %
Початок		Прозорий рідкий гель, без запаху	6,32±0,01	однор.	9,98±0,01	бактерій –0; гриби –відсутні; Escherichia coli, Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus в 1 г відсутні	0,493±0,003
010120	1 місяць	«-/-»	6,31±0,03	«-/-»	9,98±0,01	бактерій – 0; «-/-»	0,495±0,005
	6 місяців	«-/-»	6,30±0,03	«-/-»	9,97±0,01	бактерій – 0; «-/-»	0,487±0,006
	12 місяців	«-/-»	6,26±0,07	«-/-»	9,97±0,01	бактерій – 10; «-/-»	0,488±0,005
	24 місяці	«-/-»	6,27±0,06	«-/-»	9,98±0,01	бактерій – 10; «-/-»	0,487±0,005
020120	1 місяць	«-/-»	6,28±0,06	«-/-»	9,97±0,01	бактерій – 0; «-/-»	0,491±0,005
	6 місяців	«-/-»	6,29±0,03	«-/-»	9,96±0,01	бактерій – 0; «-/-»	0,491±0,005
	12 місяців	«-/-»	6,27±0,06	«-/-»	9,96±0,01	бактерій – 10; «-/-»	0,488±0,007
	24 місяці	«-/-»	6,26±0,06	«-/-»	9,96±0,02	бактерій – 10; «-/-»	0,487±0,008
030120	1 місяць	«-/-»	6,30±0,04	«-/-»	9,98±0,01	бактерій – 0; «-/-»	0,493±0,008
	6 місяців	«-/-»	6,28±0,069	«-/-»	9,97±0,01	бактерій – 0; «-/-»	0,488±0,008
	12 місяців	«-/-»	6,29±0,06	«-/-»	9,96±0,01	бактерій – 10; «-/-»	0,487±0,009
	24 місяці	«-/-»	6,24±0,08	«-/-»	9,96±0,01	бактерій – 10; «-/-»	0,486±0,009

За матеріалами розділу опубліковано праці [214, 366, 374-378].

## ВИСНОВКИ

1. Проведено вибір допоміжних речовин для рідкого інтраназального гелю з рецепторним антагоністом інтерелейкіну-1 (IL-1Ra). Встановлено, що вид мукоадгезивних полімерів та спиртів для зволоження слизової оболонки чинять значущий вплив на вивільнення активного фармацевтичного інгредієнту з назальних лікарських форм. В результаті досліджень виявлено, що оптимальне вивільнення IL-1Ra з назальних композицій забезпечують допоміжні речовини – гідрофільний мукоадгезивний компонент натрій карбоксиметилцелюлоза з додаванням спирту-зволожувача D-пантенолу.

2. Проведеними фармако-технологічними дослідженнями щодо оптимізації складу назального засобу з IL-1Ra встановлено, що розроблений назальний засіб з IL-1Ra потребує додавання стабілізаторів до складу рецептури. Виявлено, що застосування в якості стабілізаторів: фосфатного буферного розчину 6.0 та трилону Б, забезпечує належне вивільнення діючої речовини з лікарської форми та корегує стабільність водневого показника протягом тривалого часу.

3. Отримані результати показників кінетики свідчать, що вивільнення IL-1Ra з назальної форми підпорядковується рівнянню першого порядку.

4. Проведені термогравіметричні дослідження окремих компонентів назального гелю з IL-1Ra, а також назальні гелі з діючою речовиною, та без діючої речовини. Встановлено, що технологічний процес виготовлення гелю з IL-1Ra доцільно проводити з урахуванням термолабільних сполук. Спочатку потрібно приготувати основу без консерванту та IL-1Ra. Потім при температурі не вище 40 °C розчинити консервант, а потім при охолодженні до 20 °C додати IL-1Ra. Виявлено, що розроблена лікарська форма з гелю з IL-1Ra є сумішшю діючих та допоміжних речовин, інгредієнти яких не взаємодіють між собою, та можуть поєднуватися в одній лікарській формі.

5. Проведені дослідження щодо вивчення впливу polysorbate-80 на біофармацевтичні та реологічні властивості назальної лікарської форми з IL-1Ra. В результаті біофармацевтичних досліджень встановлено, що polysorbate-80 достовірно впливає на інтенсивність вивільнення IL-1Ra з інтраназального засобу. Оптимальна концентрація polysorbate-80 в розробленій назальній формі – 2%. Реологічними дослідженнями виявлено, що polysorbate-80 в концентраціях від 0 до 3% достовірно не впливає на характер структурно-механічних властивостей розробленої назальної лікарської форми.

6. Мікробіологічними дослідженнями встановлено, що для попередження мікробної контамінації та забезпечення мікробіологічної стабільності назальної лікарської форми з IL-1Ra, доцільно використовувати консервант.

7. За результатами проведених досліджень опрацьована технологічна схема виробництва назального рідкого гелю з IL-1Ra в промислових умовах. Обґрунтовано опис та встановлені контрольні точки технологічного процесу виготовлення. Результати роботи апробовано в умовах промислового виробництва.

## РОЗДІЛ 7

### ДОСЛІДЖЕННЯ ДЕЯКИХ ПАРАМЕТРІВ БЕЗПЕЧНОСТІ РОЗРОБЛЕНИХ НАЗАЛЬНИХ ЗАСОБІВ

Попередніми нашими комплексними дослідженнями розроблені склади нових інтраназальних препаратів, рецептури яких містять АФІ N-фенілацетил-L-пролілгліцину, IL-1Ra та допоміжні речовини, необхідні для формування форми випуску. З огляду на необхідність проведення досліджень з безпеки нових лікарських форм, актуальним є вивчення деяких параметрів токсичності, місцево-подразнюючої, алергізуючої дії у нових інтраназальних формах.

7.1 Вивчення гострої токсичності, алергізуючої та шкірно-подразнювальної активності, місцево-подразнювальної дії у назального гелю з похідним гліцину та з IL-1Ra

Визначення гострої токсичності інтраназальних гелів з IL-1Ra-0,5% і з етиловим естером N-фенілацетил-L-пролілгліцину – 1% проводили відповідно до методичних рекомендацій Державного Експертного Центру МОЗ України.

Одноразове інтраназальне введення максимально допустимого об'єму 0,4 мл 0,5% гелю з IL-1Ra щурам масою 100 г в дозі 20 мг/кг не викликає загибелі ні в одного з 6 тварин з групи протягом доби (табл. 7.1).

*Таблиця 7.1*

#### **Вивчення гострої токсичності назального гелю з IL-1Ra-0,5% у щурів при інтраназальному введенні**

Максимально допустимий об'єм, мл	Доза, мг/кг	Кількість щурів			Летальність, %
		загальна	загиблих	виживших	
0,4	20	6	0	6	0



Видимих патологічних змін зовнішнього вигляду і поведінки експериментальних тварин на першу, сьому та чотирнадцяту добу після однократного інтраназального введення гелю з IL-1Ra не з'являлися. Таким чином дана лікарська форма з гелю з IL-1Ra відноситься до VI класу токсичності (відносно нешкідливі речовини). Встановлено, що динаміка зміни маси тіла тварин при цьому перебувала в межах фізіологічної норми (табл. 7.2).

Таблиця 7.2

**Динаміка зміни маси тіла щурів після однократного назального введення  
IL-1Ra, M<sub>±m</sub>**

Групи тварин	Початковий стан, г	7-ма доба, г	14-та доба, г
Контрольна група, n=6	107,1 <sub>±9,5</sub>	133,1 <sub>±8,6</sub>	154,3 <sub>±4,1</sub>
IL-1Ra-гель, n=6	100,2 <sub>±2,7</sub>	123,2 <sub>±3,1</sub>	146,2 <sub>±2,2</sub>

Дослідженнями Ostrovskaya R. U. та співавт., в 2002 році було встановлено, що етиловий естер N-фенілацетил-L-пролілгліцину відноситься до IV класу токсичності (малотоксичні сполуки), LD<sub>50</sub> (Lethal Dose, 50%) якої при внутрішньоочеревинному введенні дорівнює 5078,6 мг/кг [374]. Враховуючи те, що у дослідженнях використовували інший шлях введення цього лікарського засобу (інтраназальне введення), є необхідним дослідження деяких параметрів токсичності (летальність та динаміка зміни маси тіла) ефективної дози (40 мг/кг) етилового естеру N-фенілацетил-L-пролілгліцину при його інтраназальному введенні. Так, однократне інтраназальне введення максимально-допустимого об'єму 0,4 мл досліджуваного препарату, щурам масою 100 г, в дозі 40 мг/кг, не викликає загибелі у жодного з 6 тварин досліджуваної групи протягом доби (табл. 7.3).

Таблиця 7.3

**Вивчення гострої токсичності назального гелю з  
N-фенілацетил-L-пролілгліцину 1% при інтраназальному застосуванні**

Максимально допустимий об'єм, мл	Доза, мг/кг	Кількість щурів			Летальність, %
		загальна	загиблих	виживших	
0,4	40	6	0	6	0

Видимих патологічних змін зовнішнього вигляду і поведінки експериментальних тварин на першу, сьому та чотирнадцяту добу після однократного інтраназального введення N-фенілацетил-L-пролілгліцину не спостерігалось. Таким чином, дана лікарська форма 1% назальний гель з N-фенілацетил-L-пролілгліцину відноситься до VI класу токсичності (відносно нешкідливі речовини). Встановлено, що динаміка зміни маси тіла тварин при цьому перебувала в межах фізіологічної норми (табл. 7.4).

Таблиця 7.4

**Динаміка зміни маси тіла щурів після однократного назального введення  
гелю з N-фенілацетил-L-пролілгліцину 1%, M<sub>±m</sub>**

Групи тварин, n=6	Початковий стан, г	7-ма доба, г	14-та доба, г
Гель з N-фенілацетил-L-пролілгліцину 1%	101,3 <sub>±</sub> 3,2	127,4 <sub>±</sub> 3,8	147,4 <sub>±</sub> 2,8
Контрольна група	107,1 <sub>±</sub> 9,5	133,1 <sub>±</sub> 8,6	154,3 <sub>±</sub> 4,1

При вивченні можливої місцево подразнюючої дії 0,5% гелю IL-1Ra у 1 тварини з 10 було зареєстровано легке почервоніння кон'юнктиви відразу після внесення препарату. У решти 9 тварин не з'явилися зміни кон'юнктиви (табл. 7.5). На 2 і 3 добу після застосування препарату у всіх тварин не було виявлено позитивної реакції з боку слизової оболонки ока, що свідчить про відсутність іритативної дії у даної лікарської форми. Таким чином, 0,5% назальний гель з IL-1Ra не проявляє місцево подразнюючої дії.

Таблиця 7.5

## Результати дослідження місцевоподразнюючої дії гелю з ІЛ-1Ra

Час дослідження, доба					
1		2		3	
к	д	к	д	к	д
Оцінка в балах					
0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0

Примітка. к – контроль; д – гель з ІЛ-1Ra; 0 балів – немає змін кон'юнктиви; 1 бал – легке почервоніння кон'юнктиви

При вивченні можливої місцево подразнюючої дії 1,0% гелю з N-фенілацетил-1-пролілгліцину у 2 тварин з 10 було зареєстровано легке почервоніння кон'юнктиви відразу після внесення препарату. У решти 8 тварин зміни на кон'юнктиві не було (табл. 7.6). На другу та третю добу після внесення препарату у всіх тварин не було виявлено позитивної реакції з боку слизової оболонки ока, що свідчить про відсутність іритативної дії у даної лікарської форми. Таким чином, 1% назальний гель з N-фенілацетил-1-пролілгліцином не проявляє місцево подразнюючої дії.

Таблиця 7.6

**Результати дослідження місцевоподразнюючої дії гелю з N-фенілацетил-l-пролілгліцином 1%**

Час дослідження, доба					
1		2		3	
к	д	к	д	к	д
Оцінка в балах					
0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0

Примітка. к – контроль; д – гель з N-фенілацетил-l-пролілгліцином; 0 балів – немає змін кон'юнктиви; 1 бал – легке почервоніння кон'юнктиви

На наступному етапі проводили вивчення активної шкірної анафілаксії назальних гелів з N-фенілацетил-l-пролілгліцином та IL-1Ra. Як показали результати досліджень, щоденне нанесення на вистрижену ділянку бокової поверхні тулуба тварин (4x4 см) 0,5 г гелю IL-1Ra протягом 5 діб і подальшого одноразового нанесення 0,3 г цього гелю не викликало розвитку анафілактичного шоку (табл. 7.7). Через шість, дванадцять та двадцять чотири годин після нанесення 0,3 г гелю ознаки анафілактичного шоку були відсутні. Таким чином, 0,5% гель IL-1Ra при 5-добовому введенні не викликає алергічних реакцій анафілактичного типу.

Таблиця 7.7

**Оцінка активної шкірної анафілаксії 0,5% гелю ІЛ-1Ra  
в балах за індексом по Weigle**

Номер тварини	Час дослідження, год					
	6		12		24	
	к	д	к	д	к	д
	Оцінка в балах					
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

Примітка. к – контроль; д – гель з ІЛ-1Ra; 0 - шок не розвинувся, ознаки його відсутні

В результаті дослідження 1,0% гелю з N-фенілацетил-1-пролілгліцином виявлено, що щоденне нанесення на вистрижену ділянку бокової поверхні тулуба тварин (4x4 см) 0,5 г гелю протягом 5 діб і подальшого одноразового нанесення 0,3 г цього гелю не викликало розвитку анафілактичного шоку (табл. 7.8). Через шість, дванадцять та двадцять чотири годин після нанесення 0,3 г гелю, ознаки анафілактичного шоку були відсутні. Таким чином, 1,0% гель з N-фенілацетил-1-пролілгліцином при 5-добовому введенні не викликає алергічних реакцій анафілактичного типу.

Таблиця 7.8

**Оцінка активної шкірної анафілаксії 1,0% N-фенілацетил-1-пролілгліцином в балах за індексом по Weigle**

Номер тварини	Час дослідження, год					
	6		12		24	
	к	д	к	д	к	д
	Оцінка в балах					
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0

Примітка. к – контроль; д – гель з N-фенілацетил-1-пролілгліцином; 0 - шок не розвинувся, ознаки його відсутні

Далі проводили дослідження алергізуючої активності методом нашкірних аплікацій гелів IL-1Ra і гелю з N-фенілацетил-1-пролілгліцином. Як показали дослідження, при нанесенні 20 повторних нашкірних аплікацій 0,5% гелю IL-1Ra протягом 4 тижнів (по 5 разів на тиждень), протягом усього терміну спостережень за тваринами видимих реакцій не спостерігалось.

Зовнішній вигляд шкірних покривів в місці нанесення контрольної і дослідної (аплікації гелю з IL-1Ra) груп не відрізнявся (табл. 7.9).

На підставі проведених досліджень можемо зробити висновок, що досліджуваний 0,5% гель IL-1Ra при 4-тижневому застосуванні (20 аплікацій)

не викликає алергічних реакцій за клітинним типом і не викликає алергічних дерматитів.

Таблиця 7.9

**Результати дослідження алергізуючої активності 0,5% гелю з IL-1Ra  
згідно шкали для оцінки аплікаційних шкірних тестів  
на 4 тиждень спостереження (20 аплікацій)**

Групи, n=10	Позначення реакції	Умовні позначення	Опис реакції
0,5% з IL-1Ra	негативна	–	зміна шкіри відсутня
Контроль	негативна	–	зміна шкіри відсутня

Як показали дослідження, при нанесенні 20 повторних нашкірних аплікацій 1,0% гелю з N-фенілацетил-L-пролілглїцином протягом 4 тижнів (по 5 разів на тиждень), протягом усього терміну спостережень за тваринами, видимих реакцій не спостерігалось.

Зовнішній вигляд шкірних покривів в місці нанесення у контрольної і дослідної групи (аплікації гелю з N-фенілацетил-L-пролілглїцином) не відрізнявся (табл. 7.10).

Таблиця 7.10

**Результати дослідження алергізуючої активності 1,0% гелю з  
N-фенілацетил-L-пролілглїцином згідно шкали для оцінки аплікаційних  
шкірних тестів на 4 тиждень спостереження (20 аплікацій)**

Групи, n=10	Позначення реакції	Умовні позначення	Опис реакції
1% з n N-фенілацетил-L-пролілглїцином	негативна	–	зміна шкіри відсутня
Контроль	негативна	–	зміна шкіри відсутня

На підставі проведених досліджень можемо зробити висновок, що досліджуваний 1,0% гель з N-фенілацетил-L-пролілглїцином, при 4-тижневому

застосуванні (20 аплікацій), не викликає алергічних реакцій за клітинним типом і не викликає алергічних дерматитів.

7.2 Вивчення токсикологічних характеристик назального гелю з рецепторним антагоністом інтерлейкіна-1 $\beta$  (IL-1Ra) при повторних застосуваннях

Заміри маси тіла здійснювали в початковому стані, а також на 45-й і 90-й день хронічного назального введення гелю IL-1Ra. Дані представлені в табл. 7.11.

Таблиця 7.11

**Оцінка основних інтеграційних показників функціонального стану тварин до 90-го дня хронічного застосування інтраназального гелю з IL-1Ra**

Показники	Значення	
	IL-1Ra	контроль
Частота дихання (за хв)	123 $\pm$ 20,7	121 $\pm$ 15,4
Активність	звичайна	звичайна
Апетит	норма	норма
Поведінка	звичайна	звичайна
Виділення з носа	немає	немає
Стан очей	норма	норма
Діарея	немає	немає
Жага	немає	немає
Положення тіла	норма	норма
Стан волосяного покриву	норма	норма
Тремор	немає	немає

Як бачимо з наведених значень у табл. 7.12, маса експериментальних тварин в ході хронічного прийому досліджуваного гелю IL-1Ra змінювалася, але незначно. Таким чином, хронічний прийом досліджуваного гелю IL-1Ra



незначно підвищує масу тіла експериментальних тварин аналогічно показниками приросту ваги у контрольній групі.

Таблиця 7.12

**Динаміка зміни маси тіла (в г) у експериментальних тварин протягом 90 днів при інтраназальному введенні гелю ІЛ-1Ra**

Групи	Вихідний фон	Через 45 днів	Через 90 днів
Контроль	180,3±4,1	186,8±5,6	194,3±7,1
ІЛ-1Ra, 0,4 мл	186,3±4,2	192,5±6,7	202,4±6,3

7.2.1 Вплив гелю ІЛ-1Ra на рухово-дослідницьку та емоційну активність тварин. На 30 день назального введення гелю ІЛ-1Ra в дозі 0,4 мл не впливав на кількість болюсів дефекації і тривалість актів грумінгу і не знижував рухово-дослідницьку активність тварин.

Таблиця 7.13

**Вплив гелю ІЛ-1Ra на поведінку щурів в тесті «Відкрите поле» на 30-й день дослідження при інтраназальному введенні**

Групи тварин	Квадрати (кількість)	Стойка (кількість)	Нірки (кількість)	Болюси (кількість)	Грумінг (кількість актів чистки)
Контроль	46,7±2,9	5,7±0,8	20,5±1,4	4,9±0,3	9,1±0,9
ІЛ-1Ra, 0,4 мл	49,8±2,5	5,6±0,5	18,7±1,2	4,2±0,6	8,1±0,9

Примітка. \* –  $p < 0,05$  відносно групи контролю

На 60 день назального введення гелю ІЛ-1Ra в дозі 0,4 мл не впливав на кількість болюсів дефекації і тривалість актів грумінгу і не знижував рухово-дослідницьку активність тварин (табл. 7.14).

На 90 день інтраназального введення гелю ІЛ-1Ra в дозі 0,4 мл спостерігалось деяке пригнічення емоційного компонента реакції, що

знаходило відображення в скороченні числа фекальних кульок ( $P < 0,05$ ) і чистки ( $P < 0,05$ ), але рухова активність тварин не змінювалась (табл. 7.15).

Таблиця 7.14

**Вплив гелю ІЛ-1Ra на поведінку щурів в тесті «відкрите поле»  
на 60-й день дослідження при інтраназальному введенні**

Групи тварин	Квадрати (кількість)	Стойка (кількість)	Нірки (кількість)	Болюси (кількість)	Грумінг (кількість актів чистки)
Контроль	40,1±3,6	10,2±1,2	16,1±0,9	5,2±0,3	12,2±1,1
ІЛ-1Ra, 0,4 мл	38,2±2,7	8,9±0,8	14,4±0,8	5,2±0,5	10,3±1,0

Таблиця 7.15

**Вплив гелю ІЛ-1Ra на поведінку щурів в тесті «відкрите поле»  
на 90-й день дослідження при інтраназальному введенні**

Групи тварин	Квадрати (кількість)	Стойка (кількість)	Нірки (кількість)	Болюси (кількість)	Грумінг (кількість актів чистки)
Контроль	38,1±2,3	8,4±0,9	15,9±1,9	4,0±0,5	11,7±1,4
ІЛ-1Ra, 0,4 мл	30,5±5,2	7,7±1,1	13,7±1,9	2,5±0,3*	7,6±0,9*

Примітка. \* –  $p < 0,05$  відносно групи контролю

Таким чином, введення досліджуваного гелю ІЛ-1Ra в максимально допустимій дозі інтраназально (0,4 мл) не робить достовірного впливу на емоційні показники і рухову активність тварин на 30 та 60 день введення. Після 90-го дня введення спостерігається достовірний вплив на емоційний компонент поведінки щурів у вигляді зниження тривожності і страху, не впливаючи при цьому на рухову активність тварин.

7.2.2 Вплив гелю ІЛ-1Ra на фізичну працездатність. Результати досліджень свідчать, що показники фізичної працездатності експериментальних

тварин – контрольної та дослідної груп можна було порівняти: час утримування щурів на перекладині становило 37-41 с (табл. 7.16).

Таблиця 7.16

**Тривалість фіксації (в с) тваринами свого тіла на перекладині  
при введенні гелю ІЛ-1Ра протягом 90 днів**

Групи, n=10	Початковий фон	Через 30 днів	Через 60 днів	Через 90 днів
Контроль	38,8±2,9	41,2±3,7	37,5±3,4	39,2±4,8
ІЛ-1Ра, 0,4 мл	37,3±2,7	39,5±3,9	38,0±4,1	38,5±3,9

Таким чином, введення досліджуваного препарату не надає достовірного впливу на показники фізичної працездатності у щурів.

7.2.3 Вплив гелю ІЛ-1Ра на показники біоелектричної активності серця і артеріальний тиск у щурів. Вплив досліджуваного гелю ІЛ-1Ра в максимально допустимій дозі (0,4 мл) на показники функціональної активності серцево-судинної системи оцінювали з урахуванням даних електрокардіографії і величини артеріального тиску.

На 30-й - 90-й дні хронічного експерименту істотних змін досліджуваних показників артеріального тиску не відзначалося ні в одній з піддослідних груп (табл. 7.17).

Дослідження показників збудливості і провідності міокарда у щурів показали, що в початковому стані (1-й день хронічного експерименту) і на 30 добу після введення гелю ІЛ-1Ра у всіх тварин вони були в межах фізіологічних коливань (табл. 7.18).

Дослідження ЕКГ у щурів показали, що на 60 добу після введення гелю ІЛ-1Ра у всіх тварин вони були в межах фізіологічних коливань (табл. 7.19).

Дослідження показників збудливості і провідності міокарда у щурів показали, що на 90 добу після назального введення гелю ІЛ-1Ра у всіх тварин вони були в межах фізіологічних коливань (табл. 7.20).

Таблиця 7.17

**Динаміка змін показників артеріального тиску (мм рт. ст.) щурів  
при хронічному інтраназальному введенні гелю ІЛ-1Ra**

Групи тварин	1-й день	30-й день	60-й день	90-й день
Контроль	120,0±10,5	122,0±9,2	118,7±10,2	121,6±8,6
ІЛ-1Ra, 0,4 мл	118,0±28,0	120,1±12,8	121,6±12,1	119,3±10,2

Таблиця 7.18

**Показники біоелектричної активності серця щурів  
на 30-й день інтраназального введення гелю ІЛ-1Ra**

Досліджувані показники ЕКГ	Серії досліджень	
	контроль	ІЛ-1Ra, 04 мл
1	2	3
ЧСС, хв <sup>-1</sup>	354,4±20,9	352,6±18,1
амплітуда зубців, мВ		
P	0,021±0,003	0,019±0,003
R	0,160±0,013	0,167±0,016
T	0,081±0,010	0,082±0,006
ST	-0,006±0,009	-0,005±0,007
тривалість інтервалів, мс		
PQ	41,0±2,5	42,0±1,9
QRS	31,0±0,8	32,6±1,4
T	48,6±2,4	44,8±2,3
TP	48,6±2,4	49,6±1,2
RR	169,2±5,2	172,6±6,3
тривалість інтервалів, % до тривалості серцевого циклу RR		
PQ	24,2±1,4	25,4±1,5
QRS	18,3±0,5	19,8±1,0

Продовж. табл. 7.18

1	2	3
T	28,7±1,4	27,9±2,0
TP	28,7±1,4	27,7±1,1

Таблиця 7.19

**Показники біоелектричної активності серця щурів  
на 60-й день інтраназального введення гелю ІЛ-1Ra**

Досліджувані показники ЕКГ	Серії досліджень	
	контроль	ІЛ-1Ra, 04 мл
ЧСС, хв <sup>-1</sup>	354,4±20,9	354,6±21,1
Амплітуда зубців, мВ		
P	0,021±0,003	0,021±0,004
R	0,160±0,013	0,162±0,012
T	0,081±0,010	0,081±0,011
ST	-0,006±0,009	-0,006±0,005
Тривалість інтервалів, мс		
PQ	41,0±2,5	41,0±2,3
QRS	31,0±0,8	31,6±0,7
T	48,6±2,4	47,8±2,0
TP	48,6±2,4	48,6±1,8
RR	169,2±5,2	167,6±5,3
Тривалість інтервалів,% до тривалості серцевого циклу RR		
PQ	24,2±1,4	25,7±1,2
QRS	18,3±0,5	18,8±0,7
T	28,7±1,4	28,2±2,1
TP	28,7±1,4	28,7±1,2

**Показники біоелектричної активності серця щурів на 90-й день  
інтраназального введення гелю ІЛ-1Ra**

Досліджувані показники ЕКГ	Серії досліджень	
	контроль	ІЛ-1Ra, 04 мл
ЧСС, хв <sup>-1</sup>	354,4±20,9	352,6±18,12
Амплітуда зубців, мВ		
P	0,021±0,003	0,021±0,004
R	0,160±0,013	0,160±0,010
T	0,081±0,010	0,082±0,012
ST	-0,006±0,009	-0,007±0,002
Тривалість інтервалів, мс		
PQ	41,0±2,5	41,7±1,5
QRS	31,0±0,8	33,0±0,8
T	48,6±2,4	48,3±2,2
TP	48,6±2,4	47,8±1,4
RR	169,2±5,2	168,8±2,5
Тривалість інтервалів,% до тривалості серцевого циклу RR		
PQ	24,2±1,4	24,5±1,8
QRS	18,3±0,5	18,7±0,4
T	28,7±1,4	28,7±1,6
TP	28,7±1,4	27,9±1,6

Таким чином, 90-добове інтраназальне введення гелю ІЛ-1Ra в максимально допустимій дозі (0,4 мл) не викликало кардіотоксичної дії.

7.2.4 Вплив гелю ІЛ-1Ra на склад периферичної крові. Спостереження показали, що до кінця хронічного експерименту (90 днів введення гелю ІЛ-1Ra) показники периферичної крові не зазнавали

достовірних змін при введенні максимально допустимої дози лікарської форми (0,4 мл) (табл. 7.21).

Таблиця 7.21

**Динаміка змін показників периферичної крові у білих щурів після 90 днів інтраназального введення гелю ІЛ-1РА**

Групи	Еритроцити, г/л	Лейкоцити, г/л	Нь г/л	ШОЕ мм/ч	Гематокрит, %	Максимальна резистентність, %
Контроль	7,1±0,6	11,4±1,2	137,1±7,5	2,8±0,5	39,6±3,1	0,4±0,04
ІЛ-1РА, 0,4 мл	6,7±0,2	9,1±0,5	121,9±6,2	2,9±0,2	43,4±3,1	0,3±0,03

Детальним кількісним вивченням окремих морфологічних груп лейкоцитів на тлі 90 –денного введення гелю ІЛ-1Ра в максимальній дозі введення у тварин, встановлено відсутність негативного впливу гелю на лейкоцитарну формулу (відсутні достовірні відхилення від показників контрольної серії). Це стосується як гранулоцитів, так і агранулоцитів (табл. 7.22).

Таблиця 7.22

**Динаміка зміни морфологічного складу лейкоцитів периферичної крові у білих щурів після 90-денного введення гелю ІЛ-1РА**

Групи	Лімфоцити	Моноцити	Еозинофіли	Нейтрофіли	
				сегментоядерні	паличкоядерні
Контроль	65,7±4,4	2,3±0,1	1,5±0,1	27,5±2,2	2,0±0,2
ІЛ-1РА, 0,4 мл	67,5±3,1	2,4±0,2	1,7±0,1	29,9±2,2	2,1±0,7

Таким чином, можна зробити висновок, що лікарська форма ІЛ-1РА – інтраназальний гель, при 90-добовому введенні в максимальній дозі не проявляє гематотоксичних ефектів.

7.2.5 Вплив гелю ІЛ-1РА на біохімічні показники сироватки крові. В ході хронічного токсикологічного експерименту вивчалися основні маркери стану печінки, в т. ч. ферментативної активності, і стану видільної функції нирок. Сечовина синтезується в печінці головним чином як побічний продукт дезамінування амінокислот. Її виведення з сечею – основний шлях екскреції азоту. Сечовина фільтрується з крові в клубочках, але в канальцях відбувається її значна пасивна реабсорбція. Концентрація сечовини в плазмі крові використовується часто як показник роботи гломерулярного (клубочкового) апарату нирок. Зміна вмісту сечовини в плазмі – ознака ниркової недостатності.

Коливання концентрації білка в плазмі визначаються змінами трьох чинників: швидкості синтезу білків, швидкості їх видалення та обсягу розподілу. Зазвичай збільшення концентрації білків плазми завжди пов'язано зі зменшенням обсягу розподілу (ефект дегідратації). У свою чергу, зниження концентрації білків найчастіше є наслідком збільшення обсягу плазми.

Наші спостереження показали, що 90-денне введення гелю ІЛ-1РА інтраназально не викликало змін таких показників сироватки крові, як загальний білок, сечовина, глюкоза (табл. 7.23).

*Таблиця 7.23*

**Динаміка змін показників вуглеводного і білкового обміну в сироватці крові після 90-денного інтраназального введення гелю ІЛ-1РА**

Групи	Загальний білок, г/л	Сечовина, ммоль/л	Глюкоза, ммоль/л
Контроль	57,6±2,9	6,5±0,4	5,9±0,2
ІЛ-1РА , 0,4 мл	52,0±3,2	6,7±0,6	6,3±0,1

Дослідження впливу гелю ІЛ-1РА на концентрацію білірубину та холестеролу також продемонструвало відсутність токсичного ефекту щодо вищезначених показників. Так, білірубін утворюється головним чином з гема,



який вивільняється з гемоглобіну, коли старі еритроцити виводяться ретикулоендотеліальною системою з кровотоку. Залізо гема реутилізується, а тетрапірольне кільце розкладається до білірубіну [3, 4]. Щодня в організмі утворюється приблизно 300 мг білірубіну, але здорова печінка здатна метаболізувати і екскретувати в 10 разів більше, таким чином, зміна концентрації білірубіну в плазмі не завжди відображає стан функції печінки, хоча його підвищення може говорити про холестаза. Результати наших досліджень показали практично відсутність впливу досліджуваного препарату на цей показник (табл. 7.24).

Таблиця 7.24

**Зміни біохімічних показників сироватки крові у білих щурів після  
90-денного інтраназального введення гелю IL-1RA**

Групи	Холестерол загальний, моль/л	Білірубін, моль/л
Контроль	1,87±0,11	1,36±0,09
IL-1RA, 0,4 мл	1,82±0,23	1,42±0,11

Відомо, що концентрація холестеролу в сироватці крові залежить від його метаболізму, на який може впливати ряд факторів, зокрема, ендокринні залози і стан внутрішніх органів (печінки, нирок). Його обмін тісно пов'язаний з обміном ліпідів. Результати проведених експериментальних досліджень (табл. 7.24) не виявили порушень в метаболізмі холестеролу, після того як дев'яносто днів постійно вводили досліджуваний інтраназальний гель. Відсутність зрушень в кількісній характеристиці цих речовин у всіх досліджуваних групах свідчать про стабільний стан білкового, вуглеводного та ліпідних ланок метаболізму, які практично не зазнали змін в умовах тривалого впливу. Про це, а також про відсутність істотного впливу максимально допустимих доз гелю IL-1RA на показники функції печінки і нирок свідчить і більш поглиблений аналіз: ферментативної функції аланін і аспарагін-амінотрансферази, лужної фосфатази і вмісту креатиніну сироватки крові

(табл. 7.25). Біохімічні показники в групі, які отримували гель ІІ-1Ra практично не відрізнялися від контролю. Ці дані доводять, що 90-денне введення випробуваного гелю ІІ-1Ra не супроводжується пошкодженням основних механізмів гомеостазу, що реалізуються завдяки діяльності печінкових і ниркових ферментів. Лужна фосфатаза присутня у високих концентраціях у печінці, кістках (остеобласти), плаценті і кишковому епітелії. Патологічне підвищення активності ЛФ спостерігається найчастіше при холестатичній хворобі печінки і при деяких захворюваннях кісток. У печінки холестаз стимулює синтез ЛФ, що є прикладом індукції ферменту, в кістці фермент активно секретується остеобластами (молоді клітини кісткової тканини, що створюють кісткову тканину), і його вміст в плазмі може зростати при підвищенні активності цих клітин. Показники активності лужної фосфатази не змінювалися, що вказує на відсутність холестатичного синдрому в кінці хронічного експерименту.

Найбільш надійним і простим біохімічним тестом гломерулярної функції є визначення креатиніну в плазмі крові. Креатинін синтезується в основному з креатинфосфату м'язів і його добова продукція відносно постійна і залежить в нормі тільки від обсягу м'язової маси. Креатинін активно секретується нирковими каналцями. Показники креатиніну сироватки крові при введенні досліджуваного гелю ІІ-1Ra, також не відхилялися від норми, що свідчило про відсутність порушень видільної функції нирок.

*Таблиця 7.25*

**Динаміка змін біохімічних показників сироватки крові у білих щурів після 90-денного інтраназального введення гелю ІІ-1Ra**

Групи	90-й день			
	АлАТ, мкмоль×мл/год	АсАТ, мкмоль×мл/год	ЛФ, мкмоль×мл/год	Креатинін, ммоль/год
Контроль	0,22±0,01	0,81±0,04	1291,3±143,8	107,3±9,2
ІІ-1Ra, 0,4 мл	0,21±0,03	0,77±0,02	1322,5±91,7	102,6±8,7

Таким, чином, досліджуваний інтраназального гелю ІЛ-1РА при 90-добовому введенні не проявляє гепатотоксичної дії.

7.2.6 Вплив гелю ІЛ-1РА на показники сечі. Результати вивчення загальних показників сечі щурів в умовах назального введення гелю з ІЛ-1РА протягом 90 днів представлені в табл. 7.26.

Встановлено, що у тварин, яким протягом 90 діб вводили досліджуваний гель ІЛ-1РА в дозі 0,4 мл статистично достовірних відмінностей за обсягом сечі, рН, питомої ваги, білку та мікроскопією осаду в порівнянні з контрольною групою не спостерігалось.

Таблиця 7.26

**Показники сечі щурів після інтраназального введення гелю ІЛ-1РА  
протягом 90 днів,  $M \pm m$**

Показники	Групи тварин	
	контроль	ІЛ-1РА, 0,4 мл
Об'єм	4,77±0,21	5,11±0,57
рН	6,32±0,12	6,29±0,22
Питома вага	1,026±0,010	1,028±0,009
Білок, мг/мл	сліди	сліди
Глюкоза, ммоль/л	немає	немає
Кетони, ммоль/л	немає	немає
мікроскопія осаду		
Лейкоцити	0-1	0-1
Еритроцити	0-1	0-1
Циліндри	немає	немає
Епітелій	відсутній	відсутній

В осадах сечі всіх груп тварин не виявлено циліндрів, епітелію ниркового і сечового міхура, а плоский епітелій був представлений одиничними клітинами в полі зору.

Вивчення біохімічних параметрів сечі показали відсутність змін показника сечовини у всіх досліджуваних групах тварин (табл. 7.27).

Відомо, що канальцева реабсорбція сечовини змінюється обернено пропорційно швидкості потоку сечі. Тому екскреція сечовини є менш інформативним показником фільтрації, ніж екскреція креатиніну, яка не реабсорбується. Показники креатиніну також не відрізнялися в усіх досліджуваних групах тварин від контролю.

Таблиця 7.27

**Динаміка змін показників азотовмісних речовин в сечі білих щурів після 90-денного інтраназального введення гелю ІЛ-1РА**

Групи	90-й день	
	сечовина, ммоль/л	креатинін, ммоль/л
Контроль	3,8±0,2	1,6±0,3
ІЛ-1РА , 0,4 мл	3,9±0,3	1,6±0,2

Таким чином, досліджуваний гель ІЛ-1РА не впливав на вивчені загальні та біохімічні показники сечі тварин.

**7.2.7 Вплив гелю ІЛ-1РА на морфо-гістологічну картину органів і тканин експериментальних тварин**

*Мозок.* Після введення гелю ІЛ-1РА загальна цитоархітектоніка кори великих півкуль не змінювалася в порівнянні з контрольною групою тварин. Зберігалася правильна будова нейронів, які мали численні відростки. Розподіл зернистої субстанції в нейронах кори зберігалася без змін. У кіркових нейронах

спостерігалось правильний рівномірний розподіл цитоплазматичних структур. (рис. 7.1).



Рис. 7.1. Ділянка кори лобової частки мозку щура після застосування гелю IL-1RA (0,4 мл) (збарвлення гематоксилином-еозином, збільш.  $\times 200$ )

Ядра нейронів зберігалися без змін у всіх групах тварин. Найчастіше вони округлої форми з чітко окресленими кордонами, розташовувалися в центральній частині клітин, містили одне або два великих ядерця округлої або овоїдної форми. Синтетичні процеси в ядрах нейронів експериментальних груп суттєво не змінювалися, що визначалося по типовому розподілу гетерохроматину: еухроматин в нейронах займав більшу частину нуклеоплазми, гетерохроматин зосереджений у вигляді тонкого прошарку поблизу ядерної оболонки. Гліальні клітини були представлені кількома типами, вони значно варіювали за розмірами. Істотна частина гліальних клітин мали велику кількість відростків, в їх ядрах, кількість яких змінювалося, перебували менші в порівнянні з нейронами добре окреслені ядерця. Ознак патологічних змін або внутрішньоклітинного набряку в гліальних елементах не спостерігалось. В ядрах гліальних клітин визначався як конденсований, так і неконденсований хроматин. Характер розподілу елементів мікроциркуляторного русла в корі був без змін, ознаки периваскулярного набряку та розширення перикапілярної зони були відсутні. Стінка судин середнього калібру і судин мікроциркуляторного русла була без змін.

*Нирка.* Гістологічний аналіз структури нирок показав, що у більшості тварин після інтраназального введення гелю IL-1RA в кірковій речовині

визначаються незмінені ниркові тільця, представлені судинними клубочками, оточеними капсулою нефрона. У інтактних ниркових тільцях порожнина капсули була звичайної форми і не розширена. Капілярний клубочок був представлений типовими ендотеліальними клітинами, базальна мембрана була без ознак патологічних змін (рис. 7.2).

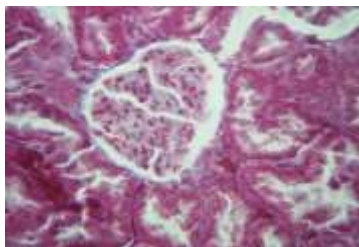


Рис. 7.2. Стан коркової речовини нирки щура після застосування гелю IL-1RA (забарвлення гематоксиліном-еозином, збільш.  $\times 800$ )

У мозковій речовині нирок і з боку ниркових канальців не спостерігали патологічних змін. У нирках тварин після введення препарату в досліджуваних дозах ниркові канальці містили однорядний епітелій без ознак набрякання або дистрофії, просвіт канальців був рівномірний по всій довжині. Цитоплазма епітелію ниркових канальців була забарвлена рівномірно.

Сполучна тканина в мозковій речовині нирок тварин контрольної та експериментальних груп була представлена тонкими прошарками колагенових волокон і одиничними фібробластами між канальцями нефрона, без ознак інфільтративних змін. Характер розподілу елементів мікроциркуляторного русла і судин дрібного і середнього калібру в мозковій речовині був без змін. При використанні гелю IL-1RA ознак периваскулярного набряку та розширення перикапілярної зони не спостерігалось. Ми також не спостерігали явищ циркуляторних порушень з боку судин мозкової речовини нирок у тварин даних експериментальних груп.

*Печінка.* Патологічні зміни після застосування гелю IL-1RA на світлооптичному рівні відсутні (рис. 7.3).

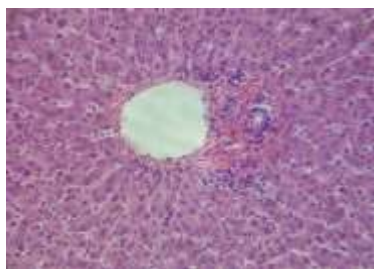


Рис. 7.3. Стан паренхіми печінки щура після застосування гелю ІЛ-1РА (збарвлення гематоксиліном-еозином, збільш.  $\times 400$ )

У синусоїдах визначалась невелика кількість формених елементів крові. Синусоїди були рівномірно заповнені кров'ю, ознак стаза не спостерігалось, синусоїди мали рівномірну ширину на всьому протязі. Печінкові балки були представлені розгалуженим і анастомозуючими тяжами звичайної форми. Фіброзних змін в ділянках, прилеглих до зон холестазу, не виявляли. При застосуванні гелю ІЛ-1РА судинні зміни були відсутні.

*Міокард.* При аналізі будови міокарда шлуночків суттєвих змін не було виявлено з боку кардіоміоцитів і стромальних компонентів серця після введення гелю в досліджуваних дозах. Гістологічне дослідження показало, що у тварин досліджуваних експериментальних груп серцева м'язова тканина представлена пучками м'язових волокон звичайної товщини, всередині яких візуалізувалися характерні для серцевої тканини вставні диски. Поперечна смугастість міоцитів залишалася рівномірною у всіх м'язових волокнах і простежувалася в більшості клітин на поздовжніх зрізах. Цитоплазма в перинуклеарній і субсарколемальній зоні фарбувалася рівномірно. Ознак дистрофії кардіоміоцитів або руйнування скоротливих компонентів не спостерігалось (рис. 7.5).



Рис. 7.5. Стан шлуночкового міокарда у щура після застосування гелю IL-1RA (забарвлення залізним гематоксином Гейденгайна, збільш.  $\times 400$ )

У міокарді тварин експериментальних груп окремі м'язові волокна оточені тонким шаром колагенових волокон без ознак набряку або інфільтрації. На поздовжніх зрізах між м'язовими волокнами визначаються кровоносні капіляри, в яких видно формені елементи крові зі звичайною відстанню, тобто без ознак застою або складжа еритроцитів. Кількість стромальних сполучнотканинних елементів були звичайним, в сполучної тканини між окремими волокнами і групами м'язових волокон визначалися численні фібробласти в обох групах тварин. Перикапілярний простір не був розширений. На поперечних зрізах навколо груп м'язових волокон визначається більш товсті прошарки сполучної тканини, в якій проходять внутрішньоорганні мікросудини. Гемокапіляри в обох групах були без ознак патологічних змін, був відсутній періартеріальний набряк і порушення цілісності судинної стінки. У великих артеріальних і венозних судинах не спостерігалось ознак повнокров'я. Без ознак патологічних зрушень зберігалось ендотеліальне вистилання ендокарда. Воно було представлено одним шаром ендотеліальних клітин, базальна мембрана була потовщена. В елементах провідної системи серця, які були розташовані субендокардіально, в тому числі в волокнах Пуркін'є, були відсутні ознаки внутрішньоклітинного набряку та інші патологічні зміни.

*Шлунок.* Після введення гелю IL-1RA слизова шлунка без змін. Власні залози шлунка залишалися без змін, просвіт не звужувався. Кількість солітарних лімфатичних вузликів в пілоричному відділі шлунка залишалось без змін.



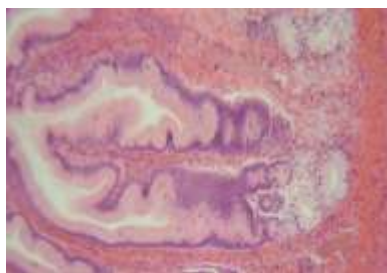


Рис. 7.6. Стан стінки шлунка щура після застосування гелю ІІ-1РА (зabarвлення гематоксиліном-еозином, збільш.  $\times 100$ )

Судинні компоненти слизової оболонки шлунка і м'язової оболонки були представлені артеріями і венами дрібного калібру, артеріолами і венулами, а також елементами мікроциркулярного русла. Стінки шлунка судини залишалися не зміненими. Стан м'язової оболонки шлунка і підсерозної оболонки не відрізнялося від показників контрольної групи.

*Легені.* У складі стінки малих бронхів легенів щурів, після введення гелю ІІ-1РА в досліджуваних дозах при мікроскопічному вивченні, виявлялася зовнішня адвентиціальна оболонка, що складається з волокнистої сполучної тканини з великим вмістом судин і нервів. Адвентиціальна оболонка даних бронхів переходила в сполучнотканинні перегородки паренхіми легенів. Термінальні бронхіоли мали діаметр близько 0,5 мм, вони були вистелені одношаровим кубічним війчастим епітелієм. У власній пластинці слизової оболонки визначалися поздовжньо орієнтованими еластичними волокнами, між якими розташовувалися окремі пучки гладких міоцитів.

Загальна гістоархітектура легеневої паренхіми в складі респіраторного відділу легень, що включає систему респіраторних бронхіол, альвеолярних ходів і альвеолярних мішечків, що не змінювалася після введення гелю ІІ-1РА в порівнянні з контрольними тваринами, товщина міжальвеолярних перегородок істотно не змінювалася, ознак набрякання епітеліального і ендотеліального компонентів не виявлялося (рис. 7.7).

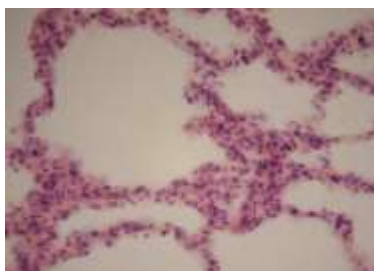


Рис. 7.7. Стан респіраторного відділу легень щура після застосування гелю ІЛ-1РА (збарвлення гематоксиліном-еозином, збільш.  $\times 400$ )

В респіраторних бронхіолах ділянки одношарового кубічного невійчастого епітелію чергувалися з альвеолами, покритими одношаровим плоским епітелієм. В альвеолярних ходах виявлялася велика кількість альвеол. В міжальвеолярних перегородках виявлялися булавоподібні потовщення, що містять гладкі міоцити. Альвеолярні мішечки були утворені комплексом альвеол, м'язові елементи в них не були виявлені. В міжальвеолярних перегородках, крім кровоносних капілярів, прилеглих зовні до базальної мембрани епітелію альвеол, виявлялася мережа тонких еластичних волокон, які обплітають альвеоли.

Альвеоли тісно контактували своїми стінками. До без'ядерних ділянок альвеолоцитів 1 типу прилягали без'ядерні ділянки ендотелію кровоносних капілярів.

*Селезінка.* У тварин експериментальних груп із застосуванням гелю ІЛ-1Ра макроскопічно селезінка залишалася без змін. В її капсулі гістологічних змін не спостерігалось в порівнянні з нормою. У всіх досліджуваних групах, в капсулі визначалися сполучнотканинні компоненти і гладкі м'язи без ознак набряку і інфільтрації. Сполучнотканинні трабекули, що відходять від капсули в паренхіму, були без змін (рис. 7.8).

У складі червоної пульпи селезінки виявлялася велика кількість синусоїдів, деякі з яких були помірно розширені і заповнені елементами крові. Простір між синусоїдами був без патологічних ознак, він був заповнений ретикулярними елементами з розташованими між ними кров'яними клітинами.

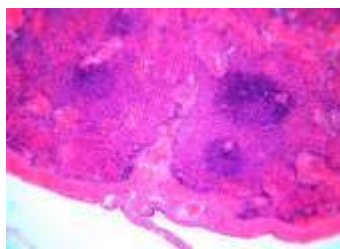


Рис. 7.8. Стан селезінки щура після застосування гелю ІЛ-1РА (зabarвлення гематоксиліном-еозином, збільш.  $\times 100$ )

*Надирник.* При гістологічному дослідженні, в будові надирників експериментальних тварин, не виявлено суттєвих відмінностей у порівнянні з контрольною групою. Капсула надирника зберігала звичайну будову і складалася з сполучнотканинних волокон, фіброblastів і незначної кількості судин. Поділ кори надиркових залоз на зони не було чітким, як і в нормі (рис. 7.9).

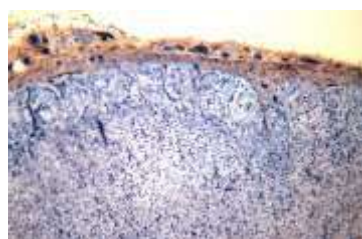


Рис. 7.9. Фрагмент коркової речовини надирника щура після застосування гелю ІЛ-1РА (зabarвлення гематоксиліном-еозином, збільш.  $\times 200$ )

Паренхіматозні клітини під капсулою формували гроновидні структури. У середніх ділянках кори надиркових залоз клітини паренхіми мали радіальний напрямок. Між цим шаром і мозковою речовиною надирників визначався тонкий прошарок паренхіматозних клітин без певної просторової орієнтації. Судини мікроциркуляторного русла найбільш чітко визначалися в зоні з радіальним розташуванням паренхіматозних клітин і в зоні кори, прилеглої до мозкової речовини, де вони були більш широкими. У мозковій речовині визначалися неправильної форми тяжі епітеліальних клітин, цитоплазма яких фарбувалася нерівномірно. Кількість сполучнотканинних

елементів в стромі було звичайним. Перікапілярний простір не був розширений у всіх зонах кори і в мозковій речовині. Більш товсті прошарки сполучної тканини, в якій проходять внутрішньоорганні мікросудини, спостерігалися в мозковій речовині надниркових залоз у тварин контрольної і експериментальної груп. У великих артеріальних і венозних судинах не спостерігалось ознак повнокров'я або стазу. Після введення гелю ПЛ-1Ра, мікросудинні елементи залишалися без ознак патологічних змін, періартеріолярний набряк і порушення цілісності стінки гемокапілярів були відсутні.

*Сім'яник.* При морфологічному аналізі сім'яників у тварин досліджуваних експериментальних груп виявлено, що сполучнотканинна капсула залишалася без змін. Від неї углиб паренхіми відходили сполучнотканинні тяжі, форма і клітинний склад яких не відрізнялися від норми. Покручені сім'яні каналці на зрізах мали вигляд трубчастих структур округлої або овоїдної форми, діаметр каналців у тварин експериментальної групи не відрізнявся від спостережуваного в нормі і коливався в межах 17-22 мкм (рис. 7.10). У стінці звивистих сім'яних каналців визначалися дві популяції клітин – підтримуючі та сперматогенні клітини різного ступеня зрілості. Кількість і співвідношення цих типів клітин не змінилися у тварин після введення препарату в порівнянні з контролем. Поблизу базальної мембрани стінки звивистих сім'яних каналців концентрувалися сперматогонії, які мали ядра неправильної форми. Просвіт звивистих сім'яних каналців був заповнений сформованими сперматозоїдами.

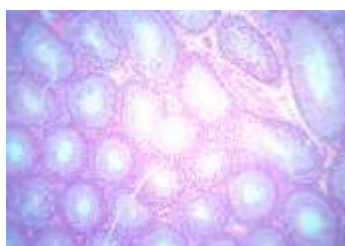


Рис. 7.10. Стан паренхіми сім'яників щура після застосування гелю ПЛ-1РА (забарвлення гематоксиліном-еозином, збільш.  $\times 100$ )

Інтерстиційна тканина навколо звивистих сім'яних каналців містила

густу мережу гемокапілярів. Явища інтерстиціального набряку і крововиливу були відсутні. Клітини Лейдіга були розташовані по одній або групами по 3-4 поблизу гемокапілярів.

*Яєчник.* При аналізі будови яєчників у експериментальних тварин не виявлено відмінностей на світлооптичному рівні в порівнянні з контрольною групою (рис. 7.11). У кірковій речовині яєчників визначалась значна кількість клітин фібробластичного ряду і значна кількість волокон сполучної тканини. У більшості ділянок кіркової речовини, сполучнотканинні елементи формували тяжі. Поверхневі шари кіркової речовини містили найбільшу кількість сполучної тканини. Тут часто спостерігалися рубці, що складаються з грубої волокнистої тканини. Судини кіркової речовини були представлені елементами гемомікроциркуляторного русла, а також судинами дрібного і середнього калібру. Мозкова речовина містила значно меншу кількість сполучнотканинних елементів і більше число судин в порівнянні з кірковим.

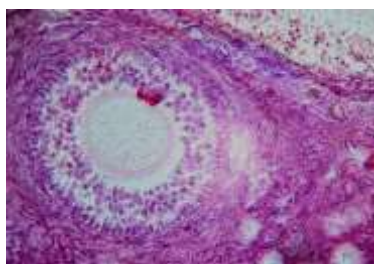


Рис. 7.11. Стан фолікулів яєчника щури після застосування гелю ІІ-1РА (забарвлення гематоксиліном-еозином, збільш.  $\times 100$ )

У тканині кіркової речовини визначалися примордіальні фолікули. Їх кількість була найбільшим, менша частина фолікулів перебувала на різних стадіях дозрівання. Венозні судини мозкової речовини, у тварин обох груп, більш розширені, ніж в кірковій речовині, і характеризувалися значним кровонаповненням, що є нормою. У кірковій і мозковій речовині елементи мікроциркуляторного русла і більші судини у всіх досліджених групах не мали ознак патологічних змін. Після застосування гелю ІІ-1Ра не спостерігали

періартеріального набряку і порушення цілісності мікросудинної стінки, а також підвищеного кровонаповнення гемокапілярів.

7.3 Вивчення токсикологічних характеристик назального гелю ноопепту при повторних застосуваннях

Заміри маси тіла здійснювали в початковому стані, а також на 45-й і 90-й день хронічного інтраназального введення гелю з ноопептом. Дані представлені в табл. 7.28.

Таблиця 7.28

**Оцінка основних інтеграційних показників функціонального стану тварин до 90-го дня хронічного застосування інтраназального гелю з ноопептом**

Показники	Значення	
	ноопепт	контроль
Частота дихання (за хв)	123±20,7	122±24,1
Активність	звичайна	звичайна
Апетит	норма	норма
Поведінка	звичайна	звичайна
Виділення з носа	немає	немає
Стан очей	норма	норма
Діарея	немає	немає
Жага	немає	немає
Положення тіла	норма	норма
Стан волосяного покриву	норма	норма
Тремор	немає	немає

Таблиця 7.29

**Динаміка зміни маси тіла (в г) у експериментальних тварин протягом 90 днів при інтраназальному введенні гелю з ноопептом**

Групи	Вихідний фон	Через 45 днів	Через 90 днів
Контроль	181,7±5,0	188,1±4,8	197,9±4,8
Ноопепт, 0,4 мл	185,4±6,1	197,5±8,3	206,2±7,2

Як видно з наведених значень у табл. 7.29, маса експериментальних тварин в ході хронічного прийому досліджуваного гелю з ноопептом змінювалася, але незначно. Таким чином, хронічний прийом досліджуваного гелю з ноопептом незначно підвищує масу тіла експериментальних тварин аналогічно показниками приросту ваги в контрольній групі.

7.3.1 Вплив гелю з ноопептом на рухово-дослідницьку та емоційну активність тварин. Вплив гелю з ноопептом на поведінку щурів в тесті «відкрите поле» на 90-й день відображено в табл. 7.30-7.32.

На 30 день інтраназального введення гелю з ноопептом в дозі 0,4 мл не впливав на кількість болюсів дефекації і тривалість актів грумінгу і не знижував рухово-дослідницьку функцію тварин (табл. 7.30).

Таблиця 7.30

**Вплив гелю ноопепт на поведінку щурів в тесті «Відкрите поле» на 30-й день дослідження при інтраназальному введенні**

Групи тварин	Квадрати (кількість)	Стойка (кількість)	Нірки (кількість)	Болюси (кількість)	Грумінг (кількість актів чистки)
Контроль	46,7±2,9	5,7±0,8	20,5±1,4	4,9±0,3	9,1±0,9
Ноопепт, 0,4 мл	58,2±2,1	6,3±0,7	22,8±1,7	5,1±0,4	11,2±1,2

Примітка. \* –  $p < 0,05$  відносно групи контролю

Таблиця 7.31

**Вплив гелю з ноопептом на поведінку щурів в тесті «відкрите поле»  
на 60-й день дослідження при інтраназальному введенні**

Групи тварин	Квадрати (кількість)	Стойка (кількість)	Нірки (кількість)	Болюси (кількість)	Грумінг (кількість актів чистки)
Контроль	40,1±3,6	10,2±1,2	16,1±0,9	5,2±0,3	12,2±1,1
Ноопепт, 0,4 мл	56,1±2,3	11,5±1,2	18,3±1,1	5,7±0,5	14,5±1,3

Таблиця 7.32

**Вплив гелю з ноопептом на поведінку щурів в тесті «відкрите поле»  
на 90-й день дослідження при інтраназальному введенні**

Групи тварин	Квадрати (кількість)	Стойка (кількість)	Нірки (кількість)	Болюси (кількість)	Грумінг (кількість актів чистки)
Контроль	38,1±2,3	8,4±0,9	15,9±1,9	4,0±0,5	11,7±1,4
Ноопепт, 0,4 мл	52,2±4,1	9,3±0,8	17,2±1,4	5,5±0,2	12,6±1,2

На 60 день інтраназального введення гелю з ноопептом в дозі 0,4 мл не впливав на кількість болюсів дефекації і тривалість актів грумінгу і не знижував рухово-дослідницьку функцію тварин (табл. 7.31).

На 90 день інтраназального введення гелю з ноопептом в дозі 0,4 мл спостерігалось деяке пригнічення емоційного компонента реакції, що знаходило відображення в скороченні числа фекальних кульок ( $p < 0,05$ ) і не змінювалася рухова активність тварин (табл. 7.32).

Таким чином, введення досліджуваного гелю з ноопептом в максимально допустимій дозі інтраназально (0,4 мл) не робить достовірного впливу на емоційні показники і рухову активність тварин на 30 та 60 день введення. Після 90-го дня введення спостерігається достовірний вплив на емоційний компонент



поведінки щурів у вигляді зниження тривожності і страху, не впливаючи при цьому на рухову активність тварин.

7.3.2 Вплив гелю з ноопептом на фізичну працездатність. Результати досліджень свідчать, що показники фізичної працездатності експериментальних тварин – контрольної та дослідних груп можна було порівняти: час утримування щурів на перекладині становило 36-43 с (табл. 7.33).

Таблиця 7.33

**Тривалість фіксації (в с) тваринами свого тіла на перекладині при інтраназальному введенні гелю з ноопептом протягом 90 днів**

Групи, n=10	Початковий фон	Через 30 днів	Через 60 днів	Через 90 днів
Контроль	38,8±2,9	41,2±3,7	37,5±3,4	39,2±4,8
Ноопепт, 0,4 мл	36,7±2,8	40,4±3,2	41,0±3,2	43,5±3,1

Таким чином, введення досліджуваного препарату не надає достовірного впливу на показники фізичної працездатності у щурів.

7.3.3 Вплив гелю з ноопептом на показники біоелектричної активності серця і артеріальний тиск у щурів. Вплив досліджуваного гелю з ноопептом в максимально допустимій дозі (0,4 мл) на показники функціональної активності серцево-судинної системи оцінювали з урахуванням даних ЕКГ і величини АТ. На 30-й-90-й дні хронічного експерименту істотних змін досліджуваних показників артеріального тиску не відзначалося ні в одній з піддослідних груп (табл. 7.34).

Таблиця 7.34

**Динаміка змін показників артеріального тиску (мм рт. ст.) щурів при хронічному інтраназальному введенні гелю ноопепту**

Групи тварин	1-й день	30-й день	60-й день	90-й день
Контроль	120,0±10,5	122,0±9,2	118,7±10,2	121,6±8,6
Ноопепт, 0,4 мл	120,0±11,0	124,2±11,4	124,6±14,1	122,3±11,8

Дослідження показників збудливості і провідності міокарда у щурів показали, що в початковому стані (1-й день хронічного експерименту) і на 30 добу після введення гелю з ноопептом у всіх тварин вони були в межах фізіологічних коливань (табл. 7.35).

Дослідження ЕКГ у щурів показали, що на 60 добу після інтраназального введення гелю з ноопептом у всіх тварин вони були в межах фізіологічних коливань (табл. 7.36).

Дослідження показників збудливості і провідності міокарда у щурів показали, що на 90 добу після інтраназального введення гелю з ноопептом у всіх тварин вони були в межах фізіологічних коливань (табл. 7.37).

Таким чином, 90-добове інтраназальне введення гелю з ноопептом в максимально допустимій дозі (0,4 мл) не викликало кардіотоксичної дії.

Таблиця 7.35

**Показники біоелектричної активності серця щурів  
на 30-й день інтраназального введення гелю з ноопептом**

Досліджувані показники ЕКГ	Серії досліджень	
	контроль	ноопепт, 0,4 мл
1	2	3
ЧСС, хв <sup>-1</sup>	354,4±20,9	356,7±21,3
амплітуда зубців, мВ		
P	0,021±0,003	0,022±0,001
R	0,160±0,013	0,162±0,011
T	0,081±0,010	0,081±0,005
ST	-0,006±0,009	-0,006±0,008
тривалість інтервалів, мс		
PQ	41,0±2,5	41,6±2,2
QRS	31,0±0,8	31,6±0,4

Продовж. табл. 7.35

1	2	3
T	48,6±2,4	47,2±2,1
TP	48,6±2,4	47,8±2,2
RR	169,2±5,2	170,2±4,3
тривалість інтервалів,% до тривалості серцевого циклу RR		
PQ	24,2±1,4	23,2±1,1
QRS	18,3±0,5	18,5±0,7
T	28,7±1,4	28,5±1,2
TP	28,7±1,4	28,4±1,1

Таблиця 7.36

**Показники біоелектричної активності серця щурів  
на 60-й день інтраназального введення гелю з ноопептом**

Досліджувані показники ЕКГ	Серії досліджень	
	контроль	Ноопепт, 04 мл
1	2	3
ЧСС, хв <sup>-1</sup>	354,4±20,9	377,9±17,1
амплітуда зубців, мВ		
P	0,021±0,003	0,021±0,001
R	0,160±0,013	0,163±0,014
T	0,081±0,010	0,081±0,009
ST	-0,006±0,009	-0,006±0,008
тривалість інтервалів, мс		
PQ	41,0±2,5	41,7±1,8
QRS	31,0±0,8	31,8±0,5
T	48,6±2,4	48,2±2,1
TP	48,6±2,4	48,0±2,8
RR	169,2±5,2	168,2±5,1

Продовж. табл. 7.36

1	2	3
тривалість інтервалів,% до тривалості серцевого циклу RR		
PQ	24,2±1,4	23,2±1,5
QRS	18,3±0,5	18,7±0,4
T	28,7±1,4	28,8±1,2
TP	28,7±1,4	28,3±1,5

Таблиця 7.37

**Показники біоелектричної активності серця щурів  
на 90-й день інтраназального введення гелю з ноопептом**

Досліджувані показники ЕКГ	Серії досліджень	
	контроль	ноопепт, 04 мл
ЧСС, хв <sup>-1</sup>	354,4±20,9	368,1±26,1
амплітуда зубців, мВ		
P	0,021±0,003	0,021±0,001
R	0,160±0,013	0,161±0,014
T	0,081±0,010	0,081±0,011
ST	-0,006±0,009	-0,006±0,001
тривалість інтервалів, мс		
PQ	41,0±2,5	41,2±2,1
QRS	31,0±0,8	32,0±0,7
T	48,6±2,4	48,1±2,7
TP	48,6±2,4	48,5±3,0
RR	169,2±5,2	167,2±4,2
тривалість інтервалів,% до тривалості серцевого циклу RR		
PQ	24,2±1,4	23,5±2,1
QRS	18,3±0,5	18,0±0,2
T	28,7±1,4	28,3±1,2
TP	28,7±1,4	26,9±1,8

7.3.4 Вплив гелю з ноопептом на склад периферичної крові. Спостереження показали, що до кінця хронічного експерименту (90 днів інтраназального введення гелю з ноопептом) показники периферичної крові не зазнавали достовірних змін при введенні максимально допустимої дози лікарської форми (0,4 мл) (табл. 7.38).

Таблиця 7.38

**Динаміка змін показників периферичної крові у білих щурів  
після 90 днів інтраназального введення гелю з ноопептом**

Групи	Еритроцити, г/л	Лейкоцити, г/л	Нь, г/л	ШОЕ, мм/г	Гематокрит, %	Максимальна резистентність, %
Контроль	7,1±0,6	11,4±1,2	137,1±7,5	2,8±0,5	39,6±3,1	0,4±0,04
Ноопепт, 0,4 мл	7,7±0,4	12,1±0,9	140,2±11,2	2,8±0,3	44,7±3,0	0,3±0,01

Детальне кількісне вивчення окремих морфологічних груп лейкоцитів після 90 днів інтраназального введення у тварин, які отримували гель з ноопептом в максимальній дозі продемонструвало відсутність токсичних ефектів щодо відхилень показників контрольної серії, це стосується як гранулоцитів, так і агранулоцитів (табл. 7.39).

Таблиця 7.39

**Динаміка зміни морфологічного складу лейкоцитів периферичної крові у білих щурів після 90-денного інтраназального введення гелю ноопепту**

Групи	Лімфоцити	Моноцити	Еозинофіли	Нейтрофіли	
				сегментоядерні	паличкоядерні
Контроль	65,7±4,4	2,3±0,1	1,5±0,1	27,5±2,2	2,0±0,2
Ноопепт, 0,4 мл	66,4±3,8	2,9±0,1	1,5±0,1	28,2±2,6	2,0±0,3

Таким чином, можна зробити висновок, що лікарська форма з ноопептом у вигляді інтраназального гелю при 90-добовому інтраназальному введенні в максимальній дозі не проявляє гематотоксичних ефектів.

7.3.5 Вплив гелю з ноопептом на біохімічні показники сироватки крові В ході хронічного токсикологічного експерименту вивчалися основні маркери стану печінки та стан видільної функції нирок. Наші спостереження показали, що 90-денне інтраназальне введення гелю з ноопептом не викликало змін таких показників сироватки крові, як загальний білок, сечовина, глюкоза (табл. 7.40).

Таблиця 7.40

**Динаміка змін показників вуглеводного і білкового обміну в сироватці крові після 90 денного інтраназального введення гелю ноопепту**

Групи	Загальний білок, г/л	Сечовина, ммоль/л	Глюкоза, ммоль/л
Контроль	57,6±2,9	6,5±0,4	5,9±0,2
Ноопепт, 0,4 мл	62,1±3,7	6,0±0,3	6,2±0,3

Відсутність токсичних ефектів гелю ноопепту було встановлено також при вивченні концентрації білірубину та холестеролу. Так, біохімічне визначення білірубину та холестеролу продемонструвало відсутність впливу досліджуваного препарату на ці показники (табл. 7.41).

Таблиця 7.41

**Зміни біохімічних показників сироватки крові у білих щурів після 90-денного інтраназального введення гелю з ноопептом**

Групи	Холестерол загальний, моль/л	Білірубін, моль/л
Контроль	1,87±0,11	1,36±0,09
Ноопепт, 0,4 мл	1,77±0,12	1,22±0,07

Відсутність зрушень в кількісній характеристиці цих речовин у всіх досліджуваних групах свідчать про стабільний стан білкового, вуглеводного і ліпідного ланок метаболізму, які практично не зазнали змін в умовах тривалого впливу. Про це, а також про відсутність істотного впливу максимально допустимих доз гелю з ноопептом на показники функції печінки і нирок свідчить і більш поглиблений аналіз: ферментативної функції аланін і аспарагін-аміотрансферази, лужної фосфатази і вмісту креатиніну сироватки крові (табл. 7.42). Біохімічні показники в групі, які отримували гель з ноопептом практично не відрізнялися від контролю. Ці дані доводять, що 90-денне введення випробуваного гелю з ноопептом не супроводжується пошкодженням основних механізмів гомеостазу, що реалізуються завдяки діяльності печінкових і ниркових ферментів. Лужна фосфатаза присутня у високих концентраціях у печінці, кістках (остеобласти), плаценті і кишковому епітелії. Патологічне підвищення активності ЛФ спостерігається найчастіше при холестатичній хворобі печінки і при деяких захворюваннях кісток. У печінки холестаза стимулює синтез ЛФ, що є прикладом індукції ферменту, в кістки фермент активно секретується остеобластами (клітинами, відповідальними за утворення кістки), і його вміст в плазмі може зростати при підвищенні активності цих клітин. Показники активності лужної фосфатази не змінювалися, що вказує на відсутність холестатичного синдрому в кінці хронічного експерименту.

Найбільш надійним і простим біохімічним тестом гломерулярної функції є визначення креатиніну в плазмі крові. Креатинін синтезується в основному з креатинфосфату м'язів і його добова продукція відносно постійна і залежить тільки від обсягу м'язової маси. Креатинін активно секретується нирковими каналцями. Показники креатиніну сироватки крові при введенні досліджуваного гелю з ноопептом, також не відхилялися від норми, що свідчило про відсутність порушень видільної функції нирок.

Таблиця 7.42

**Динаміка змін біохімічних показників сироватки крові у білих щурів  
після 90-денного інтраназального введення гелю з ноопептом**

Групи	90-й день			
	АлАТ, мкмоль×мл/год	АсАТ, мкмоль×мл/год	ЛФ, мкмоль×мл/год	Креатинін, ммоль/год
Контроль	0,22±0,01	0,81±0,04	1291,3±143,8	107,3±9,2
Ноопепт, 0,4 мл	0,19±0,01	0,72±0,01	1288,5±101,7	102,7±8,1

Таким, чином, досліджуваний інтраназальний гель з ноопептом при 90-добовому введенні не проявляє гепатотоксичної дії.

7.3.6 Вплив гелю з ноопептом на показники сечі. Результати вивчення загальних показників сечі щурів в умовах інтраназального введення гелю з ноопептом протягом 90 днів представлені в табл. 7.43. Встановлено, що у тварин, яким протягом 90 діб інтраназально вводили досліджуваний гель з ноопептом в дозі 0,4 мл статистично достовірних відмінностей за обсягом сечі, рН, питомої ваги, білку, мікроскопією осаду в порівнянні з контрольною групою не спостерігалось.

Таблиця 7.43

**Показники сечі щурів після інтраназального введення гелю з ноопептом  
протягом 90 днів, М±m**

Показники	Групи тварин	
	контроль	ноопепт, 0,4 мл
1	2	3
Об'єм	4,77±0,21	5,33±0,32
рН	6,32±0,12	6,33±0,11
Питома вага	1,026±0,010	1,026±0,011
Білок, мг/мл	сліди	сліди
Глюкоза, ммоль/л	немає	немає



Продовж. табл. 7.43

1	2	3
Кетони, ммоль/л	немає	немає
мікроскопія осаду		
Лейкоцити	0-1	0-1
Еритроцити	0-1	0-1
Циліндри	немає	немає
Епітелій	відсутній	відсутній

В осадах сечі всіх груп тварин не виявлено циліндрів, епітелію ниркового і сечового міхура, а плоский епітелій був представлений одиничними клітинами в полі зору.

Вивчення біохімічних параметрів сечі показали відсутність змін показника сечовини у всіх досліджуваних групах тварин (табл. 7.44).

Відомо, що каналцева реабсорбція сечовини змінюється зворотно пропорційно швидкості потоку сечі. Тому екскреція сечовини є менш інформативним показником фільтрації, ніж екскреція креатиніну, яка не реабсорбується. Показники креатиніну також не відрізнялися у досліджуваній групі тварин від контролю.

Таблиця 7.44

**Динаміка змін показників азотовмісних речовин в сечі білих щурів  
після 90-денного інтраназального введення гелю з ноопептом**

Групи	90-й день	
	сечовина, ммоль/л	креатинін, ммоль/л
Контроль	3,8±0,2	1,6±0,3
Ноопепт, 0,4 мл	3,7±0,1	1,5±0,1

Таким чином, досліджуваний гель з ноопептом не впливав на вивчені загальні та біохімічні показники сечі тварин.

### 7.3.7 Вплив гелю з ноопептом на морфо-гістологічну картину органів і тканин експериментальних тварин

*Мозок.* Після інтраназального введення гелю ноопепту оболонка головного мозку звичайного кольору, помірно повнокровна, без ознак крововиливів, набрякання або набряку тканини мозку. Мікроскопічно клітини звичайної форми. Перицелюлярний і периваскулярні набряки відсутні, дистрофічних змін в клітинах немає, клітини нейроглії також без ознак патології. Зберігається правильна будова нейронів, які мали численні відростки. Розподіл зернистої субстанції в нейронах кори зберігалась без змін. У кіркових нейронах при інтраназальному введенні гелю ноопепту спостерігався рівномірний розподіл цитоплазматичних структур. (рис. 7.12).

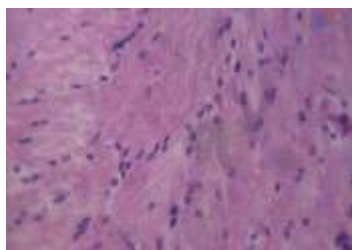


Рис. 7.12. Ділянка кори головного мозку щура після інтраназального застосування гелю ноопепт (0,4 мл) (забарвлення гематоксиліном-еозином, збільш.  $\times 200$ )

Ядра нейронів зберігалися без змін у всіх групах тварин. Найчастіше вони були округлої форми з чітко окресленими кордонами, були розташовані в центральній частині клітин, містили одне або два великих ядерця округлої або овоїдної форми. Синтетичні процеси в ядрах нейронів експериментальних груп суттєво не змінювалися, що визначалося по типовому розподілу еухроматина та гетерохроматина: еухроматин в нейронах займав більшу частину нуклеоплазми, а гетерохроматин зосереджений у вигляді тонкого прошарку поблизу ядерної оболонки. Гліальні клітини були представлені кількома типами, вони значно варіювали за розмірами. Істотна частина гліальних клітин мали велику кількість відростків, в їх ядрах, кількість яких змінювалося, перебували менші в порівнянні з нейронами добре окреслені ядерця. Ознак патологічних змін або

внутрішньоклітинного набряку в гліальних елементах не спостерігалось. В ядрах гліальних клітин визначався як конденсований, так і неконденсований хроматин. Характер розподілу елементів мікроциркуляторного русла в корі був без змін, ознаки периваскулярного набряку та розширення перикапілярної зони були відсутні. Стінка судин середнього калібру і судин мікроциркуляторного русла була без змін.

*Нирка.* Гістологічний аналіз структури нирок показав, що у більшості тварин після введення гелю ноопепт в кірковій речовині визначаються незмінені ниркові тільця, представлені судинними клубочками, оточеними капсулою нефрона. У інтактних ниркових тільцях порожнина капсули була звичайної форми і не розширена. Капілярний клубочок був представлений типовими ендотеліальними клітинами, базальна мембрана була без ознак патологічних змін (рис. 7.13-7.14).

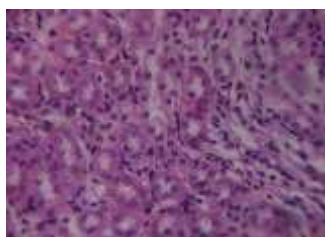


Рис. 7.13. Ниркові каналці щура після інтраназального застосування гелю з ноопептом (зabarвлення гематоксиліном-еозином, збільш.  $\times 800$ )

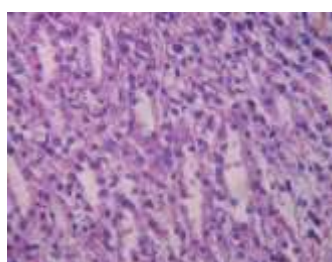


Рис. 7.14. Нирка, мозкової речовини щура після інтраназального застосування гелю ноопепт (зabarвлення гематоксиліном-еозином, збільш.  $\times 800$ )

У мозковій речовині нирок і з боку ниркових каналців не спостерігали патологічних змін. У нирках тварин після введення препарату в досліджуваних дозах ниркові каналці містили однорядний епітелій без ознак набрякання або дистрофії, просвіт каналців був рівномірний по всій довжині. Цитоплазма

епітелію ниркових каналців була забарвлена рівномірно. Сполучна тканина в мозковій речовині нирок тварин контрольної та експериментальних груп була представлена тонкими прошарками колагенових волокон і одиничними фібробластами між каналцями нефрона без ознак інфільтративних змін. Характер розподілу елементів мікроциркуляторного русла і судин дрібного і середнього калібру в мозковій речовині був без змін. При використанні гелю ноопепт ознак периваскулярного набряку та розширення перикапілярної зони не спостерігалось. Ми також не спостерігали явищ циркуляторних порушень з боку судин мозкової речовини нирок у тварин даних експериментальних груп. Судинні клубочки не змінені, капсула не потовщена. Між нирковими тільцями виявляються проксимальні і дистальні ниркові каналці з типовою структурою. Прямі каналці в мозковій речовині і збірні трубочки без особливостей.

*Печінка.* Патологічні зміни після інтраназального застосування гелю ноопепт на світлооптичному рівні були відсутні. Печінка звичайного кольору, без ознак гіперемії, жирового переродження, цирозу. Архітектоніка та структурна організація гемомікроциркуляторного русла печінки лабораторних щурів типова для даного органу (рис. 7.15).

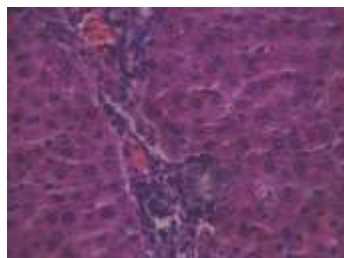


Рис. 7.15. Стан паренхіми печінки щура після інтраназального застосування гелю ноопепт (забарвлення гематоксиліном-еозином, збільш.  $\times 400$ )

У синусоїдах визначалась невелика кількість формених елементів крові. Синусоїди були рівномірно заповнені кров'ю, ознак стаза не спостерігалось, синусоїди мали рівномірну ширину на всьому протязі. Печінкові балки були представлені розгалуженими і аностомозуючими тяжами звичайної форми. Фіброзних змін в ділянках, прилеглих до зон холестазу, не виявлялося. При

застосуванні гелю ноопепт судинні зміни були відсутні. Гепатоцити типової форми, двоядерні однаково розподілені в групах піддослідних тварин і контролі. Дистрофічних змін гепатоцитів не спостерігається.

*Міокард.* Архітектоніка міокарда збережена і представлена м'язовими волокнами, що мають характерну поперечно-смугасту смугастість. Ядра кардіоміоцитів не змінені. Дистрофічних змін не спостерігається. Ознаки скорочення кардіоміоцитів або лізису міофібрил відсутні. Серцева м'язова тканина представлена пучками м'язових волокон звичайної товщини, всередині яких візуалізувалися характерні для серцевої тканини вставні диски. Поперечна смугастість міоцитів залишалася рівномірною у всіх м'язових волокнах і простежувалася в більшості клітин на повздовжних зрізах (рис. 7.16).

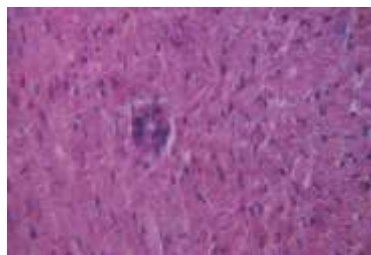


Рис. 7.16. Стан міокарда у щура після інтраназального застосування гелю ноопепт (забарвлення гематоксилином-еозином, збільш.  $7 \times 400$ )

Цитоплазма перинуклеарної і субсарколемальної зони фарбувалася рівномірно. Ознак дистрофії кардіоміоцитів або руйнування скоротливих компонентів не спостерігалось. У міокарді тварин експериментальних груп окремі м'язові волокна оточені тонким шаром колагенових волокон без ознак набряку або інфільтрації. Мікроциркуляторне русло не містить ознак порушення мікроциркуляції у вигляді гемостазу. Кількість стромальних сполучнотканинних елементів було звичайним, в сполучній тканині між окремими волокнами і групами м'язових волокон визначалися численні фібробласти в обох групах тварин. Перікапілярний простір не був розширений. На поперечних зрізах, навколо груп м'язових волокон, визначається більш товсті прошарки сполучної тканини, в якій проходять внутрішньоорганні мікросудини. Гемокапіляри в обох групах були без ознак патологічних змін,

був відсутній періартеріальний набряк і порушення цілісності судинної стінки. У великих артеріальних і венозних судинах не спостерігалось ознак повнокров'я. Без патологічних ознак спостерігалось ендотеліальне вистилання ендокарда. Вона була представлена одним шаром ендотеліальних клітин, базальна мембрана була потовщена. В елементах провідної системи серця, які були розташовані субендокардіальний, в тому числі в волокнах Пуркінє, були відсутні ознаки внутрішньоклітинного набряку та інші патологічні зміни.

*Шлунок.* Макроскопічно слизова шлунка без ознак гіперемії, гіпертрофії, виразок. На гістологічних препаратах видно поверхню слизової оболонки, що вистилає одношаровим призматичним епітелієм в нормі як у дослідній, так і в контрольній групах. Слизова утворює шлункові ямки звичайної глибини. Власна пластинка слизової пронизана трубчастими залозами. Розрізняють головні, парієтальні клітини і дрібні шийні мукоцити. Співвідношення клітин вірне, клітини без патології. Відсутні ознаки атрофії, дистрофії і деструктивних змін поверхневого ямкового епітелію. Залози звичайної структури (рис. 7.17). Судинні компоненти слизової оболонки шлунка і м'язової оболонки були представлені артеріями і венами дрібного калібру, артеріолами і венулами, а також елементами мікроциркулярного русла. Стінки шлунка судини залишалися зміненими. Стан м'язової оболонки шлунка і підсерозної оболонки не відрізнялося від показників контрольної групи. Цитотоксичної дії гелю Ноопепт в досліджуваних дозах на слизову шлунка не робить.



Рис. 7.17. Характерна структура шлунка після інтраназального застосування гелю ноопепт (забарвлення гематоксиліном-еозином, збільш. 7 × 8)

*Легені.* Макроскопічно орган звичайної форми, консистенції і розміру,

без ознак емфіземи і ущільнення тканин. На гістологічних препаратах легеневої тканини виявляється типова картина у вигляді скупчення альвеол, альвеолярних бронхів і судин різного калібру (рис. 7.18). В просвіті альвеол відсутня ексудат, формені елементи крові, слизу. Судини місцями повнокровні. Велика частина міжальвеолярних перегородок потовщена. У складі стінки малих бронхів легень щурів після введення гелю ноопепт в досліджуваних дозах при мікроскопічному вивченні виявлялася зовнішня адвентиціальна оболонка, що складається з волокнистої сполучної тканини з великим вмістом судин і нервів. Адвентиціальна оболонка даних бронхів переходила в сполучнотканинні перетинки паренхіми легень. Термінальні бронхіоли мали діаметр близько 0,5 мм, були вистелені одношаровим кубічним війчастим епітелієм. У власній пластинці слизової оболонки визначалися поздовжньо орієнтовані еластичні волокна, між якими розташовувалися окремі пучки гладких міоцитів.

Загальна гістоархітектура легеневої паренхіми в складі респіраторного відділу легень, що включає систему респіраторних бронхіол, альвеолярних ходів і альвеолярних мішечків, що не змінювалася після введення гелю ноопепт в порівнянні з контрольними тваринами, товщина міжальвеолярних перетинок істотно не змінювалася, ознак набрякання епітеліального і ендотеліального компонентів не виявлялося (рис. 7.18).

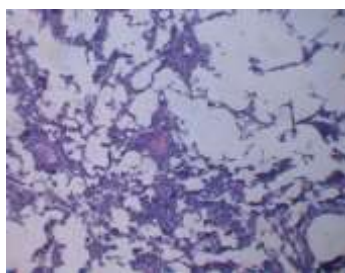


Рис. 7.18. Стан респіраторного відділу легень щура після інтраназального застосування гелю ноопепт (зabarвлення гематоксиліном-еозином, збільш.  $7 \times 40$ )

В респіраторних бронхіолах ділянки одношарового кубічного невійчатого епітелію чергувалися з альвеолами, покритими одношаровим плоским



епітелієм. В альвеолярних ходах виявлялося велика кількість альвеол. В міжальвеолярних перетинках виявлялися булавоподібні потовщення, що містять гладкі міоцити. Альвеолярні мішечки були утворені комплексом альвеол, м'язові елементи в них не виявлялися. В міжальвеолярних перетинках, крім кровоносних капілярів, прилеглих зовні до базальної мембрани епітелію альвеол, виявлялася мережу тонких еластичних волокон, обплітають альвеоли.

Альвеоли тісно контактували своїми стінками до без'ядерних ділянок альвеолоцитів 1 типу та без'ядерних ділянок ендотелію кровоносних капілярів.

Селезінка. У тварин експериментальних груп із застосуванням гелю ноопепт макроскопічно селезінка залишалася без змін. В її капсулі гістологічних змін не спостерігалось в порівнянні з нормою. У всіх досліджуваних групах в капсулі визначалися сполучнотканинні компоненти і гладенькі м'язи без ознак набряку і інфільтрації, а також сполучнотканинні трабекули, що відходять від капсули. На гістологічних препаратах селезінки спостерігається наступна картина. Паренхіма органу представлена червоною і білою пульпою в правильному співвідношенні. Червона пульпа включає в себе селезінкові тяжі і венозні синуси без змін. Простір між синусоїдами був без патологічних ознак (рис. 7.19).

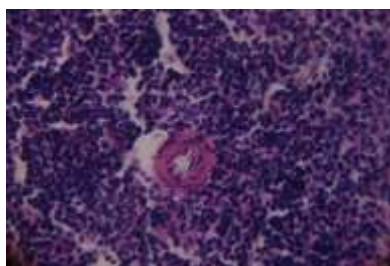


Рис. 7.19. Стан селезінки щури після інтраназального застосування гелю ноопепт (забарвлення гематоксиліном-еозином, збільш.  $\times 100$ )

*Надирник.* Макроскопічно надирники без змін, звичайних розмірів і кольору. Мікроскопічно на зрізах чітко виділяється коркова і мозкова речовина. Коркова речовина представлена трьома зонами – клубочкової, пучкової і сітчастої, клітини яких відрізняються за розмірами і формою. Співвідношення



клітин в різних зонах коркового речовини не порушено у всіх дослідних групах і не відрізняється від контролю (рис. 7.20). Ознак трансформації одних клітин в інші, характерних для стрес-реакцій немає.



Рис. 7.20. Пучкова зона надниркової залози щура після інтраназального застосування гелю ноопепт (зabarвлення гематоксиліном-еозином, збільш.  $\times 200$ )

Паренхіматозні клітини під капсулою формували гронавидні структури. У середніх ділянках кори надниркових залоз клітини паренхіми мали радіальний напрямок. Між цим шаром і мозковою речовиною наднирників визначалася тонкий прошарок паренхіматозних клітин без певної просторової орієнтації. Судини мікроциркуляторного русла найбільш чітко визначалися в зоні з радіальним розташуванням паренхіматозних клітин і в зоні кори, прилеглої до мозкового речовини, де вони були більш широкими. У мозковій речовині визначалися неправильної форми тяжі епітеліальних клітин, цитоплазма яких фарбувалася нерівномірно. Кількість сполучнотканинних елементів в стромі були звичайним. Перикапілярний простір не було розширено у всіх зонах кори і в мозковій речовині. Більш товсті прошарки сполучної тканини, в якій проходять внутрішньоорганні мікросудини, спостерігалися в мозковій речовині надниркових залоз у тварин контрольної і експериментальної груп. У великих артеріальних і венозних судинах не спостерігалася ознак повнокров'я або стаза. Після введення гелю ноопепт у всіх досліджуваних дозах мікросудинні елементи залишалися без ознак патологічних змін, періартеріолярний набряк і порушення цілісності стінки гемокапілярів були відсутні.

*Сім'яник.* При морфологічному аналізі сім'яників у тварин досліджуваних

експериментальних груп виявлено, що сполучнотканинна капсула залишалася без змін. Від неї углиб паренхіми відходили сполучнотканинні тяжі, форма і клітинний склад яких не відрізнялися від норми. Покручені сім'яні каналці на зрізах мали вигляд трубчастих структур округлої або овоїдної форми, діаметр каналців у тварин експериментальної групи не відрізнявся від спостережуваного в нормі і коливався в межах 17-22 мкм (рис. 7.21). У стінці звивистих сім'яних каналців визначалися дві популяції клітин - підтримуючі і сперматогенні клітини різного ступеня зрілості. Кількість і співвідношення цих типів клітин не змінено у тварин після введення препарату в порівнянні з контролем. Поблизу базальної мембрани стінки звивистих сім'яних каналців концентрувалися сперматогонії, які мали ядра неправильної форми. Просвіт звивистих сім'яних каналців був заповнений сформованими сперматозоїдами.

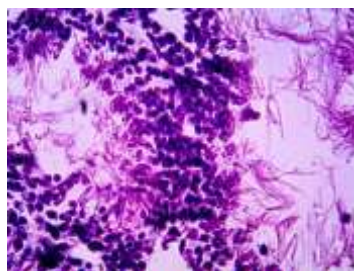


Рис. 7.21. Стан сім'яника самця щура після інтраназального застосування гелю ноопепт (забарвлення гематоксиліном-еозином, збільш.  $\times 400$ )

Інтерстиційна тканина навколо звивистих сім'яних каналців містила густу мережу гемокапілярів. Явища інтерстиціального набряку і крововиливу були відсутні. Клітини Лейдіга були розташовані по одній або групами по 3-4 поблизу гемокапілярів.

*Яечник.* При аналізі будови яєчників, у експериментальних тварин, не виявлено відмінностей на світлооптичному рівні в порівнянні з контрольною групою (рис. 7.22). У кірковій речовині яєчників визначалася значна кількість клітин фібробластичного ряду і значна кількість волокон сполучної тканини. У більшості ділянок кіркової речовини сполучнотканинні елементи формували тяжі. Поверхневі шари кіркової речовини містили найбільшу кількість сполучної тканини. Тут часто спостерігалися рубці, що складаються з грубої

волокнистої тканини. Судини коркового речовини були представлені елементами гемомікроциркуляторного русла, а також судинами дрібного і середнього калібру. Мозкова речовина містила значно меншу кількість сполучнотканинних елементів і більше число судин в порівнянні з кірковим.



Рис. 7.22. Стан яєчника щура після застосування гелю ноопепт (забарвлення гематоксиліном-еозином, збільш.  $\times 200$ )

У тканині кіркової речовини визначалися примордіальні фолікули. Їх кількість була найбільшою, менша частина фолікулів перебувала на різних стадіях дозрівання. Венозні судини кіркової речовини, у тварин обох груп, більш розширені, ніж в кірковій речовині, і характеризувалися значним кровонаповненням, що є нормою. У кірковій і мозковій речовині елементи мікроциркуляторного русла і більші судини у всіх досліджених групах не мали ознак патологічних змін. Після застосування гелю ноопепт ми не спостерігали періартеріального набряку і порушення цілісності мікросудинної стінки, а також підвищеного кровонаповнення гемокапілярів.

Таким, чином хронічне інтраназальне введення гелю Ноопепт не робило негативного впливу на гістоструктури внутрішніх органів експериментальних тварин.

За матеріалами розділу опубліковано праці [379, 380].

## ВИСНОВКИ

1. Проведеними токсикологічними дослідженнями виявлено, що розроблені за допомогою нової інформаційної технології інтраназальні форми з

етиловим естером N-фенілацетил-1-пролілгліцину та PL-1Ra при однократному інтраназальному введенні в максимально допустимому об'ємі не приводять до загибелі тварин і відносяться до VI класу токсичності (відносно нешкідливі речовини).

2. Встановлено, що нові досліджувані лікарські форми з етиловим естером N-фенілацетил-1-пролілгліцину та PL-1Ra не викликають місцевоподрознювальної і алергізуючої дії. Зазначені результати корелюють з результатами аналогічних досліджень субстанції та інших лікарських форм ноопепта та PL-1Ra.

3. Дослідження хронічної токсичності нових розроблених гелів з PL-1Ra та ноопептом (інтраназально щодня, протягом 90 днів) показало, що в максимально допустимій дозі (0,4 мл) – зазначені лікарські форми продемонстрували високий профіль безпечності:

- не здійснюють негативного впливу на інтегральні показники експериментальних тварин (маса тіла, температура, рухова та дослідницька активність, тривожність);

- не здійснюють негативного впливу на серцево-судинну систему експериментальних тварин;

- не здійснюють негативного впливу на показники периферичної крові (кількість еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів, швидкість осідання еритроцитів, вміст гемоглобіну, резистентність еритроцитів);

- не здійснюють негативного впливу на показники видільної функції нирок експериментальних тварин;

- не викликають негативних змін функції печінки;

- не викликають токсичних змін гістоструктури внутрішніх органів (мозок, печінка, легені, шлунок, селезінка, наднирники, сім'яники) у експериментальних тварин.

4. Результати експериментальних токсикологічних досліджень, розроблених за допомогою нової інформаційної технології, лікарських форм – гелів для назального застосування етилового естеру N-фенілацетил-1-

пролігліцину та IL-1Ra демонструють їх безпечність та нешкідливість, що є підставою для проведення першої фази клінічних випробувань.

## РОЗДІЛ 8

### ВИВЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ (ЦЕРЕБРОПРОТЕКТИВНОЇ) АКТИВНОСТІ РОЗРОБЛЕНИХ НАЗАЛЬНИХ ГЕЛІВ

8.1 Дослідження нейропротективних властивостей назального гелю з похідним гліцину

8.1.1 Дослідження нейропротективних властивостей назального гелю з похідним гліцину на експериментальній моделі розсіяного склерозу. Розсіяний склероз відноситься до демієлінізуючих захворювань нервової системи, при яких основні патоморфологічні зміни розвиваються в білій речовині і характеризуються розпадом мієлінових оболонок. Серед церебральних порушень відзначено зниження інтелекту та поведінки, згасання інтелектуальних і емоційних функцій, погіршення пам'яті, депресію, занепокоєння. Розсіяний склероз продовжує залишатися складним та інвалідизуючим станом, але зараз існує глибше розуміння основних генетичних та екологічних факторів, що обумовлюють стан, включаючи низький рівень вітаміну D, куріння сигарет та ожиріння [381, 382].

Загально визнаною моделлю РС в лабораторних тварин є експериментальний алергічний енцефаломієліт, який має подібні клінічні прояви і патогенетичні механізми, як у розсіяного склерозу. Для підвищення ефективності лікування РС, були використані нові напрямки – універсальні терапевтичні підходи до його лікування, одним з яких є нейропротекція, направлена на регулювання балансу імунних і нейротрофічних факторів, процесів ремієлізації.

З огляду на сучасний рівень знань про нейропротекцію при РС, оптимальну нейропротекторну терапію цього захворювання, з позицій практичної неврології, проводять шляхом застосування засобів первинної та вторинної нейропротекції на фоні призначення препаратів ремієлінізуючої терапії [383].

*Вивчення антидепресивної активності досліджуваних препаратів в умовах ЕАЕ.* Одним з клінічних проявів хронічного запального і демієлінізуючого процесу при РС є порушення вищих мозкових функцій, яким до недавнього часу приділялася недостатня увага при аналізі неврологічного статусу і оцінці ефективності лікування. При цьому більше половини хворих вже на початкових стадіях захворювання скаржаться на стійкі порушення нейропсихічних функцій (біль, інсомнія) і практично всі в тій чи іншій мірі мають нейропсихічні розлади (зменшення м'язової сили, дезадаптація і депресія) [384]. Депресія – дуже частий супутник РС. Більш того, більше п'ятидесяти відсотків пацієнтів з РС, в різний період хвороби, відчувають досить серйозні симптоми депресії, які потребують медикаментозної корекції [385].

Оцінкою антидепресивної активності досліджуваних препаратів в тесті Порсолта встановлено, що в групі контролю (нелікованих тварин) час іммобілізації (завмирання тварин у воді при примусовому плаванні) був найвищим:  $209,4 \pm 11,2$  с, що відповідало високому рівню тривожності і занепокоєння (рис. 8.1).

*Таблиця 8.1*

**Рівень тривожності щурів з ЕАЕ при введенні дослідних препаратів (n=10)**

Експериментальні групи	Доза, мг/кг	Час завмирання (іммобілізації)
ЕАЕ (контроль)	–	$209,4 \pm 11,2$
ЕАЕ + МП	3,4	$191,8 \pm 10,8$
ЕАЕ + МП + ноопепт	3,4+10	$168,2 \pm 11,0^*$
ЕАЕ + МП + цитиколін	3,4+500	$182,4 \pm 12,2$

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  відносно групи контролю

Введення метилпреднізолону не здійснювало достовірного впливу на прояв тривожності у щурів з ЕАЕ. Відсутність достовірного протитривожного

ефекту було зафіксовано і після курсового введення метилпреднізолону і цитиколіну. Введення метилпреднізолону і гелю ноопепту призводило до вірогідного зменшення часу завмирання на 19,6%. Таким чином, досліджувана лікарська форма - інтраназальний гель Ноопепт усуває тривогу і проявляє антидепресивну дію у щурів з модельованим експериментальним еквівалентом розсіяного склерозу на фоні фармакотерапії метилпреднізолоном.

*Дослідження здатності препаратів посилювати медикаментозний сон в умовах ЕАЕ на фоні фармакотерапії метилпреднізолоном.* У багатьох пацієнтів з РС спостерігається безсоння або переривчастий поверхневий сон, проте його порушення не є прямим наслідком хвороби. Зазвичай вони викликані вторинними факторами: стресом, спастичністю, обмеженою фізичною активністю або депресією. Тому метою даного етапу дослідження була оцінка здатності антидепресантів посилювати медикаментозний сон у щурів з ЕАЕ.

Оцінку ефективності інтраназального гелю ноопепту і цитиколіну в даній серії експериментальних досліджень проводили за двома показниками: часу засипання тварин (латентний період сну) і його тривалості у щурів з ЕАЕ. Медикаментозний сон викликали введенням тіопентал натрію (30 мг / кг) [386, 387].

*Таблиця 8.2*

**Характеристика медикаментозного сну у щурів з ЕАЕ на фоні комбінованого введення метилпреднізолону з ноопептом і цитиколіном**

Експериментальні групи, n=10	Доза, мг/кг	Час засинання, с	Тривалість сну, хв
ЕАЕ (контроль)	–	62,7±12,7	26,5±3,7
ЕАЕ + МП	3,4	54,8±10,0	36,7±3,4
ЕАЕ + МП + ноопепт	3,4+10	27,1±5,2* <sup>2</sup>	63,1±5,1* <sup>2</sup>
ЕАЕ + МП + цитиколін	3,4+25	29,1±5,4	55,6±5,8* <sup>2</sup>



Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  відносно групи контролю; 1 –  $p \leq 0,05$  відносно групи цитиколіну; 2 –  $p \leq 0,05$  відносно групи метилпреднізолону

Показано, що в групі ЕАЕ (контроль) тривалість часу засинання становила  $62,7 \pm 12,7$  с: тварини були стурбовані, погойдувалися з боку в бік, поки брали позу сну (на боці або на животі). При цьому в групі тварин, яким вводили метилпреднізолон, щури також засинали стурбованими, але швидше ( $54,8 \pm 10,0$ ) в порівнянні з контролем. У групі контролю (ЕАЕ) тривалість сну становила  $26,5 \pm 3,7$  хв. А в групі ЕАЕ, що одержувала метилпреднізолон –  $36,7 \pm 3,4$  хв.

Встановлено, що при інтраназальному застосуванні гелю ноопепту і цитиколіну парентерально спостерігалася односпрямована динаміка змін латентного періоду і тривалості сну. Так, на фоні введення цитиколіну, сон у щурів з ЕАЕ був тривалішим на 109,8% ( $p \leq 0,05$ ) в порівнянні з групою контролю. При використанні інтраназального гелю «Ноопепт» даний показник змінювався ще більше – час засипання зменшувався на 56,7% ( $p \leq 0,05$ ), тривалість сну збільшувалась на 138,1% ( $p \leq 0,05$ ) в порівнянні з показниками групи ЕАЕ. Таким чином, дослідження в тесті медикаментозного сну виявили наявність антидепресивної і анксиолітичної дії у інтраназального гелю Ноопепт в умовах ЕАЕ [388].

*Оцінка когнітивно-мнестичних функцій та емоційної поведінки тварин з ЕАЕ на фоні фармакотерапії.* При оцінці специфічних показників методики «відкрите поле» було виявлено, що індукція ЕАЕ негативно впливала на поведінкові характеристики тварин (табл. 8.3). Індукція ЕАЕ призводила до вірогідного зменшення пройденої відстані тваринами на 16 добу експерименту в 1,4 рази, в 1,87 раз зменшувала вільну відстань в абсолютних одиницях, однак в 5,8 раз збільшувало вільну відстань у відсотках від загальної рухової активності.

Таблиця 8.3

## Вплив препаратів на пошуково-дослідницьку активність щурів з ЕАЕ

Показник	Інтакт	Контроль, ЕАЕ	ЕАЕ+МП	ЕАЕ+МП+ цитиколін	ЕАЕ+МП+ ноопепт
Кількість входжень в центр, од	1	2	2	1	1
Висока активність,%	7,83± 1,44	5,23± 1,00	5,87± 1,8	7,11± 1,1	7,77± 1,2* <sup>2</sup>
Низька активність,%	61,71± 7,08	87,3± 4,0	85,1± 3,1	87,2± 4,0	75,2± 2,6
Неактивність,%	30,47± 6,59	52,3± 4,3	53,0± 4,4	41,0± 3,4	34,0± 2,4*
Нерухомість, од	284± 35	533± 21	495± 21	410± 23* <sup>2</sup>	385± 15* <sup>2</sup>
Пройдену відстань, см	4161,8± 290,7	2902,0± 311,1	3014,1± 346,5	3422,1± 216,2	3887,2± 218,2* <sup>12</sup>
Відстань вільний, см	59,3± 26,3	32,7± 11,2	23,4± 8,2	33,6± 9,2	38,4± 12,5
Завмирання, од	284± 35	733± 21	784± 23*	534± 18*	417± 22* <sup>12</sup>
Відстань вільний,%	1,43± 0,61	8,30± 1,2	8,7± 1,6	9,2± 2,6	7,2± 1,3
Відстань у стілки, см	4102,44± 289,5	3211,2± 511,8	3771,3± 231,2	3877,2± 244,2	3755,1± 234,6
Стойка біля стілки, од	4±1	6±1	5±1	4±1	4±1
Стойка вільна, од	4	2±1	1	2	4* <sup>12</sup>
Грумінг короткий, од	3±1	1	1	1	3* <sup>12</sup>
Грумінг тривалий, од	1	1	1	1	1
Дефекація, од	3	2	2±1	2	2
Уринація, од	1±1	1	1	1	1

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  відносно групи контролю; 1 –  $p \leq 0,05$  відносно групи цитиколіну; 2 –  $p \leq 0,05$  відносно групи метилпреднізолону

Також у тварин контрольної групи виявлено збільшення в 2,58 раз кількості завмирань і в 1,87 раз збільшувало нерухомість тварин. Всі ці факти свідчать про формування тривожності у тварин з ЕАЕ, а також пригнічення у них пошукової активності. Індукція ЕАЕ не впливала на кількість вільних стійок тварин, але приводила до збільшення стійок біля стінки. Також в 3 рази знижувалася кількість актів короткого грумінгу на фоні незміненої кількості тривалого грумінгу. Даний факт також свідчить про підвищену тривожність, збудливість, дратівливість тварин, зниженні почуття комфорту. У тварин контрольної групи відзначали зниження високої активності, що свідчило про низьку емоційність і зменшення пошукової та дослідницької активності тварин. У щурів контрольної групи спостерігалася збільшення низької активності в 1,4 рази, що свідчить про згасання дослідницької активності для засвоєння нової обстановки [388].

Курсове введення щурам з ЕАЕ метилпреднізолону не впливало на показники пошуково-дослідницької активності і емоційної поведінки в тесті «відкрите поле». При цьому метилпреднізолон незначно збільшував кількість завмирань, що свідчить про збільшення тривожності. Курсове введення щурам з ЕАЕ на фоні метилпреднізолону цитиколіну приводило до деякого поліпшення пошуково-дослідницької активності і поведінки тварин. Так, в цій групі тварин відзначали достовірне зниження неактивності і кількості завмирань, що свідчить про зменшення тривожності, дратівливості тварин і відновлення емоційної поведінки. Курсове введення щурам з ЕАЕ на фоні метилпреднізолону, інтраназально гелю ноопепту приводила до більш повного відновлення втрачених дослідних функцій і компонентів емоційного поведінки тварин. Так, в групі щурів, які отримували ноопепт, спостерігали достовірне збільшення рухової активності (підвищення загального пройденої відстані в 1,3 рази), підвищення дослідницької та пошукової активності (підвищення високої активності в 1,5 рази і зниження нерухомості в 1,4 рази). Варто відзначити, що підвищення високої активності може розцінюватися і як зниження ККД дослідницької та пошукової діяльності, так як щур робить надмірну кількість

«зайвих» рухів і вимагає більше часу для засвоєння нової обстановки. Позитивним у дії гелю ноопепту в умовах ЕАЕ було і зниження тривожності (зниження в 1,7 разів кількості завмирань) і підвищення емоційності тварин (збільшення в 3 рази грумінгу і підвищення стійок біля стінки в 2 рази). Причому за впливом на показники тривожності (завмирання) і емоційної активності (зниження неактивності і грумінгу) гель Ноопепт достовірно перевершує Цитиколін. Можна зробити висновок, що Ноопепт більшою мірою збільшує загальну активність ЦНС і проявляє нормотимічну активність, впливає на емоційні аспекти пам'яті, не надаючи значної дії на більш складні когнітивні механізми. Подібний механізм характерний для рацетамних ноотропів. Більш виражену, в порівнянні з цитиколіном, дію гелю Ноопепт можна пояснити тим, що при інтраназальному введенні пептиди за допомогою екстранейронального шляху через нюховий епітелій потрапляють як в області мозку, пов'язані з процесами пам'яті і навчання, так і в структури мозку, відповідальні за емоційний статус (передній мозок і лімбічні області). Внаслідок чого у гелю ноопепту при інтраназальному введенні присутній і анксиолітичний та ноотропний ефекти.

При оцінці специфічних показників навчання (табл. 8.4) в радіальному лабіринті було виявлено, що через 27 діб після індукції ЕАЕ у тварин спостерігалася когнітивна дисфункція. Знижувалася загальна активність тварин контрольної групи. При відтворенні результатів навчання тварин було встановлено, що на 27 добу після індукції ЕАЕ збільшується в 5,75 разів кількість помилок робочої пам'яті в 5 разів – кількість помилок референтної пам'яті, що свідчило про порушення мнестичних у тварин з ЕАЕ. Отримані дані лежать в руслі концепції формування когнітивного дефіциту при РС. Введення метилпреднізолону не впливало на показники когнітивних функцій тварин з ЕАЕ. Курсове введення цитиколіну з метилпреднізолоном не впливало на показник загальної активності тварин при навчанні в лабіринті, але достовірно зменшувало в 2 рази кількість помилок референтної пам'яті та на 25% кількість помилок робочої пам'яті. Введення з метилпреднізолоном гелю ноопепту

приводило до достовірного збільшення загальної активності тварин з ЕАЕ при навчанні на 25,3%, а також до зниження в 2,5 разів кількості помилок референтної пам'яті та на 45% кількість помилок робочої пам'яті.

Таблиця 8.4

### Вплив на навчання і пам'ять щурів в умовах ЕАЕ

Групи тварин	Загальна активність, см <sup>2</sup> /с	Кількість помилок референтної пам'яті	Кількість помилок робочої пам'яті
Інтактна	24380,9±1242,4	2	4±1
Контрольна, ЕАЕ	17865,5±1143,1	10±1	23±1
ЕАЕ + МП	18121,5±1022,1	10±1	20±1
ЕАЕ + МП + ноопепт	22387,4±1077,4*	4±1* <sup>2</sup>	11±1* <sup>12</sup>
ЕАЕ + МП + цитиколін	19675,2±1121,4	5±1* <sup>2</sup>	15±1* <sup>2</sup>

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  відносно групи контролю; 1 –  $p \leq 0,05$  відносно групи цитиколіну; 2 –  $p \leq 0,05$  відносно групи метилпреднізолону

Виявлені результати свідчать про високу нейропротективну і ноотропну активності інтаназального гелю ноопепту. За ступенем впливу на зниження кількості помилок робочої пам'яті при ЕАЕ гель ноопепту достовірно перевершує монотерапію МП і терапію МП + цитиколін [388].

*Оцінка неврологічного статусу тварин з ЕАЕ на фоні застосування препаратів.* Для оцінки ефективності нейропротективної дії досліджуваних препаратів розраховували: 1) тривалість латентного періоду ЕАЕ; 2) загальна кількість щурів з помірним і тяжким перебігом експериментального еквіваленту розсіяного склерозу (у відсотках від кількості в групі); 3) середній клінічний індекс на піку ЕАЕ; 4) середній кумулятивний індекс «хвороби»; 5) середню тривалість «захворювання» (табл. 8.5).

Таблиця 8.5

**Вплив гелю ноопепту і цитиколіну на перебіг ЕАЕ  
на фоні базової терапії метилпреднізолоном**

Показники	Групи тварин, n=10			
	контроль, ЕАЕ	МП	ноопепт + МП	цитиколін + МП
% Хворих тварин (всього / важко)	90/70	80/30	60/10* <sup>2</sup>	60/10* <sup>2</sup>
Середній клін. індекс на піку ЕАЕ, бали	2,4±0,5	1,85±0,5	0,8±0,4* <sup>2</sup>	1,05±0,15* <sup>2</sup>
Середній кумул. індекс, бали	28,8±1,5	10,4±0,9*	5,9±0,7* <sup>2</sup>	6,5±0,5* <sup>2</sup>
Тривалість ЕАЕ, дні (тест Стьюдента)	15,9±1,1	8,4±0,9*	5,7±0,4* <sup>2</sup>	6,2 ± 0,5* <sup>2</sup>

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  відносно групи контролю; 1 –  $p \leq 0,05$  відносно групи цитиколіну; 2 –  $p \leq 0,05$  відносно групи метилпреднізолону

Тяжкість неврологічних порушень оцінювали в балах за клінічними індексами. Клінічний індекс (Клін) визначали за шкалою: м'язова слабкість однієї кінцівки – ½ бала, парез – 1 бал, параліч – 1 ½ бала. При залученні в процес декількох кінцівок бали підсумовували. Відсутність порушень брали за 0 балів, летальний результат 6 балів. Тварин з клінічним індексом ½-2 ½ балів відносили до групи з легкою формою експериментального еквіваленту розсіяного склерозу; 3-6 балів відповідало тяжкому перебігу ЕАЕ. Для інтегративної оцінки тяжкості ЕАЕ для кожної тварини розраховували кумулятивний індекс (Кумул) – суму індивідуальних клінічних індексів за період «хвороби» [389].

Результати проведених досліджень свідчать, що при індукції ЕАЕ у тварин контрольної групи реєструвався розвиток неврологічних порушень різного ступеня тяжкості; летальний результат захворювання спостерігався у

одного з 10 гризунів (10%). В області інокуляції були відзначені прояви запалення, які зберігалися більше 20 діб.

Показано, що після індукції ЕАЕ у щурів групи контролю перші неврологічні розлади були зафіксовані на 9-11 добу. Пік клінічних проявів алергічного енцефаломієліту у більшості тварин розвивався на 12-14 добу і тривав в середньому 4 дні; при цьому тривалість ЕАЕ склала  $15,9 \pm 1,1$  днів при середньому кумулятивному індексі 27 балів. При цьому на піку клінічних проявів ЕАЕ кількість тварин з клінічними індексом  $\frac{1}{2}$ - $2 \frac{1}{2}$  балів склала 41,7% щурів, що відповідало легкому ступені «захворювання», а важкий перебіг ЕАЕ спостерігався у 58,3% гризунів (клінічний індекс 3-6 балів ) [390].

Встановлено, що введення метилпреднізолону усувало летальні випадки, повністю попереджало розвиток неврологічних розладів у 10% тварин, а також зменшувало кількість гризунів з тяжким перебігом ЕАЕ до 30%. При цьому неврологічні симптоми ЕАЕ протікали більш короткочасно (тривалість ЕАЕ вкорочувалася в 1,9 раз,  $p < 0,05$ ) і в легкій або середньо важкій формі (клінічний індекс на піку захворювання зменшувався в 1,3 рази ( $p < 0,05$ ), кумулятивний - практично в 2,6 раз ( $p < 0,05$ ) [391].

Курсове введення цитиколіну, на фоні введення метилпреднізолону, усувало летальні випадки, повністю попереджало розвиток неврологічних розладів у 40% тварин, а також зменшувало кількість щурів з тяжким перебігом ЕАЕ до 10%. При цьому неврологічні симптоми ЕАЕ протікали більш короткочасно (тривалість ЕАЕ вкорочувалася в 2,5 раз,  $p < 0,05$ ) і в легкій або середньо важкій формі (клінічний індекс на піку захворювання зменшувався в 2,28 рази ( $p < 0,05$ ), кумулятивний в 4,43 рази ( $p < 0,05$ ).

Курсове введення гелю ноопепту на фоні введення метилпреднізолону також повністю усувало летальні випадки, повністю попереджало розвиток неврологічних розладів у 40% тварин, а також зменшувало кількість гризунів з тяжким перебігом ЕАЕ до 10%. При цьому неврологічні симптоми ЕАЕ протікали більш короткочасно (тривалість ЕАЕ скорочувалася в 2,78 разів,  $p < 0,05$ ) і в легкій або середньо важкій формі (клінічний індекс на піку

захворювання зменшувався в 3 рази ( $p < 0,05$ ), кумулятивний в 4,88 разів ( $p < 0,05$ ). Таким чином, гель Ноопепт при інтраназальному введенні з метилпреднізолоном виявляв достовірні нейропротективні властивості в умовах ЕАЕ, по силі дії конкуруючи з цитиколіном [388].

*Вплив препаратів на морфо-функціональні показники нейронів сенсомоторної кори в умовах ЕАЕ.* Встановлено, що модельована патологія приводила до пошкодження нейронів сенсомоторної зони кори головного мозку експериментальних тварин (табл. 8.6). Зокрема, в групі щурів з ЕАЕ спостерігалось зменшення щільності нейронів на 19% ( $p < 0,05$ ), що свідчило про загибель клітин, і підвищення їх площі на 10%, що підтверджувало розвиток їх набряку. Крім того, в умовах ЕАЕ було зареєстровано зниження транскрипційних процесів в нейронах сенсомоторної кори, про що свідчило зниження рівня РНК на 21% ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 8.6

**Оцінка морфо-функціональних показників нейронів сенсомоторної зони головного мозку щурів в умовах ЕАЕ,  $M \pm m$ ,  $n=10$**

Експериментальні групи	Щільність нейронів, нейрон/мм <sup>2</sup>	Площа нейронів, мкм <sup>2</sup>	Вміст РНК, E <sub>оп</sub>
Інтактна	1250,2±25,5	83,0±3,86	9,52±0,33
ЕАЕ (контроль)	1006,7±10,7	91,5±3,93	7,45±0,62
ЕАЕ + МП	1037,4±6,8*	84,2±2,73*	7,33±0,44
ЕАЕ + МП + цитиколін	1101,4±7,4* <sup>2</sup>	84,2±2,11*	8,10±0,42* <sup>2</sup>
ЕАЕ + МП + ноопепт	1154,1±6,8* <sup>12</sup>	84,7±3,07*	8,14±0,51* <sup>2</sup>

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  відносно групи контролю; 1 –  $p \leq 0,05$  відносно групи цитиколіну; 2 –  $p \leq 0,05$  відносно групи метилпреднізолону



Як свідчать результати проведених досліджень, індукція ЕАЕ приводила до активації нейроапоптозу. Так, в сенсомоторній зоні кори тварин, з експериментальною патологією, спостерігалось підвищення щільності апоптичних і деструктивних клітин на 150% ( $p < 0,05$ ). При цьому частка апоптичних клітин у зазначеній структурі головного мозку зросла практично в 5 разів ( $p < 0,05$ ). Призначення тваринам з ЕАЕ метилпреднізолону приводило до достовірно значущого підвищення щільності нейронів сенсомоторної кори на 3% ( $p < 0,05$ ) і зменшення їх площі на 8% ( $p < 0,05$ ), що свідчило про прямий нейропротективний ефект гормональної терапії. Слід зазначити, що призначення метилпреднізолону в монотерапії не впливало на функціональні характеристики нейронів (рівень РНК практично не змінювався) і не впливало на показники нейроапоптозу [392].

Показано, що призначення тваринам з ЕАЕ комбінованої терапії метилпреднізолону і цитиколіну підвищувало ефективність нейропротекції. Зокрема, у щурів з експериментальною патологією, які отримували комбінацію метилпреднізолону і цитиколіну, щільність нейронів підвищилася на 9,4% ( $p < 0,05$ ), а їх площа досягла значень інтактних тварин; при цьому концентрація РНК зросла на 8,7%. За впливом на деякі морфо-функціональні показники Цитиколін з МП достовірно перевершує монотерапію МП. До того ж, за даних умов експерименту щільність апоптичних і деструктивних клітин зменшилася на 19,5% ( $p < 0,05$ ), а частка апоптичних нейронів знизилася на 42% ( $p < 0,05$ ). Для цитиколіну характерна наявність вираженого мітопротективного ефекту, що може лежати в основі його нейропротективного ефекту. У роботах І. Ф. Беленічева і співавт. показано, що цитиколін може зберігати цілісність внутрішньої мембрани мітохондрії, про що свідчить відновлення її потенціалу. Подібний механізм пов'язаний з відновленням рівня кардіоліпіну у внутрішній мембрані мітохондрій. Крім цього, виявлено, що цитиколін опосередковано, шляхом збільшення активності глутатіон-пов'язаних ферментів (глутатіон-редуктаза і глутатіон-трансфераза) регулює рівень відновленого глутатіону.

Показано, що призначення тваринам з ЕАЕ комбінованої терапії метилпреднізолону і інтраназального гелю ноопепту підвищувало ефективність нейропротекції (табл. 8.7).

Таблиця 8.7

**Оцінка показників апоптозу нейронів сенсомоторної зони головного мозку щурів в умовах ЕАЕ,  $M \pm m$ ,  $n=10$**

Експериментальні групи	Щільність апоптичних і деструктивно змінених клітин на 1 мм <sup>2</sup>	Доля апоптичних клітин, %
Інтактна	59,4±6,89	3,4±0,96
ЕАЕ (контроль)	148,0±16,4	15,7±1,7
ЕАЕ + МП	141,6±11,0	15,0±1,0
ЕАЕ + МП + цитиколін	119,2±9,68* <sup>2</sup>	9,0±1,0* <sup>2</sup>
ЕАЕ + МП + Ноопепт	100,1±7,22* <sup>1</sup>	8,7±0,7* <sup>2</sup>

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  відносно групи контролю; 1 –  $p \leq 0,05$  відносно групи цитиколіну; 2 –  $p \leq 0,05$  відносно групи метилпреднізолону

Зокрема, у щурів з експериментальною патологією, які отримували комбінацію метилпреднізолону і ноопепту, щільність нейронів підвищилася на 14,7% ( $p < 0,05$ ), а їх площа досягла значень інтактних тварин; при цьому концентрація РНК зросла на 9,2%. До того ж, за даних умов експерименту, ноопепт зменшував щільність апоптичних і деструктивних клітин на 32,4% ( $p < 0,05$ ) по відношенню до контролю і МП, а частку апоптичних нейронів на 44,6% ( $p < 0,05$ ). За ступенем впливу на щільність нейронів і щільність апоптичних і деструктивно-змінених нейронів сенсомоторної зони кори щурів з ЕАЕ гель «Ноопепт» з МП достовірно перевершує Цитиколін з МП і монотерапію МП. Більш висока, за деякими показниками, нейропротективна, ноотропна, анксиолітична активність гелю Ноопепт обумовлена його інтраназальним шляхом введення. При інтраназальному введенні речовин

значна їх частина всмоктується в кров, менша – за допомогою периневрального транспорту по чутливих нервах потрапляє безпосередньо в мозок, через нейрони нюхового тракту і далі поширюється по структурах головного мозку за допомогою механізмів, які пов'язані з кровотоком, при цьому відсутній пресистемний метаболізм в шлунково-кишковому тракті і печінці, швидше досягається терапевтичний ефект, тобто присутня можливість прямого надходження ліків безпосередньо в мозок. Механізми, що беруть участь в доставці речовин з носової порожнини в мозок, вивчені недостатньо, але відомо кілька шляхів: внутрішньоклітинний аксональний транспорт по нюховому нерву, по підтримувальних епітеліальних клітинах, екстранейрональний транспорт уздовж нюхового нерва. Пептидам, ймовірно, більш притаманний екстранейрональний транспорт уздовж нюхового нерва, за допомогою якого короткі пептидні молекули можуть потрапляти безпосередньо в нервову тканину по міжклітинному просторі через щілинні контакти між клітинами і нюховими нейронами. Нейропротективну дію гелю ноопепту пов'язують з підвищенням експресії мРНК HIF-1 і HSP<sub>70</sub>. Нами були проведені додаткові дослідження по виявленню впливу препаратів на концентрацію HSP<sub>70</sub> в головному мозку тварин з ЕАЕ.

*Вплив препаратів на утримання HSP<sub>70</sub> в головному мозку тварин з ЕАЕ.*

Останнім часом з'явилися дані про захисну роль білків теплового шоку при церебральній ішемії, що супроводжується інтенсифікацією процесів вільнорадикального окислення, зміщенням тіол-дисульфідної рівноваги, розвитком нітрозуючого стресу, глутаматної ексайтотоксичності [393]. Виявлено зниження білка теплового шоку HSP<sub>70</sub> в головному мозку експериментальних тварин з ЕАЕ [394] (табл. 8.8).

Так, в групі нелікованих тварин спостерігалось зниження рівня HSP<sub>70</sub> на 76,6% і 65,2% відповідно в цитозольних мітохондріальних фракціях гомогенату головного мозку на 18 добу експерименту в порівнянні з аналогічними показниками групи інтактних. Курсове призначення тваринам з ЕАЕ

метилпреднизолону не приводило до достовірного підвищення HSP<sub>70</sub> в цитоплазмі і мітохондріях головного мозку щурів.

Таблиця 8.8

**Вплив препаратів на неврологічний статус і рівень HSP<sub>70</sub> тканинах головного мозку тварин з НМК на 18-ту добу експерименту**

Група тварин	HSP <sub>70</sub> , у.о./ г білку	
	мітохондріальна фракція	цитозольна фракція
Інтактна	7,7±0,16	16,4±0,21
ЕАЕ (контроль)	1,8±0,10	5,3±0,32
ЕАЕ + МП	1,9±0,31	5,5±0,24
ЕАЕ + МП + цитиколін	2,7±0,10* <sup>2</sup>	8,7±0,32* <sup>2</sup>
ЕАЕ + МП + ноопепт	4,0±0,14* <sup>12</sup>	11,2±0,52* <sup>12</sup>

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  відносно групи контролю; 1 –  $p \leq 0,05$  відносно групи цитиколіну; 2 –  $p \leq 0,05$  відносно групи метилпреднізолону

Введення цитиколіну з МП призводило до підвищення HSP<sub>70</sub> на 50% і 64% відповідно в мітохондріях і цитозолі нейронів головного мозку щурів з ЕАЕ. Курсове введення гелю ноопепту з МП сприяло нормалізації рівня цього показника, що свідчить про його протективні властивості і здатності запобігати пригніченню експресії гена HSP<sub>70</sub> в нейронах. При курсовому введенні гелю ноопепту концентрація білка HSP<sub>70</sub>, в цитоплазмі гомогената головного мозку тварин, підвищувалася на 111%, а в мітохондріях на 122% разів у порівнянні з показниками контролю. Отримані дані свідчать про активацію експресії HSP<sub>70</sub> в нейронах під дією інтраназального гелю Ноопепт. Так як цей білок відноситься до сімейства білків теплового шоку і володіє шаперон-активністю, підвищення його рівня відіграє значну роль в нормалізації життєдіяльності клітин і

запобігання розвитку апоптозу і некрозу в умовах нейродегенеративних захворювань [394].

HSP<sub>70</sub> проявляє антиапоптичну дію при церебральній ішемії за рахунок блокади пускового рецептора апоптозу Fas/Apo-1 і інгібування стрес-кінази JNK. Крім того, HSP<sub>70</sub> проявляє антиапоптичну дію за рахунок руйнування зв'язку цитохрому С з іпроапоптичним білком Араф-1 в мітохондрії [393]. HSP<sub>70</sub> нормалізує глутатіонову ланку тіол-дісульфіної системи, здатен підвищувати глутатіон-залежні механізми ендогенної нейропротекції (перешкоджає неконтрольоване відкриття мітохондріальної пори, підтримує заряд мембрани мітохондрії, знижує ексайтотоксичність за рахунок зменшення гіперзбудливості NMDA) [395]. Відомо, що ноопепт викликає зміни ДНК-зв'язуючої активності фактора 1 теплового шоку (HSF1) і може призводити до збільшення концентрації HSP<sub>70</sub>. Також ноопепт значно підвищує ДНК-зв'язуючу активність фактора HIF-1. HSP<sub>70</sub> здатен пролонгувати час «життя» HIF-1. Фармакологічна модуляція пов'язаної системи HIF-1/HSP<sub>70</sub> розглядається, нині, як один з основних напрямків нейропротекції, спрямованої на підвищення ендогенних механізмів підвищення резистентності нейронів при гіпоксії, ішемії мозку, нейродегенеративних захворювань [396].

*Нейропротективна активність гелю з ноопептом при експериментальних кетамін-індукованих когнітивно-мнестичних порушеннях.* Загальна анестезія може бути причиною виникнення в післяопераційному періоді ушкоджень ЦНС, серед яких особливе місце займає післяопераційна когнітивна дисфункція, яка може розвинути у хворих різних вікових груп і в випадках з необтяженим психоневрологічним анамнезом. В останньому огляді літератури, яке охопило 80 самостійних досліджень, наведена частота ПОКД за даними різних авторів, яка становить: в середньому – 36,8%, після кардіохірургічних операцій – від 3 до 47%, при цьому у 42% навіть через 3-5 років після операції, після некардіохірургічних операцій – від 7% до 26%, при цьому у 9,9% через 3 місяці і більше, у 1% хворих – понад 2 роки [397]. Важливо відзначити, що порушення когнітивних функцій після

загальнохірургічних втручань, виконаних в умовах загальної анестезії, спостерігалися у всіх вікових групах хворих. Доведено, що рання післяопераційна когнітивна дисфункція є головним предиктором стійкої післяопераційної когнітивної дисфункції у осіб похилого віку. Остання погіршує якість життя хворих, ускладнюючи виконання ними своїх професійних і соціальних функцій на доопераційному рівні [398]. Крім того, відзначається все зростаючий інтерес до потенційних відносин між дією окремих загальних анестетиків і початком розвитку хвороби Альцгеймера. Не можна не відзначити і той факт, що в останні роки саме післяопераційна когнітивна дисфункція є основною причиною судових позовів в США до анестезіологів. Найбільш уразливими до дії загальних анестетиків є функція уваги, короткострокова пам'ять, швидкість психомоторних і когнітивних реакцій. Разом з тим в літературі лише деякі роботи присвячені застосуванню нейропротективних препаратів для профілактики і лікування нейрокогнітивних розладів в післяопераційному періоді [399]. Попереджуюча нейропротективна терапія, поряд з вибором адекватного варіанту анестезії, своєчасної корекції порушень гемодинаміки, газообміну і гомеостаза, набуває найважливіше значення для запобігання ушкоджень нейронів або усунення вже виниклої когнітивної дисфункції в ранньому післяопераційному періоді, коли ці зміни ще потенційно оборотні [400, 401]. Впливаючи на перебіг церебрального метаболізму, вона попереджає або перериває патологічні каскади, що викликають дисфункцію або загибель нейронів. Особливе місце в нейропротекції займають препарати нейрометаболическої дії – ноотропи. Ноотропи здійснюють прямий активуючий вплив на навчання, поліпшують пам'ять і розумову діяльність, а також підвищують стійкість мозку до агресивних дій гіпоксії, травм, інтоксикації [402]. Найбільш поширеним і вивченим серед них є пірацетам, який володіє багатогранною дією. Його швидкий метаболічний ефект обумовлений активацією енергетичного метаболізму і окислювально-відновних процесів, а пролонгований –

збільшенням пластичності мозкової тканини за рахунок підвищення чутливості рецепторів до нейротрансмітерів [403].

Інтерес представляє і нейротрофічний церебропротектор-цереброкурін нейропептидний препарат нового покоління, отриманий з ембріонів великої рогатої худоби. Також в якості перспективного ноотропа для корекції післяопераційної когнітивно-мнестичної дисфункції можна розглядати і ноопепт, нейропротекторну дію якого має комплексний механізм, здатний протидіяти глутаматній ексайтотоксичності при ішемії головного мозку, а також тривалих впливах стресових факторів, розумовому і емоційному перенапруженні, інтоксикаціях [347, 348, 404]. Виходячи з вищевикладеного доцільно оцінити нейропротективну дію Цереброкуруину, гелю ноопепту і обґрунтувати їх застосування в клініці для корекції когнітивно-мнестичних і поведінкових порушень після кетамінової анестезії.

При оцінці специфічних показників методики «відкрите поле» було виявлено, що кетамінова анестезія негативно впливала на поведінкові характеристики тварин. Введення кетаміну не приводило до достовірного підвищення пройденої відстані тваринами на 2 добу після анестезії, однак, в 8,97 разів збільшувало вільну відстань в абсолютних одиницях і в 11 разів у відсотках від загальної рухової активності. Також у тварин контрольної групи виявлено збільшення в 1,86 разів кількості завмирань і в 1,5 разів збільшення нерухомості тварин. Всі ці факти свідчать про формування тривожності і збудливості у тварин після кетамінової анестезії. Введення кетаміну не впливало на кількість вільних стійок тварин, але приводило до збільшення в 2 рази стійок біля стінки [405].

Також в 2 рази знижувалася кількість актів короткого грумінгу на фоні незміненої кількості тривалого грумінгу. Даний факт також свідчить про підвищену тривожність, збудливість, подразливість тварин, зниженні почуття комфорту. У тварин контрольної групи відзначали підвищення в 2 рази високої активності, що свідчило про високу емоційність і збудливість тварин. Підвищення високої активності також може розцінюватися як зниження

здатності до дослідницької та пошукової діяльності, так як щур робить надмірну кількість «зайвих» рухів і вимагає більше часу для засвоєння нової обстановки. При оцінці специфічних показників навчання, в радіальному лабіринті, було виявлено, що через 10 діб після кетамінової анестезії у тварин спостерігалася когнітивна дисфункція. Загальна активність тварин цієї групи не мала достовірних відмінностей з групою контролю.

При відтворенні результатів навчання тварин було встановлено, що на 10 добу після введення кетаміну збільшується в 3,25 разів кількість помилок робочої пам'яті в 1,5 рази – кількість помилок референтної пам'яті, що свідчило про порушення мнестичних функцій у тварин після кетамінової анестезії. Отримані нами дані лежать в руслі концепції післяопераційної когнітивної дисфункції. Кетамінова анестезія призводить до формування стійкого когнітивного дефіциту, а також психо-емоційних порушень – загальмованість, страх, тривожність, дезорієнтація, агресивність, подразливість. Застосування кетаміну у літніх людей може погіршувати олігомеризацію і депонування амілоїдного бета-протеїну і таким чином викликати довгострокові когнітивні ефекти [406].

Однією з головних причин порушення когнітивних функцій, після операцій, вважають нейротоксичну дію кетаміну, яка полягає в пригніченні глутаматної трансмісії, та синаптогенезу, виснаження енергетичного балансу синапсу і порушення механізмів зворотного захоплення нейротрансмітерів, а також ініціювання механізмів циркуляторної ішемії (гіпоциркуляція, зміна перфузії мозку, внутрішньочерепний тиск) [407]. Введення відразу після виходу тварин з наркозу ноотропних препаратів – пірацетаму, гелю ноопепту і цереброкуруину по-різному впливало на поведінкові реакції, емоційний статус і когнітивно-мнестичні функції тварин. Так, пірацетам збільшував вільну відстань в 10,37 разів в порівнянні з інтактною групою і в 1,16 разів у порівнянні контролем. Введення пірацетаму не знижувало кількість завмирань (в 1,4 рази вище інтактного значення) і неактивності. Підвищеним залишається і кількість стійок біля стінки під дією пірацетаму (в 1,75 раз) в порівнянні з



інтактом, а кількість актів короткого грумінгу залишається на рівні контролю (в 2 нижче інтактного значення), а також низьким (в 1,5 рази) залишається кількість дефекацій.

Ці факти свідчать про те, що пірацетам не знижує, а в деякому значенні, підвищує тривожність, страх і збудливість і некомфортний стан у тварин на 2 добу після кетамінової анестезії. Також пірацетам не чинить позитивного впливу на показники когнітивно-мнестичних функцій, тому що на 10 добу після кетамінової анестезії не знижувалися помилки робочої і референтної пам'яті. Ці дані узгоджуються з даними інших дослідників, про те що пірацетам за рахунок стимуляції адренергічних структур мозку може посилити тривожність, агресивність, дратівливість, збудливість і порушення сну. Введення тваринам, після кетаміну, цереброкуруину, надавало позитивний ефект відносно емоційного статусу і поведінки тварин у відкритому полі після кетамінової анестезії. Таким чином, цереброкурин знижував тривожність і збудливість, про що свідчить достовірне зниження вільного простору, кількості завмирань і стійок біля стінки. При цьому цереброкурин не впливав на комфортність тварин (грумінг, дефекація). Цереброкурин в 5 разів знижував нерухомість, що також можна розцінювати як анксиолітичний ефект препарату. При цьому цереброкурин призводить до підвищення високої активності (в 1,8 разів у порівнянні з інтактен і в 1,67 разів у порівнянні з контролем) і зниження неактивності (в 2,3 рази в порівнянні з інтактен і в 1,7 разів в порівнянні з контролем), що може розцінюватися як зниження здатності до дослідницької активності і підвищення збудливості тварин.

Цереброкурин значно (в 2,6 раз) знижував кількість помилок робочої пам'яті і (в 1,5 раз) кількості референтної пам'яті на 10 добу після кетамінової анестезії. Інтраназальне введення гелю ноопепту тваринам після кетамінової анестезії призводило до зниження тривожності, страху і збудливості (зниження вільного простору в 2,3 рази, завмирань в 2,18 рази, стійок біля стінки в 1,6 раз і нерухомості в 3 рази в порівнянні з контролем). За цими показниками ноопепт

достовірно перевершує як значення контрольної групи, так і значення пірацетама.

Цереброкурин містить пептиди, що несуть в собі програму аналізу стану і будівництва ЦНС. Тому, кінцевий ефект цереброкуруну різниться внаслідок якісно відмінного від інших нейропротекторів механізму дії. Захисні ефекти цереброкуруну на тканину мозку включають його оптимізуючу дію на енергетичний метаболізм мозку і гомеостаз кальцію, стимуляцію внутрішньоклітинного синтезу білка, уповільнення процесів глутамат-кальцієвого каскаду і окисної модифікації білка [408]. Ефекти цереброкуруну, пов'язані з підвищенням пластичності нейронів, можуть спиратися в своїй дії не тільки на мембранну фракцію пептидів, а й на гетерогенну фракцію нейронспецифічних ліпідів [409].

Інтраназальне введення гелю ноопепту здійснювало значну нейропротективну дію. Ноопепт не впливав на показники комфортності тварин. Ноопепт підвищував дослідницьку активність тварин, знижуючи високу (непродуктивну) активність і підвищуючи низьку (в 1,2 рази) активність. За впливом на показники низької активності ноопепт достовірно перевершував як показник контролю, так і показники пірацетама і цереброкуруну. Ноопепт в 6,5 разів знижував кількість помилок робочої пам'яті після кетамінової анестезії і за цим показником достовірно перевершував як показник контролю, так і показники пірацетама і цереброкуруну. Ноопепт при інтраназальному введенні також в 3 рази знижував кількість помилок референтної пам'яті. Ці факти свідчать про високий антиамнестичний ефект гелю ноопепту після кетамінової анестезії. Ноопепт має антиоксидантну дію, зменшуючи окислювальну деструкцію білкових молекул в т. ч. і білків пам'яті, а також знижує накопичення маркерів нітрозативного стресу, що перешкоджає загибелі нейронів. Нейропротективна дія гелю ноопепту пов'язана і з пригніченням експресії прозапальних інтерлейкінів (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), а також за рахунок нормалізації глутаматної і дофамінової трансмісії [410].

Ноопепт при одноразовому і курсовому введенні покращує дослідницьку та пошукову активність. Ноотропний ефект препарату пов'язаний з утворенням

циклопролілглїцину, який аналогічний за структурою до ендogenousного циклічного дипептиду та володіє антиамнестичною активністю, а також наявністю холінопозитивної дії. Крім того, ноопепт здатний позитивно впливати на механізми довготривалої пам'яті за рахунок гальмування окисної модифікації білків пам'яті, а також їх «випрямлення», використовуючи HSP<sub>70</sub>-механізми [347, 348, 402].

Таким чином, кетамінова анестезія призводить до підвищення тривожної поведінки тварин, збудливості (підвищення тривалості неактивності і кількості випадків завмирання, збільшення вільного простору, кількості стійок біля стінки, зниження грумінгу і дефекацій), а також погіршення дослідницької та пошукової активності на 2 добу, а також в більш віддалені терміни (10 доба) призводить до погіршення мнестичних функцій (збільшення кількості помилок референтної і робочої пам'яті).

Парентеральне введення пірацетаму не надавало достовірного впливу на тривожну поведінку і збудливість тварин і не впливало на здатність до навчання і пам'ять тварин після кетамінової анестезії. Парентеральне введення Цереброкуруину тваринам після кетамінової анестезії достовірно знижувало показники тривожної поведінки тварин, а також надавало антиамнестичний ефект (достовірне зниження помилок робочої пам'яті), але не впливало на здатність тварин до навчання.

Інтраназальне введення гелю ноопепту тваринам після кетамінової анестезії достовірно знижувало показники тривожної поведінки і збудливості тварин (зниження кількості завмирань і неактивності, вільного простору, стійок біля стінки), підвищувало дослідницьку активність, проявляло виражений антиамнестичний ефект (зниження помилок референтної і робочої пам'яті) і підвищувало здатність тварин до навчання (зниження високої і підвищення низької активності). За ступенем впливу на показники когнітивно-мнестичних функцій ЦНС ноопепт достовірно перевершує як пірацетам, так і цереброкурін (табл. 8.9).

Таблиця 8.9

**Вплив гелю ноопепту, цереброкуруину і пірацетаму на орієнтовно-дослідницьку активність, навчання і пам'ять щурів після кетамінової анестезії**

Показник	Інтакт	Контроль (кетамінова анестезія)	Кетамінова анестезія + цереброкурин	Кетамінова анестезія + пірацетам	Кетамінова анестезія + гель ноопепту
1	2	3	4	5	6
<b>Радіальний лабіринт</b>					
Загальна активність, см <sup>2</sup> /с	24380,98±1242,43	26867,58±1543,58	44862,35±2686,54 <sup>1,2</sup>	27552,12±1233,12 <sup>1</sup>	34863,66±3082,05 <sup>1</sup>
Кількість помилок референтної пам'яті	2	3	2 <sup>2</sup>	3 <sup>1</sup>	1 <sup>1,2</sup>
Кількість помилок робочої пам'яті	4±1	13±1 <sup>1</sup>	5±1 <sup>2</sup>	12±1 <sup>1</sup>	2 <sup>1,2,3,4</sup>
<b>Відкрите поле</b>					
Кількість входжень в центр, од.	1	2	1±1	2	1
Висока активність, %	7,83±1,44	14,83±2,07 <sup>1</sup>	21,83±1,58 <sup>1,2</sup>	12,22±1,21 <sup>1</sup>	10,50±1,45 <sup>2,3</sup>
Низька активність, %	61,71±7,08	65,83±4,03	65,17±3,69	66,22±7,44	78,30±1,59 <sup>1,2,3,4</sup>
Неактивність, %	30,47±6,59	22,34±4,37	13,00±4,64 <sup>1</sup>	21,22±9,11	11,20±0,67 <sup>1,2</sup>

Продовж. табл. 8.9

1	2	3	4	5	6
Нерухомість, од	284±35	429±27 <sup>1</sup>	85±21 <sup>1,2,4</sup>	434±33 <sup>1</sup>	138±17 <sup>1,2,4</sup>
Пройдена відстань, см	4161,82±290,78	4202,03±779,10	3094,16±346,50	4013,25±422,36	3916,56±1124,48
Вільна відстань, см	59,37±26,31	529,76±215,98 <sup>1</sup>	323,64±88,71 <sup>1</sup>	612,12±55,43 <sup>1,2</sup>	226,10±33,44 <sup>1,2,4</sup>
Завмирання, од	284±35	529±27 <sup>1</sup>	374±32 <sup>2</sup>	398±21 <sup>1</sup>	242±28 <sup>2,4</sup>
Вільна відстань, %	1,43±0,61	11,30±2,67 <sup>1</sup>	8,92±2,01 <sup>1</sup>	12,74±2,00 <sup>1</sup>	7,06±1,20 <sup>1,2,4</sup>
Відстань у стінки, см	4102,44±289,55	3672,27±612,74	2770,53±281,43	3700,82±732,90	3690,16±1105,34
Стійка у стінки, од	4±1	8±1 <sup>1</sup>	5±1 <sup>2</sup>	7±1 <sup>1</sup>	5±1
Стійка вільна, од	2	2±1	1	1±1	1±1
Грумінг короткий, од	2±1	1	1	1±1	1
Грумінг тривалий, од	1	1	1	1	1
Дефекація, од	3	2	2±1	2	1 <sup>1,2</sup>
Уринація, од	1±1	1	1	1	2

Примітка. 1 –  $p < 0,05$  відносно групи інтакта; 2 –  $p < 0,05$  відносно групи контролю; 3 –  $p < 0,05$  відносно групи цереброкуруну; 4 –  $p < 0,05$  відносно групи пірацетаму

Отримані результати є експериментальним обґрунтуванням для проведення клінічних досліджень інтраназального гелю ноопепту, розробленого за допомогою нової інформаційної технології, для корекції тривожної поведінки і збудливості і когнітивно-мнестичної дисфункції після кетамінової анестезії.

8.2 Дослідження нейропротективних властивостей назального гелю з рецепторним антагоністом інтерлейкіна-1 $\beta$  (IL-1Ra, RAIL) в умовах порушень мозкового кровообігу за типом ішемічного інсульту

8.2.1 Дослідження нейропротективних властивостей назального гелю з рецепторним антагоністом інтерлейкіна-1 $\beta$  (IL-1Ra, RAIL) в умовах хронічної церебральної ішемії. Незважаючи на значні успіхи сучасної медицини, проблема порушень мозкового кровообігу продовжує залишатися актуальною. В останнє десятиліття реєструється постійне збільшення цереброваскулярних захворювань, особливо, ішемічного інсульту [411]. З 90-х років минулого століття в комплексній терапії порушеннях мозкового кровообігу (ПМК) застосовуються первинні і вторинні нейропротектори (модулятори NMDA, блокатори Ca<sup>2+</sup>, ноотропи, антиоксиданти і т. д.). Однак, більшість з них не дають очікуваного нейропротективного ефекту. Тому актуальним є вивчення тонких молекулярно-біохімічних механізмів пошкодження головного мозку при ПМК, пошук нових перспективних мішеней для таргетної нейропротекції [310]. Аналіз динаміки патогенетичних механізмів, що запускаються ішемією мозку, встановив їх чітку тимчасову послідовність. Протягом перших 3 год з моменту ГПМК максимально представлений енергетичний дефіцит в ішемізованій тканині, через 3-6 год розвивається глутаматна «ексайтотоксичність», порушення кальцієвого гомеостазу і лактат-ацидозу, які згасають до кінця першої доби. Віддалені наслідки ішемії, такі як оксидантний, нітрозативний стрес і локальне

запалення починають проявлятися через 2-3 год, досягають максимуму через 12-36 год, а на 2-3 добу починається нейроапоптоз [411].

У відповідь запускаються компенсаторні механізми ендогенної нейропротекції серед яких особливий інтерес представляють білки теплового шоку HSP<sub>70</sub> і тіол-дисульфідна система [413]. Інтермедіат тіол-дисульфідної системи глутатіон є важливим компонентом захисту нейрона, підвищує його стійкість до гіпоксії, обмежує гіперзбудливість NMDA, виступає в якості резерву цистеїну в клітині, регулює синтез і стабільність HSP<sub>70</sub>, бере участь в NO- і IL-1 $\beta$ - залежних механізмах апоптозу [414]. У досліджах *in vitro* виявлено, що депривація рівня глутатіона в нейронах призводить до падіння HSP<sub>70</sub>, а в умовах моделювання порушень мозкового кровообігу виявлений кореляційний взаємозв'язок між виразністю неврологічних порушень і дефіцитом глутатіона і HSP<sub>70</sub> в головному мозку тварин. Серед механізмів вторинного пошкодження головного мозку особливе значення мають реакції локального запалення навколо зони «ядра» інфаркту, які супроводжують різким підйомом рівня прозапальних цитокінів, зокрема IL-1 $\beta$  [415]. При взаємодії IL-1 $\beta$  з рецепторами активуються фактори ядерної транскрипції AP-1 і NF- $\kappa$ B, які змінюють поведінку клітин-мішеней і призводять до розвитку гострофазної клітинної відповіді, експресії інших прозапальних факторів, стимуляції астроцитами експресії iNOS і цитотоксичних похідних NO, підвищення проникності мітохондріальної пори і ініціації нейроапоптозу [416].

Виявлено кореляційний взаємозв'язок між підвищенням рівня прозапальних цитокінів (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8), ступенем тяжкості неврологічних порушень і дефіцитом ростових факторів (BDNF, IGF-1, PDGF). Сигнальний шлях з IL-1 $\beta$ , спрямований на посилення відстрочених механізмів загибелі нейронів після ГПМК може регулюватися HSP<sub>70</sub> [417]. Підвищення концентрації HSP<sub>70</sub> в межах фізіологічної норми призводить до підвищення IL-1 $\beta$  до рівня, необхідного для участі в цито- і нейропротекції, дефіцит HSP<sub>70</sub> може спричинити значну експресію IL-1. Надекспресія HSP<sub>70</sub> послаблює експресію IL-1 $\beta$  за рахунок пригнічення факторів транскрипції C/EBP $\beta$  і

C/EBP $\delta$ . HSP<sub>70</sub> може запобігати продукції запальних цитокінів шляхом втручання в NF- $\kappa$ B-залежну транскрипцію. Відомо, що підвищена продукція TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 і IL-8 відбувається на тлі дефіциту глутатіона. Глутатіон і його попередник N-ацетилцистеїн здатні модулювати NF $\kappa$ B, знижувати експресію IL-1 $\beta$  і проявляти протизапальну дію. IL-1 $\beta$  в залежності від концентрації може регулювати транспорт глутатіона і впливати на механізми нейропротекції / нейродеструкції [366, 418].

Рациональна нейропротекція передбачає переривання каскадних механізмів загибелі нейронів, що і визначає IL-1b як важливу мету фармакологічного впливу. В даний час отримані переконливі дані про нейропротективні дії антагоніста IL-1b-IL-1Ra. Отримано дані, що парентеральне введення IL-1Ra тваринам з ГПМК призводить до зниження летальності, зменшення неврологічних порушень, а також зменшення зони інфаркту мозку, підвищення щільності нейронів сенсомоторної зони і гіпокампу [419-421]. З метою уточнення механізму дії IL-1Ra, з урахуванням відомих зв'язків між експресією IL-1b, рівнем глутатіона і HSP<sub>70</sub>, видається цікавим визначити спрямованість і вираженість впливу цього антагоніста IL-1b на показники тіол-дисульфідної системи і концентрацію HSP<sub>70</sub> в умовах експериментальної хронічної церебральної ішемії. Інтерес фармакологів і клініцистів представляє і нова лікарська форма з IL-1Ra – РАІЛ – гель для інтраназального застосування.

Результати проведених досліджень вказують на те, що формування хронічної церебральної ішемії у щурів призводить до зміщення тіол-дисульфідної системи у вигляді зменшення пулу її відновлених форм і зниження активності глутатіон пероксидази, глутатіон-S-трансферази і глутатіонредуктази ( $p < 0,05$ ) цитозольних фракцій аж до 18 діб експерименту в порівнянні з показниками умовнооперованих тварин (табл. 8.9-8.10).



Таблиця 8.9

**Вплив IL-1Ra і цитиколіну на стан ферментативної ланки  
тіол-дисульфідної системи в головному мозку тварин з хронічною  
церебральною ішемією на 18-ту добу експерименту**

Групи тварин, n=20	ГР, мкмоль/мг білку /хв	ГПР, мкмоль/мг білку /хв	Г-S-T, мкмоль/мг білку /хв
Умовнооперовані	19,5±1,35	61,8±2,9	15,8±1,07
ХЦІ (контроль)	5,2±0,42 <sup>#</sup>	34,2±1,54 <sup>#</sup>	6,1±0,57 <sup>#</sup>
ХЦІ + цитиколін, 500 мг/кг	8,2±0,45* <sup>#</sup>	48,8±3,14*	5,2±0,72 <sup>#</sup>
ХЦІ+ IL-1Ra, 1 мг/кг	10,2±0,71*	57,5±2,72*	14,5±1,11* <sup>1</sup>

Примітка. <sup>#</sup> – p<0,05 відносно групи ложнооперовані тварин; \* – p <0,05 відносно групи контролю; <sup>1</sup> – p <0,05 відносно групи цитиколіну

Таблиця 8.10

**Вплив IL-1Ra і цитиколіну на стан неферментної ланки  
тіол-дисульфідної системи в головному мозку тварин з ХЦІ  
на 18-ту добу експерименту**

Групи тварин, n=10	SH-групи, мкмоль/ г тканини	SS-групи мкмоль/ г, тканини	Глутатіон відн., мкмоль/ г тканини	Глутатіон окисн., мкмоль/ г тканини
Ложнооперовані	57,3±2,8	3,5±0,2	4,3±0,23	0,033±0,008
ХЦІ (контроль)	24,4±1,2 <sup>#</sup>	7,2±0,42 <sup>#</sup>	1,62±0,05 <sup>#</sup>	0,066±0,005 <sup>#</sup>
ХЦІ + цитиколін, 500 мг/кг	30,4±2,8*	6,4±0,51 <sup>#</sup>	2,20±0,10* <sup>#</sup>	0,060±0,004 <sup>#</sup>
ХЦІ + IL-1Ra, 1 мг/кг	38,6±3,8*	4,5±0,38* <sup>1</sup>	3,24±0,22* <sup>1</sup>	0,042±0,003* <sup>1</sup>

Примітка. <sup>#</sup> – p<0,05 відносно групи ложнооперованих тварин;  
\* – p <0,05 відносно групи контролю; <sup>1</sup> – p <0,05 відносно групи цитиколіну

Зниження рівня глутатіона ( $p < 0,05$ ) в головному мозку у щурів з НМК, в порівнянні показниками умовнооперованих тварин, може бути наслідком порушення його синтезу, пов'язаного з порушенням тканинного дихання, обумовленого ішемією, а також витрачанням в неензиматичних реакціях і реакціях, що каталізують ГПР, спрямованих на «утилізацію» вільних радикалів і перекисів [422]. Іншою причиною, зменшення пулу внутрішньоклітинного глутатіону, може виявлений нами бути дефіцит цистеїну (-63,8%), внаслідок його активного використання в якості антиоксиданту [423].

На цьому фоні характерним було достовірне підвищення рівня гомоцистеїну при зниженні концентрації метіоніну. Гомоцистеїн є нейротоксичною сірковмісною проміжною ланкою метаболізму метіоніну, пригнічує експресію eNOS і збільшує вироблення АФК за рахунок вивільнення арахідонової кислоти з тромбоцитів, пригнічує ГПР і ГР. Підвищена концентрація гомоцистеїну стимулює шляхи внутрішньоклітинної передачі сигналів, включаючи модифікації рецепторів, індукцію різних кіназ, наприклад мітоген, який активує білок (MAP) і включення нейроаптозу, а також підсилює ексайтотоксичність за рахунок стимуляції NMDA і AMPA [424].

На фоні курсового інтраназального введення IL-1Ra відзначені виражені зміни, які характеризувалися значним на 58,2% збільшенням відновлених інтермедіатів тіол-дисульфідної системи і підвищенням на 100% рівня глутатіона, на фоні зниження вмісту його окисленої форми на 36,3% в порівнянні з показниками контролю. Важливим було те, що збільшення рівня глутатіона в групі, що одержувала IL-1Ra, відбувалося на фоні збільшення цистеїну (+143%). Подібні за спрямованістю зміни були відзначені і при використанні цитиколіну, однак параметри зафіксованих значень в цій групі, по виразності поступалися показникам групи тварин з введенням IL-1Ra. Застосування IL-1Ra також призводило і до зниження вмісту в тканинах мозку нейротоксичних речовин – нітротирозину і гомоцистеїну на 42,7% і 51,7% відповідно (табл. 8.11). При цьому зниження гомоцистеїну реєстрували на фоні

підвищення метіоніну на 101,6%. IL-1Ra підвищував активність ГР на 96,1%, ГПР на 68,1%, а GST на 137,7% відносно показників контролю.

Збільшення функціональності системи глутатіону, а також підвищення активності глутатіон-залежних ферментів не тільки призводить до посилення захисту головного мозку від нейротоксичних продуктів оксидативного і нітрозативного стресу, але і може запустити GSH-залежні механізми ендогенної нейропротекції [423]. Збільшення функціональності тіол-дисульфідної системи в умовах ПМК і збільшення його відновлених інтермедіатів, під впливом IL-1Ra, може сприяти підвищенню біодоступності NO і зменшення його перетворення в цитотоксичний пероксинітрит, а також зменшує активність реакцій нітрозативного стресу, що проявлялося у вигляді вираженого зниження рівня нітротирозину [425].

Таким чином, одним з ланок нейропротективної дії гелю IL-1Ra в умовах експериментального ПМК є його позитивний вплив на показники тіол-дисульфідної системи і, особливо, її глутатіонової частини.

Виявлено зниження рівня білка теплового шоку HSP<sub>70</sub> в цитоплазмі і мітохондріях ( $p < 0,05$ ) головного мозку експериментальних тварин (табл. 8.12). При курсовому інтраназальному введенні гелю IL-1Ra концентрація білка HSP<sub>70</sub> в цитоплазмі гомогената головного мозку тварин підвищувалася на 98,4%, а в мітохондріях на 142,8% разів у порівнянні з показниками контролю (табл. 8.12). Отримані дані свідчать про можливий вплив IL-1Ra на HSP<sub>70</sub>-залежні механізми ендогенної нейропротекції при церебральній ішемії. Ймовірно, IL-1Ra, блокуючи IL-1b, здатний регулювати експресію HSP<sub>70</sub> і GSH. Це новий і перспективний, з огляду на концепцію таргетованої нейропротекції, механізм дії IL-1Ra. HSP<sub>70</sub> блокує пусковий рецептор апоптозу Fas/Apo-1, пригнічує апоптоз в мітохондріях на етапі між вивільненням цитохрому C і розщепленням прокаспазини-9, перешкоджає зв'язку цитохрому C з іпроапоптичним білком Araf-1 в мітохондріях [426]. HSP<sub>70</sub> здатний виправляти окислювально пошкоджені антиоксидатні ферменти і транспортувати їх з цитоплазми в інші клітинні органели.

Таблиця 8.11

**Вплив ІЛ-1Ra і цитиколіну на стан неферментного ланки ТДС і  
нітрозативного стресу в головному мозку тварин з ХЦІ  
на 18-ту добу експерименту**

Група тварин, n=20	Гомоцистеїн, мкмоль/г тканини	Цистеїн, мкмоль/г тканини	Метіонін, мкмоль/г тканини	Нітротирозин, нмоль/г тканини
Ложнооперовані	2,8±0,26	3,15±0,16	2,86±0,15	18,6±1,23
ХЦІ (контроль)	8,5±0,52 <sup>#</sup>	1,14±0,074 <sup>#</sup>	1,25±0,082 <sup>#</sup>	42,3±2,32 <sup>#</sup>
ХЦІ + цитиколін, 500 мг/кг	7,7±0,53 <sup>#</sup>	1,87±0,057* <sup>#</sup>	1,71±0,12* <sup>#</sup>	30,8±2,42*
ХЦІ + ІЛ-1Ra, 1 мг/кг	4,1±0,42* <sup>1</sup>	2,77±0,093*	2,52±0,11* <sup>1</sup>	24,2±1,1* <sup>1</sup>

Примітка. <sup>#</sup> – p<0,05 відносно групи Ложнооперованих тварин;  
\* – p<0,05 відносно групи контролю; <sup>1</sup> – p<0,05 відносно групи цитиколіну

Таблиця 8.12

**Вплив ІЛ-1Ra і цитиколіну на утримання HSP<sub>70</sub> в головному мозку тварин  
з ХЦІ на 18-ту добу експерименту**

Група тварин, n=20	HSP <sub>70</sub> , у.е./ г білку	
	мітохондріальна фракція	цитозольна фракція
Ложнооперовані	7,2±0,21	15,5±0,36
ХЦІ (контроль)	2,1±0,11 <sup>#</sup>	6,4±0,55 <sup>#</sup>
ХЦІ + цитиколін, 500 мг/кг	2,2±0,54 <sup>#</sup>	7,8±0,52 <sup>#</sup>
ХЦІ + ІЛ-1Ra, 1 мг/кг	5,1±0,32* <sup>1</sup>	12,7±0,95* <sup>1</sup>

Примітка. <sup>#</sup> – p<0,05 відносно групи ложнооперованих тварин; \* – p<0,05  
відносно групи контролю; <sup>1</sup> – p<0,05 відносно групи цитиколіну

Збільшення експресії і/або вмісту внутрішньоклітинного HSP<sub>70</sub> викликає гальмування передачі проліферативних, апоптотичних, запальних сигналів [428]. HSP<sub>70</sub> проявляє пряму мітопротективну дію, а також підтримує активність компенсаторного малат-аспартатного човникового механізму в умовах церебральної ішемії, «продовжуючи» дію HIF-1α, HSP<sub>70</sub> самостійно підтримує експресію НАД-МДГ-мх [428].

Виявлений у цитиколіну вплив на тіол-дисульфідну систему головного мозку в умовах ПМК, який не суперечить нашим результатам і даними інших дослідників. Цитиколін має мітопротективний ефект, зберігає цілісність внутрішньої мембрани мітохондрії, впливаючи на рівень кардіоліпіну. Цитиколін опосередковано, через збільшення активності глутатіон-залежних ферментів, регулює участь глутатіона в механізмах ендогенної нейропротекції [429].

Отримані результати дослідження дозволять по-новому оцінити механізм нейропротективної дії IL-1Ra. PAI1, перериваючи IL-1b-залежну експресію iNOS, може знизити продукцію цитотоксичних форм NO, активність нітрозативного стресу і «витрачання» відновлених інтермедіатів ТДС. З урахуванням отриманих результатів можна припустити, що IL-1Ra може регулювати IL-1b-залежний транспорт глутатіона. Можливо, IL-1Ra за рахунок підвищення концентрації HSP<sub>70</sub> впливає на активацію редокс-чутливих факторів транскрипції Ap-1, NF-κB, NF-1, які підвищують експресії генів ГПР, ГР і GST, а також генів ферментів, що забезпечують стабільність внутрішньоклітинної концентрації глутатіона (γ-глутамілтрансферази, γ-глутамілцистеїнсинтетази) в умовах хронічної церебральної ішемії [430] (рис. 8.1).

Таким чином, необоротна оклюзія загальних сонних артерій протягом 18 діб призводить до порушення тіол-дисульфідної системи головного мозку – пригніченню активності ГПР, GST і ГР, дефіциту SH-груп, відновленого глутатіону, зниження вмісту цистеїну, метіоніну, підвищенню концентрації окисленого глутатіону і збільшення рівня нітротирозину в цитоплазмі, а також

до дефіциту білка теплового шоку 70 кДа в цитоплазмі і мітохондріях головного мозку експериментальних тварин.

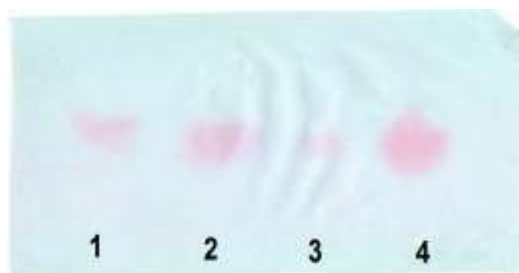


Рис. 8.1 Експресія білка HSP<sub>70</sub> в цитоплазмі головного мозку щурів (нітроцелюозна мембрана після обробки первинними і вторинними антитілами, для візуалізації використовували 3-аміно-9-етілкарбазолом), (1 – тварини з ХЦІ, які одержували цитиколін; 2 – тварини з ХЦІ, які одержували гель ІЛ-1Ra; 3 – тварини з ХЦІ без лікування (контроль); 4 ложнооперовані тварини)

Курсове інтраназальне застосування гелю ІЛ-1Ra протягом 18 діб після незворотньої оклюзії загальних сонних артерій у щурів сприяє поліпшенню основних показників тіол-дисульфідної системи, зниження рівня нітротирозину в цитозольних фракціях головного мозку. Застосування ІЛ-1Ra-гелю призводить до підвищення експресії білка теплового шоку 70 кДа в цитоплазмі і мітохондріях головного мозку. ІЛ-1Ra-гель за ступенем впливу на показники тіол-дисульфідної системи і експресії HSP<sub>70</sub> перевершує референс-препарат Цитиколін. Отримані результати дозволили виявити нові ланки нейропротективної дії ІЛ-1Ra в умовах хронічної церебральної ішемії, а саме вплив на GSH/HSP<sub>70</sub>-залежні механізми ендогенної нейропротекції, що експериментально обґрунтовує перспективність подальших досліджень цієї лікарської форми.

8.2.2 Дослідження нейропротективних властивостей назального гелю з рецепторним антагоністом інтерлейкіна-1 $\beta$  (ІЛ-1Ra, РАІЛ) в умовах гострого порушення мозкового кровообігу (гостра церебральна ішемія). В останні роки відзначається зростання поширеності

судинних захворювань, в тому числі гострих порушень мозкового кровообігу. Ішемічне пошкодження головного мозку супроводжується важкими неврологічними розладами, такими як порушення когнітивних, моторних та інших функцій ЦНС. Щорічно в світі переносять інсульт близько 6 мільйонів людей. Спостерігається збільшення поширеності інсульту в осіб працездатного віку – до 65 років. Згідно з міжнародними епідеміологічними дослідженнями (World Development Report) в світі від інсульту щорічно вмирають 4,7 мільйонів людей. У більшості країн інсульт посідає 2-3 місце в структурі загальної смертності населення, в нашій країні – друге, поступаючись лише кардіоваскулярній патології. Інсульт посідає перше місце, як причина стійкої втрати працездатності. Серед всіх видів інсультів переважають ішемічні ураження мозку [431, 432].

При ішемічному ураженні мозку, в результаті зниження мозкового кровотоку, відбувається порушення функції дихального ланцюга мітохондрій і енергетичного обміну, глутаматної «ексайтотоксичності», порушення іонного гомеостазу клітини з підвищенням внутрішньоклітинного вмісту іонів кальцію, лактат-ацидозу, активацією внутрішньоклітинних ферментів, підвищенням синтезу NO, розвитком оксидативного стресу, експресією генів, аноксичною деполаризацією мембран і смертю клітини [433]. Тому пошук способів фармакологічної корекції цих порушень, а також препаратів, що знижують ступінь нейродегенерації при ішемії мозку, є актуальним завданням сучасної фармакології.

В даний час активно проводиться пошук нових церебропротекторів серед речовин, які впливають на глутамат- і ГАМК-ергічні системи, антагоністів кальцію і оксиду азоту, антиоксидантів, нейропептидів, інгібіторів експресії прозапальних цитокінів та антагоністів IL-1 $\beta$ -рецепторів [434, 435].

Дослідженнями останніх років встановлено, що в умовах ішемії головного мозку АФК, за допомогою активації редокс-чутливих каскадів синтезу факторів ядерної транскрипції білка, підсилюється експресія прозапальних цитокінів, які беруть участь у формуванні локального запального

вогнища в головному мозку, тим самим, посилюючи явища набряку, набухання головного мозку, ініціюють явища апоптозу і некрозу [436]. Доцільним є включення в комплексну терапію мозкових інсультів препаратів, що переривають каскад запальних реакцій. Враховуючи вищезазначене, доцільним стало досліджувати нейропротективну дію нової назальної лікарської форми з ІЛ-1Ra.

Двостороння перев'язка загальних сонних артерій викликала важкі неврологічні зміни у тварин: паралічі, парези, птоз, з максимальним проявом на 4 добу. Так, в ці терміни спостереження, в групі нелікованих тварин, середній бал за шкалою С. Р. McGraw становив 16,7 бала, що відповідає важкому ступеню неврологічної симптоматики (табл. 8.13).

Таблиця 8.13

**Вплив назального гелю з ІЛ-1Ra на виживання і розвиток неврологічного дефіциту тварин в різні терміни після ГПМК**

Група тварин	Кількість щурів з тяжкою симптоматикою, %		Середній бал за шкалою С. Р. McGraw		Кількість виживших тварин на 4-у добу, %
	на 4-у добу	на 18-у добу	на 4-у добу	на 18-у добу	
Інтактні тварини	0	0	0	0	100
Тварини з ГПМК	100	50	16,7±1,52	4,7±0,33	40
Тварини з ГПМК + ІЛ-1Ra	80	20*	11,4±1,03*	1,7±0,28*	70*
Тварини з ГПМК + цераксон	100	50	14,3±1,3	2,4±0,47*	60*

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  відносно групи контролю

На 4 добу в контрольній групі вижило 40% тварин. Введення ІЛ-1Ra забезпечило достовірне зниження неврологічного дефіциту у тварин з ГПМК вже після 4 діб застосування. Так, на 4-у добу спостереження у тварин які отримували ІЛ-1Ra спостерігалось зниження неврологічних порушень на 5,3



бала. Введення Цераксону не призводило до достовірного зниження балів за шкалою С. Р. McGraw. Спостереження на 18 добу показали, що в групі нелікованих тварин не спостерігається повного відновлення, що підтверджується проявом у цієї групи тварин неврологічного (4,7 бала) і когнітивного дефіциту (зниження латентного періоду УРПУ). Введення щурам з ГПМК ІL-1Ra надавало виражений нейропротективний ефект. Так на 4 добу експерименту середній бал в цій групі становив 13,4, летальність зменшувалася на 30% в порівнянні з контролем. Однак 80% тварин виявляли важкий неврологічний дефіцит. Цераксон по силі нейропротективного ефекту поступався ІL-1Ra. Спостереженнями на 18 добу після ГПМК було виявлено, що введення ІL-1Ra в 1,75 рази зменшило відсоток тварин з важкою симптоматикою у порівнянні з контрольною групою на ці ж терміни спостереження, і середній бал склав всього 1,7 проти 4,3 в контрольній групі.

Введення назального гелю з ІL-1Ra зменшувало явища когнітивного дефіциту після ГПМК. Так латентний період УРПУ у щурів, які отримували ІL-1Ra був вище, ніж у контрольній групі, а кількість повністю навчених тварин було на 42,8% вище, ніж у контрольній групі. Цераксон також надаючи нейропротективну дію, зменшуючи вираженість неврологічного дефіциту, поліпшував когнітивно-мнестичні функції ЦНС після моделювання ГПМК (табл. 8.14). На 4-у добу після ГПМК у щурів розвинувся оксидативний і нітрозативний стрес в головному мозку. Так, в головному мозку тварин контрольної групи реєстрували значне підвищення на 4-у добу ГПМК маркерів окисної модифікації білка – АФГ і КФГ, а також підвищення активності NOS, експресії іNOS, стабільного метаболіту NO – нітрит-аніону, маркера нітрозативного стресу – нітротирозину на фоні дефіциту прекурсора NO – L-аргініну. Також було встановлено значне збільшення концентрації іNOS в цитоплазмі на 267% і на 120,7% в мітохондріях головного мозку тварин з ГПМК.

Таблиця 8.14

**Вивчення відновлення когнітивно-мнестичних функцій у тварин з ГПМК  
у тесті УРПУ**

Група тварин	Латентний період заходу в темну камеру, до навчання, с	Латентний період заходу в темну камеру, після навчання, с	Кількість навчених тварин, %
Інтактні тварини	13,4±1,4	187,0±11,7	100
Тварини з ГПМК	19,5±1,6	28,0±1,7	50
Тварини з ГПМК + ІЛ-1Ra гель, 1,0 мг/кг	12,3±1,1	92,3±7,7*	92,8*
Тварини з ГПМК + цераксон, 500 мг/кг	14,2±1,5	92,0±8,8	83*

Примітка. \* –  $p < 0,05$  відносно групи контролю

Дані, представлені в таблиці, характеризують експресію мРНК і iNOS в CA1-зоні гіпокампу головного мозку щурів з ГПМК на 4-ту добу експерименту. Експресія мРНК і iNOS в групах, які отримували лікування, вище значень ложнооперованих тварин, але нижче значень контролю. Можна зробити висновок, що на 4-добу після ГПМК спостерігається значне підвищення експресії мРНК і iNOS. Отримані дані лежать в руслі сучасної концепції нейродегенерації при церебральній ішемії, з якою узгоджуються попередні дослідження, які демонструють значне збільшення продукції NO за рахунок підвищення активності та експресії nNOS і iNOS.

Вільні радикали атакують білки по всій довжині поліпептидного ланцюга, порушуючи не тільки первинну, але і вторинну, і третинну структуру білків, що призводить до агрегації або фрагментації білкової молекули. Багато ферментів, що містять SH-групи, такі як АТФ-ази або дегідрогенази, легко окиснюються в результаті вільнорадикальної атаки. Так, в групі контролю показники АФГ і КФГ достовірно підвищилися в порівнянні з групою інтакту і показники

нітротирозину в плазмі крові і головному мозку щурів також достовірно підвищилися в порівнянні з групою інтакту (табл. 8.15).

Таблиця 8.15

**Вплив назального гелю з ІІ-1Ra на маркери оксидативного стресу в головному мозку щурів на 4-у добу після ГПМК**

Група тварин, n = 20	Продукти ОМБ, у.о./г білку	
	АФГ	КФГ
Інтактні	0,32±0,02	0,15±0,02
ГПМК (контроль)	0,71±0,06	0,35±0,02
ГПМК + цераксон,	0,52±0,03*	0,32±0,012
Тварини з ГПМК + ІІ-1Ra гель, 1,0 мг/кг	0,36±0,03* <sup>1</sup>	0,25±0,02* <sup>1</sup>

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  відносно групи контролю;  $1 \leq 0,05$  відносно групи цераксону

Оксидативний стрес призводить до пошкодження найбільш важливих полімерів – нуклеїнових кислот, білків і ліпідів, АФК викликають пошкодження ДНК (окислення основ, їх модифікація, розриви ланцюгів, пошкодження хромосом). В результаті знижується або зникає їх різноманітна функціональна активність (ферментативна, регуляторна, участь в матричних синтезах, транспорт іонів і ліпідів), і як результат усього цього - зміна нормального функціонування нейронального апарату головного мозку, порушення пам'яті і когнітивно-мнестичних функцій [437].

Курсове інтраназальне введення ІІ-1Ra гелю приводила до зниження рівня АФГ і КФГ по відношенню до контролю, а також до зниження нітротирозину плазми крові і в головному мозку по відношенню до контролю. За ступенем зниження маркерів оксидативного стресу ІІ-1Ra по ряду показників перевершує Цераксон. Антиоксидантні ефекти ІІ-1Ra гелю

включають в себе гальмування утворення АФК ІІ-1b-залежної активації iNOS, а також за рахунок інактивування кисневих радикалів [438].

ІІ-1Ra-гель здійснював значний профілактичний вплив на запуск процесів окисної модифікації білкових молекул після ГПМК при формуванні ішемії головного мозку. Результатом цього є протекція нервових клітин від впливу вільних радикалів і токсичних дериватів NO (табл. 8.16).

Таблиця 8.16

**Вплив назального гелю з ІІ-1Ra на активність антиоксидатних ферментів і концентрацію L-аргініну в цитозолі головного мозку щурів на 4-у добу після ГПМК**

Групи тварин	L-аргінін, мкмоль/г тканини	Каталаза, мкат/мг білку	СОД, у.е./мг білку/ хв
Інтактні, n=20	3,7±0,44	11,3±1,2	267,3±23,5
ГПМК (контроль), n=8	1,65±0,07	6,7±0,42	112,2±9,2
ГПМК + цераксон, 500 мг/кг, n=12	1,77±0,18	7,11±0,51	141,7±0,4*
ГПМК + ІІ-1Ra-гель, 1,0 мг/кг, n=14	2,31±0,14*	7,77±0,71	167,7±11,1*

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  відносно групи контролю;  $1 \leq 0,05$  відносно групи цераксону

У механізмах нейродеструкції, при ішемії головного мозку, важливе значення має порушення нітродергічної системи та нітрозативний стрес [439]. У нормі оксид азоту (NO) відіграє роль вагомого трансмітера в регуляції багатьох функцій ЦНС-пам'ять, регуляція експресії нейропептидів, сон, агресія, апетит, швидкість сенсорних реакцій і т. д. В умовах захворювань мозку ішемічного генезу NO може запускати програму програмованої загибелі клітин. Унікальна хімічна природа і велика кількість внутрішньоклітинних мішеней для NO і його цитотоксичних форм надає можливість ініціації численних механізмів ушкодження нейронів. На етапі гострої ішемії спостерігається

експресія  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної nNOS, обумовленої глутаматною ексайтотоксичністю, і приводить до підвищення продукції NO, який опосередкований в механізмах нейродегенерації через активацію фосфоліпаз, посилення утворення АФК, підвищення експресії IL-1b [440]. На більш пізні терміни церебральної ішемії спостерігається експресія iNOS гліальними клітинами, макрофагами і нейтрофілами, і приводить до гіперпродукції NO і його цитотоксичних форм – пероксинітриту, йону нітронія і т. д. [441]. Особливу роль в підвищенні експресії iNOS належить прозапальним цитокинам, а особливо IL-1b [442]. Встановлено, що NO, і особливо, його цитотоксичні форми (пероксинітрит, іон нітронія, нітроксид, діазотироксид) беруть участь в реалізації деструктивної дії нітрозативного стресу, а саме взаємодіють з металами (залізо, цинк, мідь, марганець) активних центрів ферментів, металовмісних білків, і з активними функціональними групами (гідрокси-, тіо, аміно-) макромолекул [443].

В результаті нітрозативного стресу відбувається порушення клітинного сигналітету, що, в кінцевому підсумку, призводить до ініціювання нейроаптозу і порушення вищих функцій ЦНС [444]. Цитотоксичні форми NO можуть порушувати електронно-транспортний ланцюг мітохондрій, знижувати заряд мембрани мітохондрій за рахунок нітрозилування SH-груп, що є одним з факторів формування дисфункції мітохондрій [445, 446]. Пригнічення електронного транспорту в мітохондрії призводить до генерації супероксиду і, як наслідок, утворення ONOO, що призводить до ще більш активного перебігу нітрозативного стресу. Синтез пероксинітрита спостерігається в нейронах з високою експресією iNOS на фоні низького вмісту відновлених тіолів (глутатіону, метіоніну, цистеїну). Також встановлено, що високий ризик гіперпродукції пероксинітриту виникає при перевантаженні мітохондрій, активації НАДН-оксиредуктази і посилення утворення супероксидрадикалу енергетичними реакціями мітохондрій [310]. Пероксинітрит відіграє істотну роль в механізмах нейродеструкції за рахунок підвищення окислених інтермедіатів тіол-дисульфідної системи, зниження заряду внутрішньої мембрани мітохондрій, порушення експресії генів,

відповідальних за синтез антиоксидатних ферментів і цитопротективних білків і роз'єднання MAP-кіназного каскаду [447] .

Проведений курс лікування інтраназальним гелем ІІ-1Ra призвів до того, що на 4-у добу після ГПМК відмічено підвищення показників L-аргініну, каталази і СОД відповідно в цитозолі головного мозку тварин, які отримували гель ІІ-1Ra по відношенню до групи контролю.

В результаті проведених досліджень було встановлено, що моделювання ГПМК призводить на 4-ту добу експерименту до порушення нітросидергічної системи і ініціювання нітрузуючого стресу в мозку експериментальних тварин, про що свідчило достовірне підвищення в цитозольних і мітохондріальній фракціях гомогенату головного мозку тварин активності NOS на 439,5%, і 189,2%, нітритів на 157,7% і на 96,1%, а також і ніротирозину на 162% і на 66,1% відповідно (табл. 8.17-8.18).

Таблиця 8.17

**Показники нітросидергічної системи та нітрузуючого стресу в цитозольній фракції гомогенату головного мозку щурів з ГПМК на 4-ту добу експерименту**

Група тварин	NOS, нмоль/мг білку/хв	Нітрити, мкМ/г/білку	Ніротирозин, нмоль/мг/білку	iNOS, у.е./г білку
Ложнооперовані	2,43±0,11	4,12±0,35	18,4±1,11	0,12 ±0,01
Тварини з ГПМК (контроль)	13,11±1,10 <sup>+</sup>	10,62±0,91 <sup>+</sup>	48,2±2,87 <sup>+</sup>	0,44±0,05 <sup>+</sup>
Тварини з ГПМК + цитиколін	9,42±0,62 <sup>*+</sup>	8,97±0,34 <sup>+</sup>	34,1±2,21 <sup>*+</sup>	0,45±0,04 <sup>+</sup>
Тварини з ГПМК + ІІ-1Ra	4,75±0,23 <sup>*+1</sup>	5,71±0,41 <sup>*1</sup>	23,2±1,43 <sup>*+1</sup>	0,23±0,01 <sup>*1</sup>

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  відносно групи контролю; + –  $p \leq 0,05$  відносно групи ложнооперованих тварин; <sup>1</sup> –  $p \leq 0,05$  відносно групи цитиколіну

Таблиця 8.18

**Показники нітродергічної системи та нітрозуючого стресу в  
мітохондріальній фракції гомогенату головного мозку щурів з ГПМК  
на 4-ту добу експерименту**

Група тварин	NOS, нмоль/мг білку/хв	Нітрити, мкМ/г/білку	Нітротирозин, нмоль/мг/білку	iNOS, у.е./г білку
Ложнооперована	1,11±0,03	1,81±0,08	5,6±0,44	0,077±0,005
Тварини з ГПМК (контроль)	3,21±0,21 <sup>+</sup>	3,55±0,20 <sup>+</sup>	9,3±0,32 <sup>+</sup>	0,17±0,001 <sup>+</sup>
Тварини з ГПМК + цитиколін	2,11±0,11 <sup>*+</sup>	3,11±0,32 <sup>+</sup>	7,5±0,42 <sup>*+</sup>	0,12±0,001 <sup>*+</sup>
Тварини з ГПМК + IL-1Ra	1,53±0,08 <sup>*</sup>	2,32±0,17 <sup>+</sup> *	6,1±0,32 <sup>*+</sup>	0,08±0,002 <sup>*+1</sup>

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  відносно групи контролю; + –  $p \leq 0,05$  відносно групи ложнооперованих тварин; <sup>1</sup> –  $p \leq 0,05$  відносно групи цитиколіну

Курсове призначення цитиколіну внутрішньочеревинно протягом 4-х діб в дозі 500 мг/кг тваринам з ГПМК призводило до достовірного зниження в цитоплазмі і мітохондріях головного мозку активності NOS 28,1% і 34,2%, нітротирозину на 29,2% і 19, 3% відповідно. Цитиколін приводив до достовірного зниження експресії iNOS в мітохондріях головного мозку на 29,4%. Введення цитиколіну приводило і до достовірного зниження експресії мРНК iNOS на 18% в СА1 зоні гіпокампа, щодо показників групи. При цьому експресія мРНК iNOS в в СА1 зоні гіпокампа щурів з ГПМК, які отримували цитиколін була вище показників ложнооперуємої групи в 7,7 раз. (табл. 8.19).

Варто відзначити, що за вираженістю впливу на такі показники як активність NOS, концентрація нітритів і нітротирозину в цитозольних фракції головного мозку, а також по концентрації iNOS в мітохондріях гомогената головного мозку експериментальних тварин с ГПМК гель IL-1Ra достовірно перевершує дію референс-препарату цитиколін, що свідчить про ефективність

нових підходів до технологічних розробок лікарських інтраназальних форм з церебропротекторами.

Таблиця 8.19

**Показники експресії мРНК iNOS в CA1-зоні гіпокампу з ГПМК  
на 4-ту добу експерименту**

Група тварин	Експресія мРНК iNOS, у.е.	
	відносно ложнооперованої групи	відносно контролю
Ложнооперована	1,00±0,011	–
Тварини з ГПМК (контроль)	–	1,00±0,005
Тварини з ГПМК + цитиколін	7,77±0,011 <sup>+</sup>	0,82±0,001*
Тварини з ГПМК + IL-1Ra	2,19±0,009 <sup>+1</sup>	0,057±0,0008* <sup>1</sup>

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  відносно групи контролю; + –  $p \leq 0,05$  відносно групи ложнооперованих тварин; <sup>1</sup> –  $p \leq 0,05$  відносно групи цитиколіну

Цитиколін надає достовірний вплив на деякі показники нітродергічної системи головного мозку при ГПМК, але поступається за ефективністю гелю IL-1Ra. Зниження експресії iNOS під дією цитиколіну можна пояснити не тільки його здатністю зменшувати утворення АФК енергетичними реакціями мітохондрій, що беруть участь в її експресії [448]. В роботах І. Ф. Беленічева і співавт. встановлено, що цитиколін, проявляє мітопротективну дію зберігає цілісність внутрішньої мембрани мітохондрії, впливаючи на рівень кардіоліпіну [449]. Цитиколін здатний збільшувати фонд внутрішньомітохондріального глутатіону і за рахунок цього глутатіону, можливо, переривються IL-1b-залежні механізми експресії цього iNOS [450]. Також було встановлено, що цитиколін гальмує реакції ініціювання нейроаптозу. Однак, аналізуючи експериментальні дані впливу цитиколіну на показники нітродергічної системи головного мозку щурів при ГПМК, можна зробити висновок, що



вищевикладені механізми його дії не забезпечують повноцінного впливу на зрушення системи NO головного мозку. Таким, чином, цитиколін, як широко застосовуваний нейропротектор, не робить належного впливу на таку важливу ланку патогенезу ішемічного пошкодження головного мозку, як нітрозативний стрес, що вимагає додаткового фармакологічного впливу на цю ланку-мішень для підвищення ефективності комплексної терапії мозкових інсультів. Враховуючи вищезазначене, особливої уваги заслуговує розроблений гель РАІЛ. Курсове призначення гелю РАІЛ інтраназально протягом 4-х діб в дозі 1 мг/кг тваринам з ГПМК призводило до достовірного зниження в цитоплазмі і мітохондріях головного мозку активності NOS 63,7% і 52,3%, нітритів на 46,2% і 34,6 %, ніротирозину на 51,8% і 34,4% відповідно (табл. 8.17-8.18). РАІЛ призводив до зниження експресії iNOS в цитоплазмі і мітохондріях головного мозку на 47,7% і на 52,9% відповідно. Введення РАІЛ приводило і до зниження експресії мРНК iNOS в CA1 зоні гіпокампа на 94,3% в порівнянні з групою контролю.

При цьому значення мРНК iNOS в CA1 зоні гіпокампа в цій групі були на 119% вище в порівнянні з групою ложнооперуваних тварин (табл.8.19) Інтраназальне застосування ІЛ-1Ra сприяє більш високій нейродоступності в порівнянні з внутрішньом'язовим і внутрішньочеревинним введенням і забезпечує більш досить виражену фармакологічну дію. Таким, чином гель РАІЛ, не тільки нормалізує показники нітродоксидергічної системи головного мозку при церебральній ішемії, але і повністю перериває реакції нітрозативного стресу, знижуючи накопичення цитотоксичних продуктів в цитоплазмі і мітохондріях нейронів. Виявлений ефект РАІЛ демонструє його виражений вплив на основні показники порушень нітродоксидергічної системи головного мозку і формування нітрозативного стресу при церебральній ішемії. Подібна дія може бути забезпечена, перш за все блокадою ІЛ-1b, перериванням ІЛ-1b-залежного шляху експресії iNOS і запускається цим ензимом каскадом реакцій нітрозативного стресу [451]. Виявлені нами факти пригнічення експресії мРНК iNOS і pNOS в ішемізованому головному мозку антагоністами ІЛ-1b

викликають нейрозапалення, цитокини і IL-1b як один із ведучих причин (після ексайтотоксичності, мітохондріальної дисфункції) гіперпродукції NO, нітрозативного стресу і реалізації відстрочених механізмів загибелі нейронів після інсульту.

Механізм впливу IL-1Ra на систему NO в умовах гострої церебральної ішемії були достатньо вивчені в роботах проф. Супрун Е. В. і проф. Беленічева І. Ф. [369, 452, 453]. Показано, що IL-1Ra перериває IL-1b-залежні механізми експресії iNOS, а дослідженнями було уточнено, що гель РАІЛ діє безпосередньо на експресію мРНК iNOS, що забезпечує переривання NO-опосередковані реакції нейродеструкції на ініціальних етапах. Також РАІЛ здатний попереджувати реакції окисної модифікації NO і його перетворення в пероксін за рахунок підвищення рівня відновлених інтермедіатів тіол-дисульфідної системи, які, утворюючи нітрозотіоли, захищають NO від взаємодії з активними формами кисню. Подібний механізм дії РАІЛ також вносить свій внесок в переривання реакцій нітрозативного стресу при гострій церебральної ішемії.

Також здатність РАІЛ переривати NO-залежні механізми нейродеструкції при церебральної ішемії може бути розглянуто через призму HSP<sub>70</sub>-опосередкованого впливу. В наших дослідженнях встановлено вплив IL-1Ra на експресію білка теплового шоку 70кДа в нейронах сенсомоторної зони мозку щурів після оклюзії сонних артерій на 4-у добу. Відомо, що HSP<sub>70</sub> може призводити як до підвищення IL-1 $\beta$  до рівня, необхідного для участі в цито- і нейропротекції, а також пригнічувати експресію IL-1 $\beta$  [454]. HSP<sub>70</sub> може попереджувати продукцію запальних цитокинів шляхом втручання в NF- $\kappa$ B-залежну транскрипцію. Тому ми припускаємо можливість впливу IL-1Ra через підвищення концентрації HSP<sub>70</sub> на активацію редокс-чутливих факторів транскрипції Ap- 1, NF -  $\kappa$ B, NF - 1 b і потім на експресію iNOS.

Результати проведених нами досліджень вказують на те, що формування хронічної церебральної ішемії у щурів призводить до зміщення тіол-дисульфідної системи у вигляді зменшення пулу її відновлених форм на 4-ту

добу експерименту. Так, в даних умовах відзначалося виражене, в порівнянні з групою інтактних тварин, зниження значень тіол-дисульфідної системи, а також збільшення рівня окисленого глутатіону.

У функціонуванні глутатіонзалежної ферментативної системи в тканинах мозку у щурів з ГПМК, зареєстровано порівнянне зниження активності ГПР і ГР, в порівнянні з групою умовно оперованих тварин (табл. 8.20). На цьому фоні характерним було достовірне підвищення рівня гомоцістеїну.

Таблиця 8.20

**Вплив назального гелю з ІЛ-1Ra на стан ферментативного ланки тіол-дисульфідній системи в цитозолі головного мозку тварин з ГПМК на 4-ту добу експерименту**

Групи тварин	ГР, мкмоль/мг білку /хв	ГПР, мкмоль/мг білку /хв	Г-S-T, мкмоль/мг білку /хв
Інтактні, n=0	19,5±1,35	61,8±2,9	15,8±1,07
ГПМК (контроль), n=8	6,4±0,44	15,2±1,4	7,1±0,67
ГПМК + цераксон, 500 мг/кг, n=12	8,8±0,67*	22,7±2,8*	9,8±1,1
ГПМК + ІЛ-1Ra гель, 1,0 мг/кг, n=14	12,2±0,72* <sup>1</sup>	38,5±2,5* <sup>1</sup>	10,5±1,22*

Примітка. \* –  $p < 0,05$  відносно групи контролю; <sup>1</sup> –  $p < 0,05$  відносно групи цераксону

В умовах проведення експериментальної терапії були отримані наступні результати впливу РАІЛ гелю на тіол-дисульфідну рівновагу. На фоні курсового введення РАІЛ гелю відзначені виражені зміни, які характеризувалися значним збільшенням відновлених інтермедіатів тіол-дисульфідної системи в порівнянні з групою нелікованих тварин. Паралельно відзначалося підвищення рівня відновленого глутатіону, на фоні зниження вмісту його окисленої форми. Подібні за спрямованістю зміни були відзначені і при використанні цераксону, однак параметри зафіксованих значень в цій групі,

по виразності поступалися показникам групи тварин з введенням ІЛ-1Ra гелю. Так, відзначалося помірне, в порівнянні з контролем, зростання значень інтермедіатів тіол-дисульфідної системи – підвищення активності ГР і ГПР. У свою чергу, рівень окисленого глутатіону в цій групі знижувався, а вміст його відновленої форми зростала ( $p < 0,05$ ).

Застосування ІЛ-1Ra гелю також призводило і до зниження вмісту в тканинах мозку потенційних нейротоксичних речовини – гомоцистеїну (табл. 8.21). При цьому ІЛ-1Ra -гель підвищував активність ГР і ГПР щодо показників тварин з ГПМК на 4-ту добу експерименту.

Відомо, що зміщення тіол-дисульфідної системи в бік окислених форм може призводити до сплеску вільно-радикальних реакцій, а високі концентрації окисленого глутатіону можуть призводити до підвищення експресії прозапальних цитокінів [455].

Дефіцит відновленого глутатіону, пов'язаний з його витрачанням при нейтралізації ліпоперикисних з'єднань і порушенням його відновлення в реакції з глутатіонредуктазою, призводить до підсилення глутамат-кальцієвого каскадного механізму, підвищення активності  $Ca^{2+}$ -залежної nNOS і зниження експресії внутрішньомітохондріального рівня HSP<sub>70</sub> [310]. Великий внесок у створення дефіциту глутатіону і порушення тіол-дисульфідної рівноваги при гострій церебральній ішемії вносить різке зниження цитозольного цистеїну (табл. 8.21).

Інтраназальне застосування РАІЛ, в умовах гострої церебральної ішемії, призводить до підвищення рівня відновлених тіольних форм на 216% і зниження окислених форм на 68%, підвищення в 2,6 раз відновленого глутатіону в цитоплазмі головного мозку тварин з ГПМК в порівнянні з групою нелікованих тварин. Підвищення рівня відновленого глутатіону відбувається на фоні підвищення цистеїну і метіоніну, зниження рівня гомоцистеїну, а також підвищення активності ключових глутатіон-залежних ферментів – глутатіонредуктази і глутатіонпероксидази.

Таблиця 8.21

**Вплив ІL-1Ra гелю на стан неферментної ланки тіол-дисульфідної системи в цитозолі головного мозку тварин з ГПМК на 4-ту добу експерименту**

Групи тварин	SH-групи, мкмоль/г тканини	SS-групи, мкмоль/г тканини	Глутатіон відн., мкмоль/г тканини	Глутатіон окисн., мкмоль/г тканини
Інтактні, n=20	57,3±2,8	3,5±0,2	4,3±0,23	0,033±0,008
ГПМК (контроль), n=8	14,4±1,32	17,2±1,64	0,62±0,05	0,076±0,005
ГПМК + цераксон, 500 мг/кг, n=12	20,4±1,38* (+41%)	11,4±0,91* (-33%)	1,00±0,75* (+61%)	0,063±0,004* (-17%)
ГПМК + ІL-1Ra гелю, 1,0 мг/кг, n=14	45,6±2,58* <sup>1</sup> (+216%)	5,5±0,48* <sup>1</sup> (-68%)	2,24±0,12* <sup>1</sup> (+261%)	0,035±0,003* <sup>1</sup> (-53%)

Примітка. \* –  $p < 0,05$  відносно групи контролю; <sup>1</sup> –  $p < 0,05$  відносно групи цераксону

Подібний позитивний вплив РАІЛ на показники глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи і підвищення рівня цитозольного глутатіону забезпечує не тільки повноцінний антиоксидантний захист нейронів від оксидативного і нітрозативного стресів, але інтенсифікують функціонування глутатіон-залежних ланок ендогенної нейропротекції. Так, підвищення рівня відновленого глутатіону при ішемії головного мозку може знижувати глутаматну ексайтотоксичність за рахунок зменшення гіперзбудливості NMDA [456]. Підвищення рівня цитозольного глутатіону під дією РАІЛ може надавати позитивну дію на енергопродукуючої функції мітохондрії в умовах ішемії, а саме підвищувати заряд внутрішньої мембрани мітохондрії і нормалізувати роботу циклоспорин А-залежної пори [457].

Таким чином, проведеними дослідженнями було встановлено значний позитивний вплив гелю РАІЛ, розроблений за допомогою нової інформаційної технології, на основні показники тіол-дисульфідній системи головного мозку

при ГПМК. При введенні ІL-1Ra гелю встановлюється найбільш оптимальне співвідношення між рівнями відновлених і окислених тіольних груп, а також глутатіону, що свідчить про активну мобілізацію тіол-дисульфідної системи в нейтралізації продуктів вільно-радикального окислення. Крім того, збільшення функціональності тіол-дисульфідної системи в умовах ішемічного інсульту, під впливом геля РАІЛ, сприяє підвищенню біодоступності оксиду азоту, а також зменшує цитотоксичність NO і його дериватів, що проявлялося у вигляді вираженого зниження рівня нітротирозину [458]. Ймовірно, що в умовах нітрозуючого і оксидативного стресу, завдяки зазначеним механізмам, вивчені засоби збільшують стійкість нервової тканини до явищ ішемії (табл. 8.22).

Таблиця 8.22

**Вплив назального ІL-1Ra гелю на стан неферментної ланки ТДС в цитозолі головного мозку тварин з ГПМК на 4-у добу експерименту**

Група тварин	Гомоцистеїн, мкмоль/г тканини	Цистеїн, мкмоль/г тканини	Метіонін, мкмоль/г тканини
Інтактні, n=20	2,8±0,26	3,15±0,16	2,86±0,15
ГПМК (контроль), n=8	12,7±1,4	1,17±0,077	1,27±0,083
ГПМК + цераксон, 500 мг/кг, n=12	9,2±0,65*	1,72±0,10*	1,74±0,16*
ГПМК + ІL-1Ra-гелю, 1,0 мг/кг, n=14	7,1 ± 0,41*	2,88±0,093*	2,55±0,11*

Примітка. \* –  $p < 0,05$  відносно групи контролю; <sup>1</sup> –  $p < 0,05$  відносно групи цераксону

Таким чином, одним з напрямків нейропротективного ефекту препарату РАІЛ-гелю є його здатність зменшувати негативні зрушення тіол-дисульфідної рівноваги головного мозку. Так, найбільш важливим ефектом зазначеного препарату в умовах ГПМК стала нормалізація активності антиоксидантних ферментів, і як наслідок, гальмування окисної модифікації білка. Багато авторів відносять окислювальну модифікацію білка до найбільш важливої ланки

патогенезу ішемії головного мозку, внаслідок того, що окислення білкових макромолекул рецепторів, іонних каналів призводить до порушення генерації, передачі і розпізнавання нервового імпульсу, порушення функціональної активності нейронів і в кінцевому підсумку – до розвитку неврологічного та когнітивного дефіциту [310].

Застосування інтраназального гелю РАІЛ було достовірно більш ефективним, ніж призначення цитиколіну. Цитиколін не чинив достовірного впливу на досліджувані показники тіол-дисульфідної системи головного мозку. Позитивний вплив РАІЛ на глутатіонову ланку тіол-дисульфідної системи може бути пояснено наступним чином. РАІЛ, знижуючи підвищену експресію ІЛ-1b, підвищує транспорт відновленого глутатіону в ішемізовані тканини [430]. Крім того, РАІЛ, регулюючи рівень прозапальних цитокінів, здатний індукувати S-глутатіонілювання цистеїну, що є важливою посттрансляційною модифікацією, яка контролює широкий спектр внутрішньоклітинних білкових активностей в умовах гострої ішемії. РАІЛ опосередковано через рівень ІЛ-1 $\beta$  здатний підвищувати експресію глутаредоксини 1 (Grx1), фактора, що каталізує деглутатіонілювання, і впливає на активність глутатіонредуктази [459].

Відомо, що модулюючи рівень ендogenous відновленого глутатіону, можливо регулювання експресії білків теплового шоку в клітині [446]. Останнім часом з'явилися дані про захисну роль білків теплового шоку при церебральній ішемії, що супроводжується інтенсифікацією процесів вільнорадикального окислення, зміщенням тіол-дисульфідної рівноваги, розвитком нітрозуючого стресу, глутаматної ексайтотоксичності [460]. Нами виявлено зниження білка теплового шоку HSP<sub>70</sub> в головному мозку експериментальних тварин (табл. 8.23).

Так, в групі нелікованих тварин спостерігалось зниження рівня HSP<sub>70</sub> в цитозольних і мітохондріальній фракціях гомогенату головного мозку на 4 добу експерименту в порівнянні з аналогічними показниками групи інтакту. Введення гелю ІЛ-1Ra сприяло нормалізації рівня цього показника, що свідчить

про наявність його протекторних властивостей і здатності запобігати пригнічення експресії гена HSP<sub>70</sub> в нейронах.

Таблиця 8.23

**Вплив IL-1Ra -гелю на рівень HSP<sub>70</sub> в головному мозку тварин з ГПМК на 4-ту добу експерименту**

Група тварин	HSP <sub>70</sub> , у.е./ г білку	
	мітохондріальна фракція	цитозольна фракція
Інтактні, n=20	7,8±0,21	17,5±0,38
ГПМК (контроль), n=8	2,2±0,11	5,2±0,34
ГПМК + цераксон, 500 мг/кг, n=12	2,8±0,21*	9,5±0,71*
ГПМК + IL-1Ra-гелю, 1,0 мг/кг, n=14	6,5±0,54 <sup>*1</sup>	12,7±1,1 <sup>*1</sup>

Примітка. \* – p<0,05 відносно групи контролю; <sup>1</sup> – p<0,05 відносно групи цераксону

При курсовому введенні РАІЛ-гелю концентрація білка HSP<sub>70</sub> в цитоплазмі і мітохондріях гомогената головного мозку тварин підвищувалася в порівнянні з показниками контролю. Концентрація HSP<sub>70</sub> в головному мозку тварин, які отримували гель IL-1Ra була вище аналогічних показників групи інтактної (умовно оперовані тварини). Отримані дані свідчать про активацію експресії гена HSP<sub>70</sub> в нейронах під дією гелю IL-1Ra.

Білок теплового шоку 70 кДа є чутливим до стресу білком і індукується, коли клітини піддаються різним типам стресу, включаючи тепло, гіпоксію і позбавлення глюкози. Підвищення рівня HSP<sub>70</sub>, в свою чергу, призводять до помітного збільшення стресостійкості і нейропротекції. Нейропротекторні ефекти, опосередковані HSP<sub>70</sub>, були продемонстровані на різних моделях пошкодження головного мозку – субтотальна ішемія, фокальна ішемія, ЧМТ, внутрішньомозковий крововилив, гіпоксія, хронічна алкогольна інтоксикація і т. д. Наприклад, експерименти як in vitro, так і in vivo, проведені під



керівництвом професор Беленічева І. Ф., показали, що індукція HSP<sub>70</sub> шляхом фармакологічної модуляції різними лікарськими препаратами і знову синтезованими сполуками захищає нейрони від ішемічних і нейротоксичних хімічних речовин [310]. Однак молекулярні механізми, що лежать в основі нейропротективних ефектів HSP<sub>70</sub> в умовах ішемії, до кінця не вивчені. Клітинне окислювально-відновлювальне середовище, яке часто називають окислювально-відновним статусом, відноситься до потенціалу відновлення або зниження здатності в клітинних або інших біологічних системах і відіграє важливу роль в клітинних функціях, включаючи регуляцію проліферації, диференціювання і загибелі клітин. Багато сигнальних молекул, які відіграють вирішальну роль в шляхах загибелі клітин, чутливі до окислювально-відновних процесам, наприклад цитохром С, каспаз, NF-κB і AP-1, оскільки їх рівні і/або активація контролюються окислювально-відновної середовищем клітини. Наприклад, активні форми кисню (АФК) можуть викликати серію специфічних сигнальних подій клітинної смерті, включаючи вивільнення цитохрому С в цитозоль, активацію каспаз-3, протеолітичне розщеплення протеїнкінази С δ і фрагментацію ядерної ДНК [461]. Редокс-статус клітин змінюється при церебральній ішемії через зміни рівнів і метаболізму кисню і глюкози. Критична роль підвищених рівнів АФК в загибелі клітин, викликаній ішемією, стала основою потенційного підходу (антиоксидантну лікування) до мінімізації ішемічного ушкодження головного мозку. Експериментальні дані показали, що існує взаємозв'язок між HSP<sub>70</sub> і окислювально-відновним статусом. З одного боку, і окислювальний стрес, і антиоксиданти, мабуть, регулюють експресію HSP<sub>70</sub>. З іншого боку, зниження експресії HSP<sub>70</sub> збільшує генерацію кисневих радикалів і окислювальну модифікацію мітохондріальних білків вже на 1-у добу після оклюзії сонних артерій. Більш того, HSP<sub>70</sub> знижує клітинне пошкодження, викликане окислювальним стресом в нейронах гіпокампу CA1, мозочка і сенсомоторної зони кори при оклюзії сонних артерій [462]. Ймовірно HSP<sub>70</sub> може захищати клітини від ішемічних пошкоджень, знижуючи активність реакцій оксидативного стресу і відновлюючи білкові молекули після

окисної модифікації. Наші дослідження показали, що HSP70 покращує окислювально-відновний статус нейронів, зберігає активність мітохондрій в умовах церебральної ішемії, а також значно збільшує активність глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази. Наші результати уперше показують, що експресія HSP<sub>70</sub> під дією лікарських препаратів підтримує антиоксидатний статус нейрона в період гострої ішемії. Крім того, ми демонструємо, що активність ферментів тіол-дисульфідної системи – глутатіоредуктази і глутатіопероксидази помітно посилюється в цитоплазмі головного мозку на фоні високої експресії HSP<sub>70</sub> в цитоплазмі і мітохондріях. Крім того, Hsp70 підвищує рівень глуторедоксіну і глутатіону, який підтримує відновлений стан цистеїн-тіолових груп білків і захищає клітини від оксидативного стресу і гальмує нейроапоптоз [310, 394]. Отримані результати, свідчать, що введення РАІЛ, послаблюючи дію ІЛ-1b, індукує експресію і синтез відновленого глутатіону, гальмує NO-залежні механізми нейроапоптозу. Є дані, що селективні інгібітори ІЛ-1b, пригнічуючи експресію іNOS здатні пригнічувати NO-залежні механізми депривації експресії HSP<sub>70</sub> [464]. Можливо, РАІЛ також приймає участь в цьому механізмі модуляції експресії HSP70, не виключаючи при цьому і глутатіон-залежний механізм регуляції експресії цього білка.

Моделювання ГПМК приводила до стійких порушень енергетичного обміну в головному мозку – до зниження вмісту АТФ, АДФ і підвищенню АМФ на тлі гіперпродукції лактату і зниження малата і пірувату. Однак гліколіз не компенсує потреби клітини в макроергах, замикаючи порочне коло енергетичного дефіциту. Надмірне утворення протонів відбувається внаслідок накопичення недоокислених продуктів вуглеводного і ліпідного обміну, гідролізу АТФ та інших макроергічних сполук в результаті накопичення відновлених піридиннуклеотидів і продуктів гліколізу, приводячи до розвитку некомпенсованого метаболічного ацидозу [465].

Курсове призначення цераксону протягом 4-х діб після ГПМК призвело до зниження рівня лактату по відношенню до групи нелікованих тварин

( $p \leq 0,05$ ), при збільшенні рівня малату і пірувату в головному мозку тварин, що свідчить про нормалізацію енергетичного метаболізму головного мозку (табл. 8.24). Відомо, що цераксон обмежує активність анаеробного гліколізу і підвищує аеробні реакції синтезу АТФ за рахунок активації окислення в циклі Кребса на трикарбонових ділянках (підвищення ізоцитрата) [466]. При цьому Цераксон не впливає на активність малат-аспартатного шунта [467].

Таблиця 8.24

**Вплив назального РАІЛ -гелю на показники енергетичного метаболізму в головному мозку щурів з ГПМК на 4-ту добу експерименту**

Групи тварин	Лактат, мкмоль/г тканини	Малат, мкмоль/г тканини	Піруват, мкмоль/г тканини
Інтактні, n=20	2,10±0,06	0,48±0,03	0,85±0,04
ГПМК (контроль), n=8	4,77±0,12	0,37±0,02	0,60±0,02
ГПМК + цераксон, 500 мг/кг, n=12	3,54±0,30*	0,41±0,02	0,76±0,02*
ГПМК + ІЛ-1Ra-гелю, 1,0 мг/кг, n=14	2,75±0,26*	0,49±0,02* <sup>1</sup>	0,80±0,03* <sup>1</sup>

Примітка. \* –  $p < 0,05$  відносно групи контролю; <sup>1</sup> –  $p < 0,05$  відносно групи цераксону

Призначення ІЛ-1Ra-гелю призводило до зменшення вмісту лактату і підвищення малата і пірувату, що свідчило про інтенсифікацію аеробних процесів в циклі Кребса в головному мозку тварин з ГПМК. Подібна дія на тонкі ланки енергетичного метаболізму під дією РАІЛ призводило до підвищення рівня макроергічних фосфатів. Так, в головному мозку тварин отримували РАІЛ -гель, підвищувався рівень АТФ, АДФ при зниженні рівня АМФ (табл. 8.25).

Таблиця 8.25

**Вплив назального ІЛ -1Ra -гелю на показники аденілових нуклеотидів в головному мозку щурів з ГПМК на 4-ту добу експерименту**

Групи тварин	АТФ, мкмоль/г тканини	АДФ, мкмоль/г тканини	АМФ, мкмоль/г тканини
Інтактні, n=20	3,56±0,08	0,43±0,02	0,176±0,02
ГПМК (контроль), n=8	1,88 ±0,05	0,35±0,017	0,228±0,01
ГПМК + цераксон, 500 мг/кг, n=12	2,44±0,10*	0,39±0,01*	0,210±0,01*
ГПМК + ІЛ-1Ra-гелю, 1,0 мг/кг, n=14	3,00±0,12* <sup>1</sup>	0,42±0,01* <sup>1</sup>	0,199±0,01*

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  відносно групи контролю; <sup>1</sup> –  $p \leq 0,05$  відносно групи цераксону

У групі, що одержували цераксон, ці показники були значно нижче в порівнянні з групою, що одержувала РАІЛ -гель. Механізм енергомодулючої дії РАІЛ гелю, ймовірно, обумовлений його здатністю обмежувати розвиток мітохондріальної дисфункції, а саме, гальмувати NO-залежні механізми ушкодження білків мітохондріальної-пори і білкових структур внутрішньої мембрани мітохондрій, що призводять до падіння заряду мітохондрій, формуванню дисфункції цих органел і зниження енергопродукуючої функції. Подібна дія пов'язана з перериванням ІЛ-1b механізмів експресії iNOS і інших цитокіно-опосередкованих механізмів активації АФК, що беруть участь в ушкодженні мітохондрій [57].

Вважається, що дисфункція мітохондрій відіграє важливу роль у формуванні ішемічної нейродеструкції. Встановлено, що високий рівень ІЛ-1 $\beta$  призводить до більшої частоти ультраструктурних ознак пошкодження мітохондрій нейронів головного мозку і пошкодження мтДНК, а також підсилення нейроаптозу. Роботами професора Супрун Е. В. було встановлено, що дисфункція мітохондрій нейронів і пошкодження мтДНК були

значно зменшені фармакологічної блокадою IL-1R. Це супроводжувалося гальмуванням нейроаптозу – зниженням щільності клітин з морфологічними ознаками апоптозу і підвищенням концентрації антиапоптичного білку bcl-2 [56, 57]. В умовах гострої церебральної ішемії, спостерігається гіперпродукція АФК нейрохімічними реакціями нейрона і метаболічними шунтами мітохондрії, призводить самопошкодження мембран мітохондрій, що призводить до їх дизфункціонування, пошкодження мтДНК. Нейрозапалення і високий рівень прозапальних цитокінів підсилює мітохондріальну дисфункцію в нейрональних клітинах [366].

Дослідження, виконані на кафедрі фармакології ЗДМУ, показали, що блокада IL-1 $\beta$  за рахунок гальмування окисного стресу і нормалізації експресії NF- $\kappa$  B підвищує заряд внутрішньої мембрани мітохондрій і підвищує активність мітохондріальної малатдегідрогенази і супероксиддисмутази. Активні форми кисню та азоту ушкоджують мтДНК в нейронах, а білки ланцюга перенесення електронів, які кодуються мітохондріальним геномом, піддаються окислювальній модифікації. Пошкодження мтДНК запускає порочне коло, і транскрипція білків, кодованого мтДНК, знижується [310]. Дефіцит внутрішньо-мітохондріальних антиоксидантів і зниження захисту мтДНК від вільних радикалів та зниження рівня цитохрому b (ферменту, необхідного для утворення і активності комплексу III) за рахунок активації IL-1 $\beta$  означає, що спільне підвищення прозапальних цитокінів та пошкодження мтДНК при гострої церебральної ішемії ще більше підживлює порочне коло, що призводить до тривалого пошкодження мітохондрій і перетворює з електростанції клітини в джерело АФК. Пошкоджені мітохондрії не тільки здатні ініціювати апоптоз, а й здатні посилювати нейрозапалення за рахунок ініціації інфламасом [468].

Введення РАІЛ-гелю надавало достовірний вплив на деякі показники дисфункції мітохондрій головного мозку. Так, введення РАІЛ-гелю приводило до достовірного зниження швидкості відкриття мітохондріальної пори і підвищенню заряду внутрішньої мембрани мітохондрії. Внаслідок нормалізації

функціональної активності мітохондрій головного мозку тварин з ГПМК під дією РАІЛ -гелю відбувається достовірне підвищення рівнів АТФ і АДФ, а також зниження лактату і підвищення пірувату і малата (табл. 8.26).

Таблиця 8.26

**Вплив ІЛ-1Ra-гелю на показники функціональної активності мітохондрій в головному мозку щурів з ГПМК на 4-ту добу експерименту**

Група тварин	Відкриття мітохондріальної пори, $\Delta E$ , 540 нм	Потенціал мембрани мітохондрії, сафранин-О
Інтактні, n=20	$0,019 \pm 0,001$	$50,9 \pm 2,05$
ГПМК (контроль), n=8	$0,187 \pm 0,011$	$10,7 \pm 1,33$
ГПМК + цераксон, 500 мг/кг, n=12	$0,077 \pm 0,005^*$	$18,0 \pm 1,2^*$
ГПМК + ІЛ-1Ra-гелю, 1,0 мг/кг, n=14	$0,055 \pm 0,003^{*1}$	$25,5 \pm 1,8^{*1}$

Таким чином, ІЛ-1Ra-гель виявляє виражені нейропротективні властивості, як в гострий, так і в відновлювальний період ішемічного інсульту і по силі дії перевершує референс-препарат Цераксон.

8.2.3 Нейропротективна активність гелю (ІЛ-1Ra, РАІЛ) при кетамін-індукованому нейроапоптозі. Вибір лікарських засобів для проведення тотальної внутрішньовенної анестезії залишається актуальним питанням у практичній анестезіології довгі роки. Вимоги до препаратів, які викликають наркоз, багаточисленні та різноманітні – швидке настання наркозу, висока ефективність, керованість, безпечність та інше, але в останні роки до цих критеріїв приєдналася ще й відсутність або мінімальність негативного впливу на ЦНС. Кетамін є давно відомим препаратом, який широко застосовується у світі з 70-х років минулого століття. Його механізм дії пов'язаний з неконкурентним антагонізмом NMDA-рецепторів, що призводить до функціональної дезорганізації неспецифічних зв'язків у середньому мозку та таламусі, викликаючи дисоціативну анестезію. Кетамін був створений у якості

безпечної альтернативи фенциклідину, нейротоксичність якого була відома та експериментально доведена [469]. Довгі роки навколо кетаміну не вщухає наукова дискусія щодо його впливу на ЦНС. Деякі автори у своїх статтях наводять дані щодо нейпротективних властивостей цього препарату, пропонуючи використовувати його для зменшення пошкодження мозку при гострому ураженні ЦНС [470], говорять про захист нейронів на клітинному рівні [471]. Інші експериментально доводять, що він викликає нейроапоптоз та тривалі поведінкові порушення у гризунів різних вікових груп, у т. ч. у новонароджених [472]. Нейротоксична дія кетаміну обумовлена експресією генів раннього реагування c-Fos (6), він знижує загальну антиоксидантну здатність (Total Antioxidant Capacity – TAC), викликає надмірне утворення активних форм кисню (ROS) та малондіальдегіду (MDA) та доведено, що рівень апоптозу корелює з рівнем інгібітору аутофагії 3-метиладеніну [473]. Багато наукових праць та досліджень присвячено медико-соціальной проблемі післяопераційної когнітивної дисфункції (ПОКД). ПОКД – це когнітивний розлад, який розвивається у післяопераційний період (може проявлятися відстрочено у часі) і пов'язаний з порушенням вищих коркових функцій, частіше проявляється у вигляді порушення пам'яті, мовлення, зниженні концентрації уваги та інше.

Найбільш достовірне вивчення частоти виникнення післяопераційної когнітивної дисфункції, яке звертає на себе увагу, є міжнародне рандомізоване контрольоване дослідження ISPOCD1 study, опубліковане у 1998 році. За результатами цього дослідження, когнітивна дисфункція була діагностована у 8% пацієнтів через 7 днів після хірургічного втручання та у 9,9% через 99 днів після операції [474], що свідчить про поширеність цієї проблеми у світі і актуальність її вивчення. Етіологія та патогенез ПОКД складні та багатофакторні. До факторів ризику відносять генетичні та деякі соматичні захворювання, передопераційний стрес та інше, але у ISPOCD1 study загальна анестезія, як основний етіологічний фактор, була переконливо доведена. У зв'язку з цими даними закономірно постає питання про використання у

повсякденній практиці ефективних та безпечних нейропротекторних засобів для захисту від негативних наслідків загальної анестезії. Ці засоби повинні діяти на ті самі структури, що пригнічені дією загальної анестезії та переривати каскади патологічних реакцій. Відповідно до визначення ВООЗ, ноотропи – це фармакологічні засоби, які активують навчання, поліпшують пам'ять і розумову діяльність, а також підвищують стійкість мозку до агресивних дій гіпоксії, травм, інтоксикації. Обґрунтованим може стати використання метаболітотропного ендотеліопротекторного препарату Пірацетам, який проявляє нейропротекторну дію, що доведено у багатьох дослідженнях [310]. Також у якості церебропротектора можна розглядати препарат Цераксон, який інгібує активацію деяких фосфоліпаз (A1, A2, C і D), зменшує утворення вільних радикалів, запобігає руйнуванню мембранних систем, зберігає антиоксидантні захисні системи та інгібує апоптоз. Останнім часом з'явилися роботи про цитокінові механізми патогенезу наркоз-індукованої нейродеструкції [475].

Важливе значення в пошкодженні головного мозку має цитокіновий дисбаланс- гіперпродукція IL-1 $\beta$  і відносний дефіцит його рецепторного антагоніста IL-2. Це дозволяє розглядати рецептори IL-1 як перспективну мішень нейропротекції при наркоз-індукованому пошкодженні головного мозку. Рядом робіт показана нейропротективна активність блокатора IL-1 IL-1Ra при експериментальному гострому порушенні мозкового кровообігу, черепно-мозковій травмі, діабетичної енцефалопатії [476, 477]. Рекombінантний IL-1Ra є неглікозильованим аналогом природного білка, який відрізняється від нативної форми однією амінокислотою послідовністю в N-термінальній частині. Відомо, що гіперстимуляція N-метил-D-аспартатних рецепторів викликає надлишковий приплив Ca<sup>2+</sup>, що спонукає утворення вільних радикалів, активації протеолітичних процесів і, у кінцевому підсумку, до некрозу нейрона. В той же час помірною активацією NMDA-рецепторів призводить до оксидативного стресу та нейроапоптозу [478]. Виходячи з цього кетамін, як неконкурентний антагоніст NMDA-рецепторів, не повинен викликати



ексайтотоксичність, а навпаки викликати церебропротективний ефект. Експериментально доведено, що кетаміновий наркоз викликає ПОКД у вигляді тривожності та когнітивних розладів, що пов'язано з нейроапоптозом. Існують переконливі данні відносно дозозалежної апоптичної нейродегенерації, викликаній кетаміном, у незрілому мозку мишей. Механізм нейроапоптозу пов'язаний з індукуванням кетаміном вираженої експресії c-fos у задній пояській звивині та у ретроспленальній корі (РС). Кетамін-індукована експресія опосередковується не тільки через NMDA-рецептори, але й через сигма-рецептори [479, 480].

Апоптоз – запрограмована смерть клітини зі складним патогенезом. Регуляція апоптозу в нервовій системі здійснюється багаточисленними сигнальними системами. Одним з шляхів реалізації цього процесу є пряма активація генів ранньої негайної відповіді (c-jun, c-fos). C-Fos білок виконує функцію регулятора транскрипції ряду індукцибельних генів та відіграє вагомую роль у процесах клітинного росту та диференціюванні, є визнаним маркером активації нейрональних клітин [481]. Одним з захисних механізмів організму є продукція антиапоптичних модуляторів, один з яких – білок bcl-2, дія якого пов'язана з нормалізацією функції мітохондрій.

Результати цього дослідження підтверджують апоптичну дію кетамінового наркозу, шляхом збільшення експресії c-fos білків (табл. 8.27-8.28). У групі контролю виявлено, що у щурів які отримували кетаміновий наркоз, збільшується, майже у 10 разів ( $p < 0,01$ ), експресія c-fos у CA1 зоні гіпокампу мозку у порівнянні з інтактною групою, що свідчить про активацію нейроапоптозу. У щурів, які отримали у якості нейропротекторного засобу Пірацетам після кетамінового наркозу, відмічається зниження кількості c-fos-позитивних нейронів у порівнянні з контрольною групою на 8,6 % ( $p < 0,05$ ), що свідчить про зменшення проапоптичних процесів. У групі тварин з кетаміновим наркозом, які отримували Цераксон, відмічається зниження кількості c-fos на 14% ( $p < 0,05$ ) відносно контролю, а у тварин, які отримували IL-1RA -гель на 25,5% ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з контрольною групою.

Таблиця 8.27

**Вплив пірацетаму, цераксону та ІЛ-1Ra-гелю на щільність c-fos-позитивних клітин у головному мозку щурів з кетаміновим наркозом (M±m, n=10)**

Групи тварин	Щільність c-fos-позитивних клітин
Інтактні тварини	12,9±2,0
Контроль – тварини з наркозом кетаміном (контроль)	127,4±5,0*
Тварини з наркозом кетаміном + пірацетам	116,4±5,0*
Тварини з наркозом кетаміном + цераксон	109,6±7,6* <sup>1</sup>
Тварини з наркозом кетаміном + ІЛ-1Ra-гель	91,1±4,6* <sup>1,2</sup>

Примітка. \* –  $p < 0,05$  відносно групи інтактних тварин, <sup>1</sup> –  $p < 0,05$  відносно групи контролю, <sup>2</sup> –  $p < 0,05$  відносно групи пірацетаму, n – кількість тварин у групі

Таблиця 8.28

**Вплив пірацетаму, цераксону та ІЛ-1Ra-гелю на концентрацію bcl-2 білку в головному мозку щурів з кетаміновим наркозом (M±m, n=10)**

Групи тварин	Концентрація bcl-2 білку
Інтактні тварини	45,2±2,3
Контроль – тварини з наркозом кетміном (контроль)	23,2±2,3*
Тварини з наркозом кетаміном + пірацетам, 500 мг/кг	24,4±1,6*
Тварини з наркозом кетаміном + цераксон	32,6±4,8* <sup>1,2</sup>
Тварини з наркозом кетаміном + ІЛ-1Ra-гель	38,2±3,9* <sup>1,2</sup>

Примітка. \* –  $p < 0,05$  відносно групи інтактних тварин, <sup>1</sup> –  $p < 0,05$  відносно групи контролю, <sup>2</sup> –  $p < 0,05$  відносно групи пірацетаму, n – кількість тварин у групі

Найкращий стабілізуючий ефект на рівень c-fos білку у CA1 зоні гіпокампу мозку щурів продемонстрував IL-1RA-гель, який на 11,5% перевищив антиапоптичний ефект Цераксону і на 16,9 % Пірацетаму. У цьому дослідженні також вивчали вплив нейропротекторних засобів на рівень антиапоптичного білку bcl-2 (табл. 8.28). У контрольній групі, після кетамінового наркозу, спостерігалось зменшення рівня bcl-2 у порівнянні з інтактною групою на 48,7% ( $p < 0,01$ ), що свідчить про зменшення протиапоптичного захисту головного мозку та виникнення нейродегенерації у тварин.

У щурів, які отримували нейропротекторні засоби після кетамінового наркозу, спостерігалися наступні результати: при використанні Пірацетаму кількість bcl-2 білку зменшувалася у головному мозку щурів на 54% у порівнянні з інтактною групою, а у порівнянні з контрольною групою концентрація bcl-2 білку більше на 5%; при використанні Цераксону відмічалось зменшення bcl-2 білку на 27,9%, але у порівнянні з контрольною групою концентрація протиапоптичного білку у головному мозку на 40,5% більше; у тварин, які отримували IL-1RA-гель після кетаміну, виявлено зменшення кількості bcl-2 у гомогенаті на 22,1% порівняно з інтактом, а у порівнянні з контрольною групою концентрація bcl-2 білку більше на 64,7%. Отримані результати свідчать про активацію апоптозу у нейрональних клітинах щурів, викликаного кетаміном, застосованим у стандартних дозах. Кетамін достовірно зменшує антиапоптичний захист організму шляхом пригнічення bcl-2 білку у головному мозку і у цей же час збільшує експресію білку швидкого реагування c-fos у CA1 зоні гіпокампу, що призводить до запрограмованою загибелі нейрону. Використання нейропротекторних лікарських засобів достовірно перешкоджає виникненню каскадів патологічних реакцій, ці препарати зменшують експресію генів раннього реагування і активують протиапоптичні захисні механізми. У порівнянні з іншими ноотропами IL-1Ra гель показав найкращий результат, як у відношенні зниження щільності c-fos-позитивних нейронів, так і у зберіганні антиапоптичного білку bcl-2 в умовах

кетамінового наркозу, що потребує розглядання питання щодо рутинного використання нейропротекторних засобів у повсякденній практиці лікарів з метою попередження негативного впливу загального наркозу кетаміном [482]. Відомий каспаза 1 залежний механізм апоптозу нейронів CA1 гіпокампу після кетамінової анестезії, пов'язаний з виходом з мітохондрій іпроапоптичних білків. Встановлено, що активні білки каспаз-3 і -9, які відповідальні за вивільнення цитохрому С і мітохондріальну транслокацію p53, яка пов'язана з мітохондріальних апоптозом, значно активуються після одноразового введення кетаміну. Також введення кетаміну підвищує рівні білків, пов'язаних з піроптозом, включаючи каспазу-1 і -11, сімейство NOD-подібних рецепторів, піриновий домен, що містить 3 (NLRP3), а також IL-1 $\beta$ . Також відомо, що анестезія кетаміном або тіопенталом призводять до підвищення рівнів IL-1 і TNF $\alpha$  в гіпокампі через 2 год після наркозу [483].

За сучасними уявленнями, характер імунної відповіді і особливості розвитку патофізіологічних змін при нейродеструкції, як ішемічної, так і неішемічної природи, залежить від переважної активації субпопуляцій Т-лімфоцитів, синтезу ними цитокінів різних типів і формування «цитокінового каскаду», а саме співвідношення прозапальних та протизапальних цитокінів. При пошкодженні тканини мозку активована мікроглія починає продукувати прозапальні цитокіни, в першу чергу IL-1b, який сприяє збільшенню набряку мозкової тканини, кількості адгезованих до ендотелію. IL-1b може підвищувати експресію iNOS і стимулювати NO-механізми нейродеструкції. Це індукує нейроапоптоз, веде до відстрочених нейрональних втрат і зниження когнітивних і мнестичних функцій ЦНС [366].

Антиапоптична та нейропротективна дія IL-1Ra-гелю при кетамін-індукованої нейродеструкції пов'язана з його здатністю переривати IL-1 $\beta$ -залежні механізми нейроапоптозу. А саме, IL-1Ra гель гальмує IL-1-залежну експресію в гліальних клітинах iNOS і знижує гіперпродукцію NO, гальмує вихід з мітохондрії іпроапоптичних білків. IL-1Ra-гель може гальмувати

експресію редокс-чутливих генів апоптозу раннього реагування – переважно JunD і c-Fos за рахунок зниження рівня NO [484].

Цераксон може надавати антиапоптичну і нейропротективну дію при наркоз-індукованому ушкодженні головного мозку за рахунок наявності у нього вираженого мітопротективного ефекту, що може лежати в основі його антиапоптичної активності. Ймовірно, цераксон модулює активність циклоспорин А-залежної мітохондріальної пори при ішемії і гальмує вихід через неї іпроапоптичних факторів. Показано, що цераксон може зберігати цілісність внутрішньої мембрани мітохондрії. Подібний механізм пов'язаний з відновленням рівня кардіоліпіну у внутрішній мембрані мітохондрій. Крім цього, виявлено, що цитиколін опосередковано, шляхом збільшення активності глутатіон-пов'язаних ферментів (глутатіон-редуктаза і глутатіон-трансфераза) регулює рівень відновленого глутатіону і, тим самим, може знижувати урівень цитоксичних дериватів NO [310]. Також відомо про здатність Цераксону інгібувати апоптоз шляхом зменшення експресії прокаспаз [485]. Пірацетам не виявляв достовірної антиапоптичної і нейропротективної дії при кетамін-індукованої нейродеструкції. Механізм дії цього ноотропу пов'язано з активацією анаеробних шляхів синтезу АТФ в головному мозку, підвищенням рівня ацетилхоліну і концентрації н-холінорецепторів. Відомі мембраностабілізуючі і стреспротективні властивості пірацетама. Відомо, що пірацетам малоефективний при екстремальних станах ЦНС, може посилити лактат-ацидоз при церебральній ішемії. Встановлено, що пірацетам підсилює тривожність і не впливає на когнітивно-мнестичні розлади після кетамінової анестезії [405].

Таким чином, у відтвореному експерименті продемонстрована нейродеструктивна дія кетамінового наркозу (100 мг/кг) шляхом активації процесів апоптозу (збільшення щільності c-fos позитивних клітин у СА1 зоні гіпокампу) та пригнічення захисної спроможності організму (зменшення bcl-2 білку у головному мозку). Використання таких церебропротекторних засобів, як Пірацетам, Цераксон та IL-1Ra -гель, у щурів, отримавших загальний наркоз,

призводить до зменшення нейродеструктивної дії кетаміну, що відображається у зменшенні концентрації c-fos білку та у збільшенні експресії bcl-2 білку. Найкращий нейропротекторний ефект продемонстрував IL-1Ra-гель, у порівнянні з іншими препаратами він найбільш значно впливав на експресію c-fos та bcl-2 білків, зменшуючи перший та активізуючи другий. Другий за ефективністю препарат – Цераксон, за ним йде Пірацетам.

За матеріалами розділу опубліковано праці [388, 392, 394, 405, 430, 482].

## ВИСНОВКИ

1. Розроблений за допомогою нової інформаційної технології інтраназальний гель з ноопептом проявляє церебропротективну дію на моделі розсіяного склерозу:

– введення гелю з ноопептом (10 мг/кг) разом з метилпреднізолоном щурам з ЕАЕ приводить до зниження тривожності, підсилює медикаментозний сон, активує орієнтовно-дослідницьку активність, зменшує ступінь неврологічних порушень і покращує пам'ять експериментальних тварин. За силою дії гель з ноопептом достовірно перевершує цитиколін;

– введення гелю з ноопептом разом з метилпреднізолоном щурам з ЕАЕ приводить до підвищення щільності нейронів на 19%, збільшення в них концентрації РНК на 21% і частки апоптичних нейронів на 44,6%, а також підвищує HSP<sub>70</sub> на 50% і 64% відповідно в мітохондріях і цитозолі нейронів головного мозку;

2. Введення гелю з ноопептом (10 мг/кг) щурам після загальної анестезії достовірно зменшувало кетамін-індуковані когнітивно-мнестичні порушення: зниження тривожності, страху, збудливості, зменшення помилок робочої (в 6,5 раз) та референтної (в 3 рази) пам'яті. За цими показниками гель з ноопептом, достовірно перевершує як Цереброкурин, так і Пірацетам.

3. Розроблений за допомогою нової інформаційної технології інтраназальний гель РАІЛ проявляє значні церебропротективні властивості на моделях гострої і хронічної церебральної ішемії:

– введення інтраназально гелю РАІЛ (1 мг/кг) щурам з двосторонньою перев'язкою загальних сонних артерій протягом 18 діб (хронічна церебральна ішемія) приводило до нормалізації тіол-дисульфідної системи головного мозку – підвищення на 100% рівня глутатіону відновленого, активності ГР на 96,1%, ГПР на 68,1%, а GST на 137,7% на фоні зниження рівня нітротирозину в цитозольних фракціях головного мозку;

– при курсовому введенні гелю РАІЛ концентрація білка HSP<sub>70</sub> в цитоплазмі гомогенату головного мозку тварин підвищувалася на 98,4%, а в мітохондріях на 142,8% разів у порівнянні з показниками контролю;

– введення інтраназально гелю РАІЛ (1 мг/кг) щурам з двосторонньою перев'язкою загальних сонних артерій протягом 18 діб приводило до зниження важкої неврологічної симптоматики (на 20% до 4 діб і на 30% до 18 діб), зниження летальності на 30% і зменшення когнітивно-мнестичних порушень на 18 добу;

– введення інтраназально гелю РАІЛ (1 мг/кг) щурам з двосторонньою перев'язкою загальних сонних артерій протягом 4 діб (гостра церебральна ішемія) приводило до нормалізації нітроксидазної системи головного мозку – зниження в цитоплазмі і мітохондріях головного мозку активності NOS нітритів, нітротирозину. РАІЛ приводив до зниження експресії iNOS в цитоплазмі і мітохондріях головного мозку на 47,7% і на 52,9% відповідно та експресії мРНК iNOS в CA1 зоні гіпокампу на 94,3% в порівнянні з групою контролю;

– введення інтраназально гелю РАІЛ (1 мг/кг) щурам з двосторонньою перев'язкою загальних сонних артерій протягом 4 діб (гостра церебральна ішемія) приводила до нормалізації тіол-дисульфідної системи головного мозку – підвищення рівня відновлених тіольних на 216% і зниження окислених форм на 68 %, підвищення в 2,6 раз відновленого глутатіону в цитоплазмі головного

мозку тварин з ГПМК, активності ГР, ГПР, а GST на фоні зниження рівня гомоцистеїну і нітротирозину в цитоплазмі головного мозку тварин з ГПМК;

– при курсовому введенні гелю РАІЛ підвищувалася концентрація білку HSP<sub>70</sub> в цитоплазмі і мітохондріях гомогенату головного мозку тварин на 4-у добу ГПМК;

– введення інтраназально гелю РАІЛ щурам з двосторонньою перев'язкою загальних сонних артерій протягом 4 діб приводило до покращення енергетичного обміну головного мозку – підвищення рівня АТФ на 60%, малату на 32% на фоні зниження лактату на 42% і нормалізації функції мітохондрій (зниження швидкості відкриття пори на 70% і підвищення потенціалу мембрани на 138%);

– РАІЛ гель за ступенем впливу на показники церебропротективної активності достовірно перевершує референс-препарат Цитиколін;

– введення гелю РАІЛ (1 мг/кг) щурам після загальної анестезії достовірно зменшувало кетамін-індукований нейроапоптоз – знижувало експресію c-fos і підвищувало концентрацію антиапоптичного білку bcl-2.

4. Отримані результати є експериментальним обґрунтуванням для подачі в ДЕЦ МОЗ України документів з метою отримання дозволу для 1 фази клінічних випробувань нових лікарських форм – інтраназальних гелів з ноопептом і РАІЛ.



## ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, яка присвячена вирішенню актуальної проблеми фармації – розробці інтраназальних лікарських форм церебропротективної дії, уперше запропоновано теоретичну концепцію комплексного методологічного підходу на базі якої, з використанням інформаційної технології, створені рідкі гелі з активними фармацевтичними інгредієнтами пептидної природи – етиловим естером N-фенілацетил-1-пролілглїцину (Ноопепт) та IL-1Ra (РАІЛ) і, в результаті доклінічних досліджень, показано їх високу специфічну (ноотропну, протиішемічну, нейропротективну) активність та безпечність, обґрунтовано застосування їх в терапії захворювань мозку дегенеративного та судинного генезу.

1. В результаті патентно-літературного аналізу окреслено актуальність проблеми лікування захворювань головного мозку судинного та дегенеративного походження, а проведеними маркетинговими дослідженнями назальних та ноотропних засобів охарактеризовано перспективність розширення асортименту назальних лікарських форм системної дії з церебропротективними властивостями. Аналізом конкурентоспроможності встановлено, що найбільша конкуренція спостерігається у назальних засобів місцевого застосування, та практично відсутня конкуренція у назальних препаратів системної дії. Розраховані коефіцієнти доступності по групах лікарських засобів N06BX свідчать про низьку доступність препаратів та окреслюють необхідність створення нових вітчизняних лікарських засобів.

2. Уперше розроблено теоретичні основи для нової інформаційної технології, а саме комплексну методологію підходу створення інтраназальних рідких гелів з покращеними церебропротективними властивостями та високим рівнем безпечності при системному застосуванні. Уперше створено нову інформаційну технологію для *in silico* обґрунтування раціональних складів інтраназальних лікарських форм церебропротективної дії та спроектовано експертну систему «ExpSys Nasalia», застосування яких дозволило

спрогнозувати склад розроблених назальних рідких гелів та встановити фактори, які впливають на нейродоступність.

3. Уперше, в результаті комплексних фізико-хімічних, фармакотехнологічних та біофармацевтичних досліджень, теоретично, за допомогою створеної нової інформаційної технології, та експериментально, опрацьована розробка назального препарату церебропротективної дії на прикладі низькомолекулярного пептиду - активного фармацевтичного інгредієнту етилового естеру N-фенілацетил-1-пролілгліцину:

– встановлено, що вид мукоадгезивних полімерів гідрофільних основ, та спирти для зволоження, значимо впливають на вивільнення N-фенілацетил-1-пролілгліцину з гелевих назальних форм. Оптимальне вивільнення забезпечували натрієва сіль карбоксиметилцелюлози з додаванням гліцерину;

– визначено, що додавання енхансеру адсорбції – твіну-80, в концентрації 1%, чинить значимий вплив на вивільнення N-фенілацетил-1-пролілгліцину з назальної лікарської форми;

– теоретичними *in silico*, та експериментальними термогравіметричними дослідженнями встановлено, що розроблена назальна форма з N-фенілацетил-1-пролілгліцином є механічною сумішшю діючої та допоміжних речовин, інгредієнти якої не взаємодіють між собою та можуть поєднуватись в одній лікарській формі. Враховуючи термогравіметричні характеристики інгредієнтів назальної лікарської форми з N-фенілацетил-1-пролілгліцином, виявлено, що технологічний процес виготовлення доцільно проводити з урахуванням термолабільних сполук, а саме консервант доцільно вводити при температурі не вище 40 °C;

– експериментальними дослідженнями встановлено, що прогнозований термін зберігання розробленої лікарської форми становить 6 місяців при температурі 8-15°C;

– технологію та рецептуру опрацьованого інтраназального засобу з етиловим естером N-фенілацетил-1-пролілгліцину викладено в інформаційному листі Укрмедпатентінформ МОЗ України з проблеми «Фармація»

«Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір N-фенілацетил-1-пролілгліцину в умовах аптеки» та апробовано в умовах екстемпорального виробництва низки аптекних закладів.

4. Уперше, за результатами комплексних фізико-хімічних, фармакотехнологічних та біофармацевтичних досліджень теоретично, за допомогою створеної нової інформаційної технології, та експериментально, опрацьовано розробку назального препарату церебропротективної дії на прикладі високомолекулярного пептиду – IL-1Ra:

– в результаті досліджень виявлено, що оптимальне вивільнення IL-1Ra з назальних композицій забезпечують допоміжні речовини – гідрофільний мукоадгезивний компонент – натрій карбоксиметилцелюлоза з додаванням спирту-зволожувача – D-пантенолу. З метою стабілізації інтраназального рідкого гелю до складу рецептури доцільно додавати фосфатний буферний розчин 6.0 та трилон Б;

– враховуючи результати *in silico* прогнозування проникності IL-1Ra через гематоенцефалічний бар'єр, до складу рецептури доцільно додати збільшену кількість енхансеру назальної адсорбції твіну-80 з метою покращення біофармацевтичних властивостей. Отримані експериментально результати показників кінетики свідчать, що вивільнення IL-1Ra з назальної форми підпорядковується рівнянню першого порядку;

– теоретичними *in silico* та експериментальними термогравіметричними дослідженнями встановлено, що розроблена назальна форма з IL-1Ra є механічною сумішшю діючої та допоміжних речовин, інгредієнти якої не взаємодіють між собою та можуть поєднуватись в одній лікарській формі. Враховуючи термогравіметричні характеристики інгредієнтів назальної лікарської форми з IL-1Ra, виявлено, що технологічний процес виготовлення доцільно проводити з урахуванням термолабільних сполук, а саме консервант доцільно вводити при температурі не вище 40°C, а потім при охолодженні до 20°C додати IL-1Ra;

– експериментальними дослідженнями встановлено, що прогнозований термін зберігання рідкого гелю з IL-1Ra при температурі 2-8°C становить 24 місяці;

– технологію розробленого рідкого назального гелю з IL-1Ra враховано в технологічних схемах виготовлення та апробовано в умовах промислового виробництва ТОВ «Мобіль Медікал» (м. Київ). Опрацьовані контрольні точки технологічного процесу дозволяють виготовляти лікарський засіб з прогнозованою якістю відповідно до рекомендацій ICHQ8.

5. Уперше, враховуючи характер природи рідких назальних мукоадгезивних гелів, розроблено конструкторську документацію на назальну одноразову насадку за допомогою засобу автоматизованого проєктування, яка містить креслення складових частин виробу, а також інших даних необхідних для його виготовлення та контролю. За результатами досліджень отримано лабораторний зразок спроектованої назальної одноразової насадки на принтері тривимірного друку, що дозволило підтвердити можливість збирання деталей назальної насадки, зовнішню герметичність пристрою, герметичність конусного з'єднання при введенні дослідних назальних гелів з одноразових шприців типу Луер. На отриману назальну насадку для одноразового застосування розроблена нормативно-технічна документація у вигляді технічних умов з метою виготовлення готового виробу в умовах промислового виробництва.

6. Проведеними токсикологічними дослідженнями встановлено, що розроблені за допомогою нової інформаційної технології інтраназальні форми з етиловим естером N-фенілацетіл-1-пролілгліцину (Ноопепт) та IL-1Ra (РАІЛ), при інтраназальному введенні в максимально допустимому обсязі, відносяться до VI класу токсичності (відносно нешкідливі речовини) і не проявляють місцево-подразнюючої і алергізуючої дії.

7. Вивчення загальнотоксичної дії розроблених рідких гелів з IL-1Ra і ноопептом (інтраназально протягом 90-днів, в максимально допустимому обсязі, 0,4 мл) показало, що зазначені лікарські форми не мають негативного впливу на

інтегральні показники експериментальних тварин (маса тіла, температура, рухова і дослідницька активність, тривожність), на серцево-судинну систему, на показники периферичної крові (кількість еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів, швидкість осідання еритроцитів, вміст гемоглобіну, резистентність еритроцитів), на показники функції нирок і печінки і не викликають токсичних змін гістоструктури внутрішніх органів (мозок, печінка, легені, шлунок, селезінка, наднирники, сім'яники) експериментальних тварин.

8. Уведення розробленого гелю з ноопептом (10 мг/кг), разом з метилпреднізолоном, щурам з експериментальним алергічним енцефамієлітом, приводило до зниження тривожності, підсилювало медикаментозний сон, активізувало орієнтовно-дослідницьку активність, зменшувало ступінь неврологічних порушень і покращувало пам'ять експериментальних тварин, а також призводило до підвищення щільності нейронів на 19%, збільшення в них концентрації РНК на 21% і зниження частки апоптичних нейронів на 44,6%, а також підвищення HSP<sub>70</sub> на 50% і 64% відповідно в мітохондріях та цитозолі нейронів головного мозку. Розроблений гель з ноопептом в дозі (10 мг/кг) у щурів, після загальної анестезії, достовірно зменшував кетамін-індуковані когнітивно-мнестичні порушення – зниження тривожності, страху та збудливості і зменшення помилок робочої (в 6,5 раз) і референтної (в 3 рази) пам'яті на фоні зменшення явищ кетамін-індукованого нейроапоптозу – знижував експресію c-fos і підвищував концентрацію антиапоптичного білку bcl-2.

9. Курсове інтраназальне введення гелю РАІЛ (1 мг/кг) щурам після двосторонньої перев'язки загальних сонних артерій, призводило до нормалізації тіол-дисульфідної системи головного мозку – підвищення на 100% рівня глутатіону відновленого, активності ГР на 96,1%, ГПР на 68,1%, а GST на 137,7% на фоні зниження рівня нітротирозину в цитозольних фракціях головного мозку і підвищення концентрації HSP<sub>70</sub> в цитоплазмі і мітохондріях головного мозку на 98,4% і на 142,8% відповідно в порівнянні з показниками контролю на 18 добу експерименту.

10. Гель РАІІ знижував важку неврологічну симптоматику (на 20% на 4 добу та на 30% на 18 добу), летальність на 30% і зменшував когнітивно-мнестичні порушення у експериментальних тварин на 18 добу після оклюзії сонних артерій. Застосування РАІІ призводило до нормалізації нітродергічної системи головного мозку – зниження активності NOS нітритів, нітротирозину, а також до зниження експресії іNOS в цитоплазмі і мітохондріях головного мозку на 47,7% і на 52,9% відповідно і експресії мРНК іNOS в CA1 гіпокампі на 94,3% в порівнянні з групою контролю на 4-у добу після оклюзії сонних артерій.

11. Введення інтраназально гелю РАІІ щурам з двосторонньою перяв'язкою загальних сонних артерій на 4-у добу експерименту призводило до нормалізації тіол-дисульфідної системи головного мозку – підвищення рівня відновлених тіольних на 216% і зниження окислених форм на 68%, підвищення в 2,6 разів відновленого глутатіону і HSP<sub>70</sub>, активності ГР, ГПР, та GST на фоні зниження рівня гомоцистеїну і нітротирозину в цитоплазмі; до покращення енергетичного обміну головного мозку – підвищення рівня АТФ на 60%, малату на 32% на фоні зниження лактату на 42% і нормалізації функції мітохондрій (зниження швидкості відкриття пори на 70 % і підвищення потенціалу мембрани на 138%).

12. Результати експериментальних фармако-токсикологічних досліджень, розроблених за допомогою нової інформаційної технології лікарських форм – гелів для інтраназального застосування етилового естеру N-фенілацетил-1-пролілгліцину та ІL-1Ra, підтверджують їх високу церебропротективну активність та перевагу над референс-препаратами – Цереброкурин, Цитиколін і Пірацетам; а також безпеку і нешкідливість, що є обґрунтуванням для першої фази клінічних випробувань.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Buckner R. L, DiNicola L. M. The brain's default network: updated anatomy, physiology and evolving insights. *Nat Rev Neurosci*. 2019. № 20 (10). P. 593-608.
2. Черненко-Курагіна Н. П. Фізіологічні характеристики розумової діяльності людей з різними індивідуально-типологічними властивостями вищої нервової діяльності при низькому темпі переробки інформації. *Вісник Черкаського університету. Серія : Біологічні науки*. 2016. № 1. С. 120-125.
3. Madhok D. Y, Vitt J. R, Nguyen A. T. Overview of Neurovascular Physiology. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2018. № 18 (12). P. 99.
4. Daneman R., Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015. № 7 (1). P. a020412.
5. Малахов В. О. Личко В. С., Грецьких К. В. Гематоенцефалічний бар'єр як частина нейро-імунно-ендокринної. *Український неврологічний журнал*. 2014. № 1. С. 25-30.
6. Ларіонов В. Б. Федорова О. А., Головенко М. Я. Аналіз проникності гематоенцефалічного бар'єра для нижчих аліфатичних спиртів на основі фармакодинамічних і нейротоксичних ефектів. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2013. № 4-5. С. 19-36.
7. Прогнозування в досліджах *in silico* взаємодії габапентину з метилпреднізолоном як засобів комбінованої терапії демієлінізуючих захворювань / О. О. Нефьодов та ін. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2016. № 2. С. 67-73.
8. Schain M., Kreisl W. Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders-a Review. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2017. № 3. P. 25.
9. Dugger B. N., Dickson D. W. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017. № 9 (7). P. a028035.
10. Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature*. 2016. № 539. P. 180–186.

11. World Health Organization. Global action plan on the public health response to dementia 2017-2025. Geneva : World Health Organization, 2017.
12. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 2017. № 13. P. 325-373.
13. Brown R. C., Lockwood A. H., Sonawane B. R. Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. *Environ Health Perspect*. 2005. № 113 (9). P. 1250-1256.
14. Wu Q.J., Tymianski M. Targeting NMDA receptors in stroke: new hope in neuroprotection. *Mol Brain*. 2018. 11 (15). Режим доступу : <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0357-8>
15. Ischaemic stroke / B. C. V. Campbell et al. *Nat Rev Dis Primers*. 2019. № 5 (70). Режим доступу : <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0118-8>
16. Sveinsson O. A, Kjartansson O., Valdimarsson E. M. Heilablóðþurrð/heiladrep: Faraldsfræði, orsakir og einkenni [Cerebral ischemia/infarction – epidemiology, causes and symptoms]. *Laeknabladid*. 2014. № 100 (5). P. 271-279.
17. Foreman B. The Pathophysiology of Delayed Cerebral Ischemia. *J Clin Neurophysiol*. 2016. № 33 (3). P 174-182.
18. Мурашко Н. К., Сулік Р. В. Хронічне порушення мозкового кровообігу: акцент на діагностику та лікування. *Ліки України*. 2011. № 9. С. 58-63.
19. Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke / D. Radak et al. *Curr Vasc Pharmacol*. 2017. № 15 (2). P. 115-122.
20. Neuron Protection as a Therapeutic Target in Acute Ischemic Stroke / Antonino Tuttolomondo et al. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2009. № 9 (14). Режим доступу : <https://doi.org/10.2174/156802609789869646>
21. Горбачова С. В., Беленічев І. Ф., Кучеренко Л. І. Порушення функціонування сполученої системи «відновлені тіоли – оксид азоту» при гострому порушенні мозкового кровообігу та можливі шляхи їх корекції. *Медична та клінічна хімія*. 2015. № 4. С.63-67.



22. Yamashita T., Abe K. Recent Progress in Therapeutic Strategies for Ischemic Stroke. *Cell Transplant.* 2016. № 25 (5). P. 893-898.
23. Хайтович М. В. Сучасна нейропротекція в педіатрії. *Zdorov'e Rebenka.* 2020. № 15 (6). С. 450-455.
24. Уніфікований клінічний протокол медичної допомоги ішемічний інсульт (екстрена, первинна, вторинна (спеціалізована) медична допомога, медична реабілітація). Наказ Міністерства охорони здоров'я 03.08.2012 № 602. ГС 2012-602.. 2012. 120 с.
25. Рациональная нейропротекция / И. Ф. Беленичев и др. – Донецк : Издатель Заславский А.Ю., 2009. 262 с.
26. Віничук С. М., Ілляш Т. І., Прокопів М. М. Нейропротекція ішемічної напівтіні. *Укр. мед. часоп.* 2005. № 5. С. 68-74.
27. Nimodipine in acute ischemic stroke: a double-blind controlled study / A. Paci et al. *Acta Neurologica Scandinavica.* 1989. № 80. P. 282-286.
28. Calcium antagonists for acute ischemic stroke / J. Zhang et al. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019. № 13, 2 (2). P. CD001928.
29. The effect of nimodipine on the evolution of human cerebral infarction studied by PET / A. M. Hakim et al. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1989. № 9 (4). P. 523-34.
30. Nimodipine Reappraised: An Old Drug With a Future / A. P. Carlson et al. *Curr Neuropharmacol.* 2020. № 18 (1). P. 65-82.
31. Lai T. W., Zhang S., Wang Y. T. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol.* 2014. № 115. P. 157-88.
32. Additive neuroprotective effects of dextrophan and cycloheximide in rats subjected to transient focal cerebral ischemia / C. Du et al. *Brain Res.* 1996. № 718 (1-2). P. 233-236.
33. Werling L. L., Lauterbach E. C., Calef U. Dextromethorphan as a potential neuroprotective agent with unique mechanisms of action. *The Neurologist.* 2007. № 13 (5). P. 272-293.

34. Kuzenkov V. S., Krushinskii A. L. Protective Effect of Magnesium Nitrate against Neurological Disorders Provoked by Cerebral Ischemia in Rats. *Bull Exp Biol Med.* 2014. № 157. P. 721-723.
35. Advances in stroke pharmacology / Z. Zhou et al. *Pharmacol Ther.* 2018. № 191. P. 23-42.
36. Palliative ketamine: the use of ketamine in central post-stroke pain syndrome-a case report / R. Angstadt et al. *Ann Palliat Med.* 2020. apm-20-972. Режим доступа : doi: 10.21037/apm-20-972
37. Role of Steroid Therapy after Ischemic Stroke by n-Methyl-d-Aspartate Receptor Gene Regulation / A. A. Tameh et al. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2018. № 27 (11). P. 3066-3075.
38. Yu G., Wu F., Wang E. S. BQ-869, a novel NMDA receptor antagonist, protects against excitotoxicity and attenuates cerebral ischemic injury in stroke. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015. № 8 (2). P. 213-225.
39. Akpan N., Troy C. M. Caspase inhibitors: prospective therapies for stroke. *Neuroscientist.* 2013. № 19 (2). P. 29-36.
40. Chi H., Chang H. Y., Sang T. K. Neuronal Cell Death Mechanisms in Major Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018. № 19 (10). P. 3082.
41. Magnolol derivative 002C-3 protects brain against ischemia-reperfusion injury via inhibiting apoptosis and autophagy / H. Li et al. *Neurosci Lett.* 2015. № 588. P. 178-83.
42. Resveratrol provides neuroprotection by regulating the JAK2/STAT3/PI3K/AKT/mTOR pathway after stroke in rats / Y. Hou et al. *Genes Dis.* 2018. № 5 (3). P. 245-255.
43. Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy: Potential Targets of Mesenchymal Stem Cells-Based Therapies in Ischemic Stroke / J. He et al. *Front Neurosci.* 2021. № 26 (15). P. 641157.
44. Kang J., Pervaiz S. Mitochondria: redox metabolism and dysfunction. *Biochem Res Int.* 2012. P. 896751.

45. Oxidative Stress at the Crossroads of Aging, Stroke and Depression / A. Shao et al. *Aging Dis.* 2020. № 11 (6). P. 537-1566.
46. Neuropharmacological Potential and Delivery Prospects of Thymoquinone for Neurological Disorders / M. Jakaria et al. *Oxid Med Cell Longev.* 2018. № 2018. P. 1209801.
47. Effects of ebselen on ischemia/reperfusion injury in rat brain / M. Aras et al. *Int J Neurosci.* 2014. № 124 (10). P. 771-776.
48. Parnham M., Sies H. Ebselen: prospective therapy for cerebral ischaemia. *Expert Opin Investig Drugs.* 2000. № 9 (3). P. 607-619.
49. Botanical phenolics and brain health / A. Y. Sun et al. *Neuromolecular Med.* 2008. № 10 (4). P. 259-274.
50. NOX Inhibitors – A Promising Avenue for Ischemic Stroke / J. Y. Kim et al. *Exp Neurobiol.* 2017. № 26 (4). P. 195-205.
51. Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on ischemia-reperfusion hippocampus injury in rat brain / M. Kapoor et al. *Biomed Pharmacother.* 2018. № 97. P. 458-472.
52. Brain tissue responses to ischemia / J.M. Lee et al. *J Clin Invest.* 2000. № 106 (6). P. 723-731.
53. Острая церебральная ишемия и воспаление / М. А. Евзельман и др. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2019. № 119 (12-2). С. 73-80.
54. Lambertsen K. L., Finsen B., Clausen B. H. Post-stroke inflammation-target or tool for therapy? *Acta Neuropathol.* 2019. № 137 (5). P. 693-714.
55. Anrather J., Iadecola C. Inflammation and Stroke: An Overview. *Neurotherapeutics.* 2016. № 13 (4). P. 661-670.
56. Супрун Э. В., Беленичев И. Ф., Ищенко А. М. Влияние рецепторного антагониста интерлейкина-1 на свободнорадикальное повреждение в условиях билатеральной окклюзии общих сонных артерий у крыс. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини.* 2011. Т. 6. № 1. С. 236-239.

57. Супрун Э. В. Эффективность цитокиновой церебропротекции при экспериментальном геморрагическом инсульте. *Український вісник психоневрології*. 2010. Т. № 18 (4). С. 34-38.
58. Lambertsen K. L., Biber K., Finsen B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012. № 32 (9). P. 1677-98.
59. Patel R.G. Nasal Anatomy and Function. *Facial Plast Surg*. 2017. № 33 (1). P. 3-8.
60. Nasal function and dysfunction in exercise / A. Walker et al. *J Laryngol Otol*. 2016. № 130 (5). P. 431-434.
61. Морозова С. В., Митюк А. М. Физиологические и клинические аспекты носового дыхания. *Современная педиатрия*. 2013. № 6. С. 19-25.
62. Eifan A. O., Durham S. R. Pathogenesis of rhinitis. *Clin Exp Allergy*. 2016. № 46 (9). P. 1139-1151.
63. Kalogjera L. Rinitis u odraslih [Rhinitis in adults]. *Acta Med Croatica*. 2011. № 65 (2). P. 181-187.
64. Варламов Е. Е. Аллергический ринит: этиология, диагностика, лечение, профилактика. *Практика педиатра*. 2019. № 2. С. 16-21.
65. Bernstein D. I., Schwartz G., Bernstein J. A. Allergic Rhinitis: Mechanisms and Treatment. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2016. № 36 (2). P. 261-278.
66. Lieberman P. L., Smith P. Nonallergic Rhinitis: Treatment. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2016. № 36 (2). P. 305-319.
67. Daramola O. O., Kern R. C. An update regarding the treatment of nonallergic rhinitis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2016. № 24 (1). P. 10-14.
68. Мурзин Р. Острый ринит. Рекомендации оториноларинголога первостольникам. *Новая аптека*. 2018. № 9. С. 80-89.
69. Марушко Ю. В., Московенко О. Д. Комплексні препарати в терапії гострого риніту у дітей. *Современная педиатрия*. 2016. № 2. С. 84-88.

70. Знаменська Т. К., Лошак О. О. Ефективність використання ізотонічного розчину морської солі з пантенолом у комплексній терапії алергічного риніту в дітей. *Неонатологія, хірургія та перинатальна медицина*. 2015. Т. 5. № 2. С. 119-122.

71. Effect of topical corticosteroids on nasal patency after acute positive airway pressure exposure / L. Balsalobre et al. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2021. № 87 (3). P. 326-332.

72. Topical Corticosteroid Pretreatment Mitigates Cellular Damage After Caustic Injury to the Nasal Upper Airway Epithelium / Z. Huang et al. *Am J Rhinol Allergy*. 2019. № 33 (3). P. 277-285.

73. Clinical Question: Nasal saline or intranasal corticosteroids to treat allergic rhinitis in children / S. Madison et al. *J Okla State Med Assoc*. 2016. № 109 (4-5). P. 152-153.

74. Concomitant corticosteroid nasal spray plus antihistamine (oral or local spray) for the symptomatic management of allergic rhinitis / S. Feng et al. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016. № 273 (11). P. 3477-3486.

75. Sastre J., Mosges R. Local and systemic safety of intranasal corticosteroids. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2012. № 22 (1). P. 1-12.

76. Carlton D. A., Beahm D. D., Chiu A. G. Topical antibiotic therapy in chronic rhinosinusitis: an update. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2019. № 9. P. S27– S3.

77. Rudmik L., Soler Z. M. Medical Therapies for Adult Chronic Sinusitis: A Systematic Review. *JAMA*. 2015. № 314 (9). P. 926-39.

78. Комплексный подход в лечении пациентов с хроническим верхнечелюстным синуситом / А. Г. Кобахидзе и др. *Оториноларингология. Восточная Европа*. 2019. Т. 9. № 3. С. 297-310.

79. Кокоркин Д. Н. Диагностика и лечение рецидивирующих и хронических синуситов у детей. *Современная педиатрия*. 2014. № 3. С. 59-64.

80. Гордюк Н. М., Зайцева З. В. Терапия синуситов. *Вісник стоматології*. 2013. № 4. С. 12.

81. Ткаченко В. І., Кривша В. В., Кухарчук Х. М. Лікування бактеріальних синуситів у практиці сімейного лікаря (застосування левофлоксацину у лікуванні бактеріальних синуситів у практиці сімейного лікаря). *Семейная медицина*. 2014. № 6. С. 100-101.
82. Wahid N. W. B., Shermetaro C. Rhinitis Medicamentosa. 2021 In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021.
83. Лекарственно-индуцированный ринит / О. Д. Остроумова и др. *Вестник оториноларингологии*. 2020. № 85 (3). С. 75-82.
84. Медикаментозный ринит / Н. Л. Кунельская и др. *РМЖ*. 2013. Т. 21. № 11. С. 558-559.
85. Носуля Е. В. Медикаментозный ринит. *Вестник оториноларингологии*. 2017. Т. 82. № 3. С. 84-90.
86. Царев С. В. Аллергический ринит: современная оценка медико-социальных аспектов и способов лечения интраназальные кортикостероиды в лечении ринитов. *Медицинский совет*. 2018. № 17. С. 187-192.
87. Xylitol treats nasal mucosa in rhinitis medicamentosa: an experimental rat model study / В. Cam. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2019. № 276 (11). P. 3123-3130.
88. Hypertonic Saline Versus Isotonic Saline Nasal Irrigation: Systematic Review and Meta-analysis / D. Kanjanawaseet et all. *Am J Rhinol Allergy*. № 32 (4). P. 269-279.
89. Saline irrigation for allergic rhinitis / К. Head. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018. № 6 (6). P. CD012597.
90. Эффективность использования назальных ирригаций 0,9% раствора натрия хлорида при лечении аллергических ринитов у детей / Л. С. Овчаренко и др. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2013. № 3. С. 61-63.
91. Topical Nigella Sativa for nasal symptoms in elderly / С. Oysu et al. *Auris Nasus Larynx*. 2014. № 41 (3). P. 269-72.

92. Hoyte F. C. L., Nelson H. S. Recent advances in allergic rhinitis. *F1000Res.* 2018. № 23 (7). F1000 Faculty Rev-1333. Doi : 10.12688/f1000research.15367.1
93. Wheatley L. M., Togias A. Clinical practice. Allergic rhinitis. *N Engl J Med.* 2015. № 372 (5). P. 456-463.
94. Kakli H. A., Riley T. D. Allergic Rhinitis. *Prim Care.* 2016. № 43 (3). P. 465-475.
95. Effects of azelastine nasal spray on nasal and nasopharyngeal microflora / F. Aksoy et al. *J Laryngol Otol.* 2016. № 130 (1). P. 95-99.
96. Effects of topical sprays on allergy-induced nasal obstruction in children / M Yaşar et al. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg.* 2013. № 23 (4). P. 217-24.
97. Intranasal drug administration for procedural sedation in children admitted to pediatric Emergency Room / C. Fantacci et al. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018. № 22 (1). P. 217-222.
98. AlSarheed M. A. Intranasal sedatives in pediatric dentistry. *Saudi Med J.* 2016. № 37 (9). P. 948-56.
99. Intranasal drug delivery: an efficient and non-invasive route for systemic administration: focus on opioids / S. Grassin-Delyle et al. *Pharmacol Ther.* 2012. № 134 (3). P. 366-79.
100. Intranasal delivery of systemic-acting drugs: small-molecules and biomacromolecules / A. Fortuna et al. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014. № 88 (1). P. 8-27.
101. Non-invasive intranasal administration route directly to the brain using dendrimer nanoplatfoms: An opportunity to develop new CNS drugs / S. Mignani et al. *Eur J Med Chem.* 2021. № 209. P. 112905.
102. Обоснование выбора неинъекционного пути введения налоксона / Э. А. Бариев и др. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация.* 2017. № 1. С. 133-137.

103. Применение интраназального нейропротектора Дельталицина при органических заболеваниях нервной системы у детей / О. С. Евтушенко и др. *Міжнародний неврологічний журнал*. 2012. № 5. С. 83-85.
104. Anatomy of the olfactory mucosa / I. Salazar. *Handb Clin Neurol*. 2019. № 164. P. 47-65.
105. Sinusology / R. Jankowski. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2016. 133 (4). № P. 263-268.
106. Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain / T. P. Crowe et al. *Life Sci*. 2018. № 15 (195). P. 44-52.
107. Intranasal Drug Delivery: A Non-Invasive Approach for the Better Delivery of Neurotherapeutics / H. Kumar et al. *Pharm Nanotechnol*. 2017. № 5 (3). P. 203-214.
108. Sobiesk J. L., Munakomi S. Anatomy, Head and Neck, Nasal Cavity. [Updated 2021 Feb 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. Режим доступа : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544232/>
109. Ozsoy Y., Gungor S., Cevher E. Nasal Delivery of High Molecular Weight Drugs. *Molecules*. 2009. № 14. P. 3754-3779.
110. Rohrer J., Lupo N., Bernkop-Schnürch A. Advanced formulations for intranasal delivery of biologics. *Int J Pharm*. 2018. № 553 (1-2). P. 8-20.
111. Singh R. M., Kumar A., Pathak K. Mucoadhesive in situ nasal gelling drug delivery systems for modulated drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013. № 10 (1). P. 115-30.
112. Galgatte U. C., Kumbhar A. B., Chaudhari P. D. Development of in situ gel for nasal delivery: design, optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Drug Deliv*. 2014. № 21 (1). P. 62-73.
113. Филькина О. М. Профилактика ОРВИ препаратом на основе интерферона альфа-2b человеческого рекомбинантного (капли назальные и спрей назальный дозированный). *Вопросы практической педиатрии*. 2015. Т. 10. № 2. С. 84-85.



114. Крамарев С. А, Евтушенко В. В. Опыт применения назальных форм интерферона в лечении и профилактике острых респираторных инфекций. *Актуальная инфектология*. 2019. Т. 7. № 4. С. 217-223.
115. Подходы к разработке препарата низкодозированного налтрексона в форме спрея назального (обзор) / Ю. М. Домнина и др. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021. Т. 10. № 1. С. 37-47.
116. Vernocchi B., Carpentier R., Betbeder D. Nasal nanovaccines. *Int J Pharm*. 2017. № 530 (1-2). P. 128-138.
117. Jabbal-Gill I. Nasal vaccine innovation. *J Drug Target*. 2010. № 18 (10). P. 771-86.
118. Tiboni M., Casettari L., Illum L. Nasal vaccination against SARS-CoV-2: Synergistic or alternative to intramuscular vaccines? *Int J Pharm*. 2021. № 603. P. 120686.
119. Park J. H., Lee H. K. Delivery Routes for COVID-19 Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2021. № 9 (5). P. 524.
120. Chitosan-based Nanoparticles in Mucosal Vaccine Delivery / M. Mehrabi et al. *Arch Razi Inst*. 2018. № 73 (3). P. 165-176.
121. Hickey A. J., Garmise R. J. Dry powder nasal vaccines as an alternative to needle-based delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2009. № 26 (1). P. 1-27.
122. Lobaina Mato Y. Nasal route for vaccine and drug delivery: Features and current opportunities. *Int J Pharm*. 2019. № 15 (572). P. 118813.
123. Characterisation of nasal devices for delivery of insulin to the brain and evaluation in humans using functional magnetic resonance imaging / J. Wingrove et al. *J Control Release*. 2019. № 28 (302). P. 140-147.
124. Hallschmid M. Intranasal Insulin for Alzheimer's Disease. *CNS Drugs*. 2021. № 35 (1). P. 21-37.
125. Hallschmid M. Intranasal insulin. *J Neuroendocrinol*. 2021. № 33 (4). P. e12934.

126. Intranasal administration of insulin to the brain impacts cognitive function and peripheral metabolism / Ott V Benedict et al. *Diabetes Obes Metab.* 2012. № 14 (3). P. 214-21.
127. Bahman F., Greish K., Taurin S. Nanotechnology in Insulin Delivery for Management of Diabetes. *Pharm Nanotechnol.* 2019. № 7 (2). P. 13-128.
128. T1D Exchange Intranasal Glucagon Investigators. Glucagon Nasal Powder: A Promising Alternative to Intramuscular Glucagon in Youth With Type 1 Diabetes / J. L. Sherr et al. *Diabetes Care.* 2016. № 39 (4). P. 555-62.
129. Pontiroli A. E., Ceriani V. Intranasal glucagon for hypoglycaemia in diabetic patients. An old dream is becoming reality? *Diabetes Obes Metab.* 2018. № 20 (8). P. 1812-1816.
130. Kalra S., Dhingra M. Intranasal Glucagon. *J Pak Med Assoc.* 2019. № 69 (8). P. 1219-1221.
131. Lowe R. N., Trujillo J. M. Intranasal Glucagon: A New Way to Treat Hypoglycemic Emergencies. *Ann Pharmacother.* 2020. № 54 (8). P. 780-787.
132. Efficacy and Usability of Intranasal Glucagon for the Management of Hypoglycemia in Patients With Diabetes: A Systematic Review / D. Singh-Franco et al. *Clin Ther.* 2020. № 42 (9). P. e177-e208.
133. Recommendations for the standardisation of oxytocin nasal administration and guidelines for its reporting in human research / A. J. Guastella et al. *Psychoneuroendocrinology.* 2013. № 38 (5). P. 612-25.
134. Guastella A. J., MacLeod C. A critical review of the influence of oxytocin nasal spray on social cognition in humans: evidence and future directions. *Horm Behav.* 2012. № 61 (3). 410-418.
135. A single dose of oxytocin nasal spray improves higher-order social cognition in schizophrenia / A. J. Guastella et al. *Schizophr Res.* 2015. № 168 (3). P. 628-33.
136. Oxytocin plasma concentrations after single intranasal oxytocin administration – a study in healthy men / A. Gossen et al. *Neuropeptides.* 2012. № 46 (5). P. 211-215.

137. Improving the precision of intranasal oxytocin research / A. Winterton et al. *Nat Hum Behav.* 2021. № 5 (1). 9-18.

138. Kendrick K. M., Guastella A. J., Becker B. Overview of Human Oxytocin Research. *Curr Top Behav Neurosci.* 2018. № 35. P. 321-348.

139. Lipid/alginate nanoparticle-loaded in situ gelling system tailored for dexamethasone nasal delivery / B. J. Dukovski et al. *Int J Pharm.* 2017. № 533 (2). P. 480-487.

140. Administration intranasale des médicaments à visée systémique : une nouvelle voie pour les opioïdes [Intranasal delivery of systemic drugs: a new route for opioid drugs] / P. Devillier. *Therapie.* 2010. № 65 (5). P. 475-81.

141. Intranasal Fentanyl for Intervention-Associated Breakthrough Pain After Cardiac Surgery / A. Valtola et al. *Clin Pharmacokinet.* 2021. Doi : 10.1007/s40262-021-01002-4

142. Review of Intranasally Administered Medications for Use in the Emergency Department / A. M. Bailey et al. *J Emerg Med.* 2017. № 53 (1). P. 38-48

143. Corrigan M., Wilson S. S., Hampton J. Safety and efficacy of intranasally administered medications in the emergency department and prehospital settings. *Am J Health Syst Pharm.* 2015. № 72 (18). P. 1544-54.

144. Robinson A., Wermeling D.P. Intranasal naloxone administration for treatment of opioid overdose. *Am J Health Syst Pharm.* 2014. № 71 (24). P. 2129-35.

145. Merchant Y. P., Halli R., Mograwala H. Comparative Evaluation of Intranasal Butorphanol and Oral Diclofenac Sodium for Analgesia After Surgical Removal of Impacted Mandibular Third Molars: Split-Mouth Prospective Controlled Clinical Study. *J Maxillofac Oral Surg.* 2019. № 18 (3). P. 395-399.

146. Preparation and characterization of spray-dried mucoadhesive microspheres of ketorolac for nasal administration / C. D. Nagda et al. *Curr Drug Deliv.* 2012. № 9 (2). P. 205-18.

147. Brain targeted intranasal delivery of tramadol: comparative study of microemulsion and nanoemulsion / J. Lalani. *Pharm Dev Technol.* 2015. № 20 (8). P. 992-1001.

148. Effect of solubility enhancement on nasal absorption of meloxicam / T. Horváth et al. *Eur J Pharm Sci.* 2016. № 95. P. 96-102.
149. Investigation of Absorption Routes of Meloxicam and Its Salt Form from Intranasal Delivery Systems / C. Bartos et al. *Molecules.* 2018. № 23 (4). P. 784.
150. Wang S., Chow M.S., Zuo Z. An approach for rapid development of nasal delivery of analgesics--identification of relevant features, in vitro screening and in vivo verification. *Int J Pharm.* 2011. № 420 (1). P. 43-50.
151. Djupesland P. G., Messina J. C., Mahmoud R. A. Breath powered nasal delivery: a new route to rapid headache relief. *Headache.* 2013. № 2. P. 72-84.
152. Development of nanocrystal formulation of meloxicam with improved dissolution and pharmacokinetic behaviors / M. Ochi et al. *Int J Pharm.* 2014. № 474 (1-2). P. 151-156.
153. Nasal delivery of analgesic ketorolac tromethamine thermo- and ion-sensitive in situ hydrogels / X. Li et al. *Int J Pharm.* 2015. № 489 (1-2). P. 252-60.
154. Hydrogel nanoparticles and nanocomposites for nasal drug/vaccine delivery / S. Salatin. *Arch Pharm Res.* 2016. № 39 (9). P. 1181-92.
155. Pergolizzi J.V., Taylor R., Raffa R.B. Intranasal ketorolac as part of a multimodal approach to postoperative pain. *Pain Pract.* 2015. № 15 (4). P. 378-88.
156. Intranasal ketorolac for acute postoperative pain / N.Singla et al. *Curr Med Res Opin.* 2010. № 26 (8). P. 1915-1923.
157. Comparative pharmacokinetic investigation of ketorolac after intranasal and intramuscular administration in rabbits / O. P. Bezygla et al. *Clinical Pharmacy.* 2013. Vol. 17. № 4. P. 63-66.
158. Черний В. И., Куглер С. Е. Новые возможности послеоперационного обезболивания. *Травма.* 2016. Т. 17. № 2. С. 29-35.
159. Campen C.L.M., Riepma K., Visser F.C. Open Trial of Vitamin B12 Nasal Drops in Adults With Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome: Comparison of Responders and Non-Responders. *Front Pharmacol.* 2019. № 10. P. 1102.

160. Systematic Review and Pragmatic Clinical Approach to Oral and Nasal Vitamin B12 (Cobalamin) Treatment in Patients with Vitamin B12 Deficiency Related to Gastrointestinal Disorders / E. Andrès et al. *J Clin Med*. 2018. № 7 (10). P. 304.

161. Andrès E., Zulfiqar A.A., Vogel T. State of the art review: oral and nasal vitamin B12 therapy in the elderly. *QJM*. 2020. № 113 (1). P. 5-15.

162. Intranasal treatment of vitamin B12 deficiency in children / Estourgie-van Burk GF et al. *Eur J Pediatr*. 2020. № 2. P. 349-352.

163. Лисянская А. П., Гладышев В. В., Бурлака Б. С. Изучение консистентных свойств интраназальной лекарственной формы эналаприла малеата. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2011. Вип. 24. № 2. С. 93-96.

164. Исследование реологических свойств мягкой назальной лекарственной формы дилтиазема / В. В. Гладышев и др. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2013. № 1. С. 69-72.

165. Изучение консистентных свойств интраназальной лекарственной формы амлодипина / Ал Зедан Фади и др. *Запорожский медицинский журнал*. 2012. № 1. С. 55-57.

166. Изучение реологических свойств назальной лекарственной формы каптоприла / Ж. А. Алмохамад и др. *Запорожский медицинский журнал*. 2013. № 6. С. 80-82.

167. Swamy N.G., Abbas Z. Preparation and in vitro characterization of mucoadhesive hydroxypropyl guar microspheres containing amlodipine besylate for nasal administration. *Indian J Pharm Sci*. 2011. № 6. P. 608-14.

168. Abdel Mouez M., Zaki N.M., Mansour S., Geneidi A.S. Bioavailability enhancement of verapamil HCl via intranasal chitosan microspheres. *Eur J Pharm Sci*. 2014. № 51. P. 59-66.

169. Вивчення впливу основ-носіїв на інтенсивність вивільнення вінпоцентину з назальних м'яких лікарських форм / Н. О. Нагорна та ін. *Фармацевтичний журнал*. 2014. № 2. С. 64-68.

170. Біофармацевтичне обґрунтування складу інтраназальної м'якої лікарської форми німодипіну / І. О. Рогачов та ін. *Медична хімія*. 2011. Т. 13. № 1. С. 95-99.

171. Development and optimization of chitosan coated nanoemulgel of telmisartan for intranasal delivery: A comparative study / Ling Yuan Chin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021. № 62. P. 1773-2247.

172. Improved pharmacokinetics of sumatriptan with Breath Powered™ nasal delivery of sumatriptan powder / M. Obaidi. *Headache*. 2013 № 8. P.1323-33.

173. Tepper S. J., Johnstone M. R. Breath-powered sumatriptan dry nasal powder: an intranasal medication delivery system for acute treatment of migraine. *Med Devices (Auckl)*. 2018. № 3 (11). P. 147-156.

174. Silberstein S. D. A review of clinical safety data for sumatriptan nasal powder administered by a breath powered exhalation delivery system in the acute treatment of migraine. *Expert Opin Drug Saf*. 2018. № 17 (1). P. 89-97.

175. Cady R. A novel intranasal breath-powered delivery system for sumatriptan: a review of technology and clinical application of the investigational product AVP-825 in the treatment of migraine. *Expert Opin Drug Deliv*. 2015. № 12 (9). P. 1565-77.

176. Bhattacharyya R., Laha D., Gangopadhyay P.K. Efficacy of zolmitriptan nasal spray in management of acute migraine. *Ann Neurosci*. 2012. № 19 (1). P. 25-26.

177. Anti-depressant effect of curcumin-loaded guanidine-chitosan thermo-sensitive hydrogel by nasal delivery / X. J. Qi et al. *Pharm Dev Technol*. 2020. № 25 (3). P. 316-325.

178. Effect of N-acetyl-L-cysteine on bioavailability and brain distribution of curcumin by nasal delivery / Su WQ et al. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2019. № 44 (13). P. 2841-2848.

179. Development of Nasal Lipid Nanocarriers Containing Curcumin for Brain Targeting / G. R. Vaz et al. *J Alzheimers Dis*. 2017. № 59 (3). P. 961-974.

180. Curcumin's Nanomedicine Formulations for Therapeutic Application in Neurological Diseases / B. Salehi et al. *J Clin Med*. 2020. № 9 (2). P. 430.

181. Optimization of Curcumin Nanocrystals as Promising Strategy for Nose-to-Brain Delivery Application / A. Bonaccorso et al. *Pharmaceutics*. 2020. № 12 (5). P. 476.

182. Smart thermosensitive chitosan hydrogel for nasal delivery of ibuprofen to treat neurological disorders / H . Gholizadeh et al. *Expert Opin Drug Deliv*. 2019. № 16 (4). P. 453-466.

183. Bhattacharya S., Maelicke A., Montag D. Nasal Application of the Galantamine Pro-drug Memogain Slows Down Plaque Deposition and Ameliorates Behavior in 5X Familial Alzheimer's Disease Mice. *J Alzheimers Dis*. 2015. № 46 (1). P. 123-136.

184. Comparative evaluation of fish oil and butter oil in modulating delivery of galantamine hydrobromide to brain via intranasal route: pharmacokinetic and oxidative stress studies / A. Katdare. *Drug Deliv Transl Res*. 2020. № 10 (4). P. 1136-1146.

185. Sunena, Singh S.K., Mishra D.N. Nose to Brain Delivery of Galantamine Loaded Nanoparticles: In-vivo Pharmacodynamic and Biochemical Study in Mice. *Curr Drug Deliv*. 2019. № 16 (1). P. 51-58.

186. Formulation Strategies to Improve Nose-to-Brain Delivery of Donepezil / L.C. Espinoza et al. *Pharmaceutics*. 2019. № 11 (2). P. 64.

187. Nanostructured cubosomes in an in situ nasal gel system: an alternative approach for the controlled delivery of donepezil HCl to brain / R. P. Patil et al. *J Liposome Res*. 2019. № 29 (3). P. 264-273.

188. Preparation, characterization, and in vivo pharmacokinetics of thermosensitive in situ nasal gel of donepezil hydrochloride / F. Gu et al. *Acta Pharm*. 2020. № 3. P. 411-422.

189. Nasal delivery of donepezil HCl-loaded hydrogels for the treatment of Alzheimer's disease / Al Harthi S et al. *Sci Rep*. 2019. № 9 (1). P. 9563.

190. In vitro skin penetration and skin content of progesterone from various topical formulations / A. Heustess et al. *Int J Pharm Compd.* 2014. № 6. P. 512-517.

191. Mucoadhesion of Progesterone-Loaded Drug Delivery Nanofiber Constructs / F. Brako et al. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018. № 10 (16). P. 13381-13389.

192. Intranasal delivery of progesterone after transient ischemic stroke decreases mortality and provides neuroprotection / M. Fréchou et al. *Neuropharmacology.* 2015. № 97. P. 394-403.

193. Trimethyl Chitosan Hydrogel Nanoparticles for Progesterone Delivery in Neurodegenerative Disorders / M. C. Cardia et al. *Pharmaceutics.* 2019. № 11 (12). P. 657.

194. Foreman A., Wormald P. J. Can bottle design prevent bacterial contamination of nasal irrigation devices? *Int Forum Allergy Rhinol.* 2011. № 1 (4). P. 303-307.

195. Активная упаковка для фармацевтической продукции / Degenhard M. та ін. *Фармацевтические технологии и упаковка.* 2014. № 5. С. 56-59.

196. Упаковка для лекарственных препаратов. Требования, конструктивные особенности применительно к GMP. Режим доступа : <http://www.vipsmed.ru/>

197. Considerations for the Development of Nasal Dosage Forms. Sterile Product Development / J. D. Ehrick et al. 2013. 22 (6). P. 99–144.

198. DRUG DEVICES – Intranasal Saline: Can a Spray Per Day Keep the Doctor Away? *DRUG DEVELOPMENT & DELIVERY.* Режим доступа : <https://drug-dev.com/intranasal-saline-can-a-spray-per-day-keep-the-doctor-away/>

199. Лікарські засоби. Пластикові матеріали для первинної упаковки лікарських засобів : Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.16:2014 / О. Нагорна та ін. К., МОЗ України, 2014. 30 с.

200. Шевченко В. О., Ролік С. М., Поветкін С. О. Сучасні аспекти створення рідких лікарських засобів у полімерному пакуванні. *Фармацевтична наука та практика: проблеми, досягнення, перспективи розвитку : матеріали I*



*наук.-практ. інтернет-конф. з міжнар. участю, м. Харків, 24-25 березня 2016 р. Х. : НФаУ, 2016. С. 95-96.*

201. Pharmaceutical Packaging Professionals. Режим доступу: [www.pharmpackpro.com](http://www.pharmpackpro.com)

202. MAD Nasal™ Intranasal Mucosal Atomization Device. Режим доступу : <https://www.teleflex.com/usa/en/product-areas/anesthesia/atomization/mad-nasal-device/>

203. Unidose (UDS) Systems. Режим доступу : <https://www.aptar.com/products/pharmaceutical/uds/>

204. The Unidose® Xtra nasal spray device: designed for simplicity. Режим доступу : <https://bespak.com/products/nasal-spray-device-unidose-xtra/>

205. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Х. : РІРЕГ, 2001. 556 с.

206. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид., 1 допов. Х. : РІРЕГ, 2004. 520 с.

207. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид., 2 допов. Х., 2008. 620 с.

208. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Укр. наук. фармакопейний центр якості лікарських засобів». 1-е вид., 3 допов. Х., 2009. 280 с.

209. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Укр. наук. фармакопейний центр якості лікарських засобів». 1-е вид., 4 допов. Х., 2011. 540 с.

210. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Держ. п-во «Укр. Науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Х. : Держ. п-во «Укр. наук. фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 1. 1126 с.

211. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Держ. п-во «Укр. наук. фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Х. : Держ. п-во «Укр. наук. фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 2. 724 с.

212. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Держ. п-во «Укр. наук. фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Х. : Держ. п-во «Укр. наук. фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 3. 723 с.

213. Antypenko L., Burlaka B., Belenichev I. Noopept: Development and validation of UV-VIS Spectrophotometric method for the quantification of (s)-N-phenylacetyl-1-propylglycine ethyl ester in bulk drugs substance. *Pharmakeftiki*. 2016. № 28 (4):161. P. 161-169.

214. Розробка методики спектрофотометричного визначення рекомбінантного рецепторного антагоніста інтерлейкіну-1 людини в напівфабрикаті-розчині / К. П. Мєведєва та ін. *Фармацевтичний часопис*. 2019. № 4. С.29-36.

215. Стефанов А. В. Доклинические исследования лекарственных средств / А. В. Стефанов. К. : Авиценна, 2002. 568 с.

216. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред Миронова А.Н. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

217. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-6.0: 2014. Лікарські засоби. Доклінічні дослідження безпеки як підгрунтя клінічних випробувань за участь людини та реєстрації лікарських засобів. К. : МОЗ України, 2014 [Електронний ресурс]. Режим доступу : <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-2/st-n-mozu-42-6-0-2014/>

218. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes Text with EEA relevance. Europa.eu. 2010. Режим доступу : <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32010L0063>

219. Наказ Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України № 249 від 01.03.2012 р. «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах». Режим доступу : <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0416-12#Text>

220. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 14.12.2009 р. № 944 «Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів», зареєстрований в Міністерстві юстиції України від 19.01.2010 р. за № 53/17348

221. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними : монографія / Ю. М. Кожем'якін та ін. К. : Інтерсервіс, 2017. 182 с.

222. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін та ін.; Держ. фармакол. центр. К. : Вид. дім «Авіцена», 2002. 155 с.

223. Березовская И. В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения. *Химико-фармацевтический журнал*, 2003. Т. 37. № 3. С.32-34.

224. Цымбалюк В. И., Касяненко Ю. А. Особенности моделирования и течения экспериментального аллергического энцефаломиелимита. *Ukrainian Neurosurgical Journal*. № 1. 2005. С. 45-51.

225. Давыдова Г. С., Марков Д. С. Хронический экспериментальный аллергический энцефаломиелит морских свинок. *Демиелинизирующие заболевания нервной системы в эксперименте и клинике*. Минск : Наука и техника, 1970. С. 193-206.

226. Eksperimentalni alergijski encefalomijelitis kao zivotinjski model multiple skleroze [Experimental allergic encephalomyelitis as an animal model for multiple sclerosis] / Lukinović-Skudar V. et al. *Lijec Vjesn*. 2001. № 123 (3-4). P. 81-88.

227. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. Р.У.Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М. : ОАО «Изд-во «Медицина», 2005. 832 с.

228. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М. : Высш. шк., 1991. 399 с.

229. Лебедев И. В., Плескачева М. Г., Анохин К. В. Анализ поведения мышей линии C57BL/6 8. в аренах открытого поля разных размеров. *Журнал высшей нервной деятельности*. 2012. № 62 (4). С. 485-496.

230. Плескачева М. Г., Лучкина О. С., Купцов П. А. Методы оценки начальной ориентации и поведения на старте у мелких млекопитающих при ближнем хоминге. *Труды Звенигородской биологической станции*. М : Изд. Московского университета. 2011. № 5. С. 232-238.

231. Gould T. D. Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice, 10. *Neuromethods*. Humana Press, 2009. 237 p.

232. Crusio W. E., Schwegler H. Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice. *Behav Brain Funct*. 2005. 1 (3). Режим доступа : <https://doi.org/10.1186/1744-9081-1-3>

233. Nadel L., Hardt O. Update on memory systems and processes. *Neuropsychopharmacology*. 2011. № 36 (1). P. 251-73.

234. Porsolt R. D., LePinchon M., Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977. № 266. P.730-732.

235. Дьюсбери Р. Изучение поведения животных. М.: Наука, 1980. 376 с.

236. McGrow C. P. Experimental Cerebral Infarction Effects of Pentobarbitalin Mongolian Gerbils. *Arch. Neurol*. 1977. № 34 (6). P. 334-336.

237. Доклінічне вивчення специфічної активності потенційних лікарських засобів первинної та вторинної нейропротекції : *методичні рекомендації* / упоряд. : І. С. Чекман та ін. К., 2016. 93 с.

238. Прохорова М. А. Современные методы в биохимии / М. А. Прохорова. Л. : Изд-во ЛГУ, 1986. 368 с.

239. Беленічев І. Ф., Губський Ю. І., Дунаєв В. В. Методи оцінки антиоксидантної активності речовин при ініціюванні вільно-радикальних процесів у дослідах in vitro. *Метод. рекомен.* К. : ДФЦ МОЗ України, 2002. 26 с.

240. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Edition / Roger L. Lundblad, Fiona Mac-donald. CRC Press, 2010. 1098 p.

241. Доклиническое изучение специфической активности эндотелиопротективных препаратов : *метод. рекомендации* / И. С. Чекман и др. К., 2014. 60 с.

242. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / под ред. М. И. Прохоровой. Л. : Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. 272 с.

243. Воробьев П. А., Безмельницына Л. Ю., Краснова Л. С.. Оценка медицинской технологии применения лекарственных препаратов с ноотропным и психостимулирующим действием: кортексин, пирацетам, цитиколин, церебролизин. *Клинич. геронтология*. 2013. Т. 19. № 11/12. С. 14-25.

244. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М. : ОАО «Издательство «Медицина», 2005. 832 с.

245. Зайцев В. М., Лифляндский В. Г., Маринкин В. И. Прикладная медицинская статистика : учеб. пособие. 2-е изд. СПб. : ФОЛИАНТ, 2006. 432 с.

246. Бурлака Б. С. Використання сучасного програмного забезпечення в систематизації літературних даних за інтраназальними лікарськими засобами. *Фармацевтичний часопис*. 2015. № 1. С. 51-54.

247. Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects / H. R. Costantino et al. *Int J Pharm*. 2007. 337 (1-2). P. 1-24.

248. Kashyap K., Shukla R. Drug Delivery and Targeting to the Brain Through Nasal Route: Mechanisms, Applications and Challenges. *Curr Drug Deliv*. 2019. № 16 (10). P. 887-901.

249. Чикина С. Ю., Белевский А. С. Мукоцилиарный клиренс в норме и при патологии. *Атмосфера. Пульмонология и аллергология*. 2012. № 1. С. 2-5.

250. Шилкина И. В. Ермаков И. Ю., Мареев Г. О. Исследование мукоцилиарного клиренса. *Бюллетень медицинских интернет-конференций*. 2019. Т. 9. № 1. С. 11-12.

251. Ходзицкая В. К. Нарушение и коррекция мукоцилиарного клиренса при заболеваниях дыхательных путей и лор-органов. *Болезни и антибиотики*. 2010. № 1 (03) Режим доступа : <http://www.mif-ua.com/archive/article/14576>
252. Patel M. M., Patel B. M. Crossing the Blood-Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain. *CNS Drugs*. 2017. № 31 (2). P. 109-133.
253. Guo L., Ren J., Jiang X. Perspectives on brain-targeting drug delivery systems. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012. № 13 (12). P. 2310-2318.
254. Dehydration affects drug transport over nasal mucosa / Ali A. et al. *Drug Deliv*. 2019. № 26 (1). P. 831-840.
255. Burckhardt G. Drug transport by Organic Anion Transporters (OATs). *Pharmacol Ther*. 2012. № 136 (1). P. 106-30.
256. Dhamankar V., Donovan M. D. Modulating nasal mucosal permeation using metabolic saturation and enzyme inhibition techniques. *J Pharm Pharmacol*. 2017. № 69 (9). P. 1075-1083.
257. Dahl A. R., Hadley W. M. Nasal cavity enzymes involved in xenobiotic metabolism: effects on the toxicity of inhalants. *Crit Rev Toxicol*. 1991. № 21 (5). P. 345-72.
258. Drug-metabolizing Enzymes and Efflux Transporters in Nasal Epithelium: Influence on the Bioavailability of Intranasally Administered Drugs / Liveira P. et al. *Curr Drug Metab*. 2016. № 17 (7). P. 628-47.
259. Singh M., Singh S. P., Rachana R.. Development, characterization and cytotoxicity evaluation of Gingko biloba extract (EGB761) microemulsion for intranasal application. *J App Pharm Sci*. 2017. № 7 (01). P. 024-034.
260. Patel R. J., Parikh R. H. Intranasal delivery of topiramate nanoemulsion: Pharmacodynamic, pharmacokinetic and brain uptake studies. *Int J Pharm*. 2020. № 30. P. 585:119486.
261. Lochhead J. J., Thorne R. G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012. № 64 (7). P. 614-28.
262. Keck T., Lindemann J. Numerical simulation and nasal air-conditioning. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2010. № 9. P. Doc08.

263. Nasal mucosal temperature after exposure to cold, dry air and hot, humid air / K. Liener et al. *Acta Otolaryngol.* 2003. № 123 (7). P. 851-856.

264. Sozansky J., Houser S. M. The physiological mechanism for sensing nasal airflow: a literature review. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2014. № 4 (10). P. 834-838.

265. Cannabinoid Delivery Systems for Pain and Inflammation Treatment / N. Bruni et al. *Molecules.* 2018. № 23 (10). P. 2478.

266. Recent advancements in liposomes targeting strategies to cross blood-brain barrier (BBB) for the treatment of Alzheimer's disease / M. Agrawal et al. *J Control Release.* 2017. № 260. P. 61-77.

267. Rukmangathen R., Yallamalli I. M., Yalavarthi P. R. Formulation and biopharmaceutical evaluation of risperidone-loaded chitosan nanoparticles for intranasal delivery. *Drug Dev Ind Pharm.* 2019. № 45 (8). P. 1342-1350.

268. Bahadur S., Pathak K. Physicochemical and physiological considerations for efficient nose-to-brain targeting. *Expert Opin Drug Deliv.* 2012. № 9 (1). P. 19-31.

269. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles / Y. Zhou et al. *J Control Release.* 2018. № 28 (270). P. 290-303.

270. Enhancement of the intranasal delivery of insulin via a novel mucoadhesive Carbopol gel / Walaa Ahmed El-Dakroui et al. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2010. № 62 (7). P. 866–872.

271. Fabrication of Mucoadhesive-Dendrimers as Solid Dosage Forms / N. Raval et al. *Methods Mol Biol.* 2019. № 2000. P. 93-109.

272. Shim S., Yoo H. S. The Application of Mucoadhesive Chitosan Nanoparticles in Nasal Drug Delivery. *Mar Drugs.* 2020. № 18 (12). P. 605.

273. Agarwal S., Aggarwal S.. Mucoadhesive polymeric platform for drug delivery; a comprehensive review. *Curr Drug Deliv.* 2015. № 12 (2). P. 139-56.

274. Use of intranasal submucosal fillers as a transient implant to alter upper airway aerodynamics: implications for the assessment of empty nose syndrome / N. A. Borchard et al. *Int Forum Allergy Rhinol.* 2019. № 9. P. 681-687.

275. Enhanced intranasal insulin delivery by formulations and tumor protein-derived protein transduction domain as an absorption enhancer / Nam Ah Kim et al. *Journal of Controlled Release*, 2019. № 294. P. 226-236.

276. Screen absorption enhancer for intranasal administration preparations of paeoniflorin based on nasal perfusion method in rats / Zhu Z.T. et al. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2017. № 42 (3). P. 493-497.

277. Delivery of acetaminophen to the central nervous system and the pharmacological effect after intranasal administration with a mucoadhesive agent and absorption enhancer / K. Ogawa et al. *Int J Pharm*. 2021. № 594. P. 120046.

278. Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route / A. R. Khan et al. *J Control Release*. 2017. № 268. P. 364-389.

279. Dhamankar V., Donovan M. D. Modulating nasal mucosal permeation using metabolic saturation and enzyme inhibition techniques. *J Pharm Pharmacol*. 2017. № 69. P. 1075-1083.

280. The use of alpha-aminoboronic acid derivatives to stabilize peptide drugs during their intranasal absorption / M. A. Hussain et al. *Pharm Res*. 1989. № 2. P. 186-189.

281. Nasal absorption enhancement strategies for therapeutic peptides: an in vitro study using cultured human nasal epithelium / R. U. Agu et al. *Int J Pharm*. 2002. № 237 (1-2). P. 179-191.

282. Inhaled gold nanoparticles cause cerebral edema and upregulate endothelial aquaporin 1 expression, involving caveolin 1 dependent repression of extracellular regulated protein kinase activity / C. Y. Chen et al. *Part Fibre Toxicol*. 2019. № 16 (1). P. 37.

283. Schlachet I., Sosnik A. Mixed Mucoadhesive Amphiphilic Polymeric Nanoparticles Cross a Model of Nasal Septum Epithelium in Vitro. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019. № 11 (24). P. 21360-21371.

284. Lipid Nanoparticles for Nasal/Intranasal Drug Delivery / S. Cunha et al. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2017. № 34 (3). P. 257-282.



285. Intranasal lipid nanoparticles for the treatment of neurodegenerative diseases /S. Cunha et al. *Curr Pharm Des.* 2017. № 27. Doi : 10.2174/1381612824666171128105305

286. Fatouh A. M., Elshafeey A. H., Abdelbary A. Intranasal agomelatine solid lipid nanoparticles to enhance brain delivery: formulation, optimization and in vivo pharmacokinetics. *Drug Des Devel Ther.* 2017. № 11. P. 1815-1825.

287. A Novel Delivery System of Cyclovirobuxine D for Brain Targeting: Angiopep-Conjugated Polysorbate 80-Coated Liposomes via Intranasal Administration / H. Wei et al. *J Biomed Nanotechnol.* 2018. № 14 (7). P. 1252-1262.

288. Development of risperidone liposomes for brain targeting through intranasal route / R. Narayan et al. *Life Sci.* 2016. № 163. P. 38-45.

289. Попыхова Э. Б. Липосомы - применение в научных исследованиях и в медицине. *Евразийское Научное Объединение.* 2019. № 11-3 (57). С. 191-194.

290. Шульга С. М. Липосоми і наносоми: структура, властивості, виробництво. *Biotechnologia Acta.* 2013. Vol. 6. № 5. С. 19-40.

291. Коваленко В. М. Терапевтичний потенціал та механізми дії фосфоліпідних ліпосом. *Фармакологія та лікарська токсикологія.* 2016. № 3. С. 91-98.

292. Patel R. J., Parikh R. H. Intranasal delivery of topiramate nanoemulsion: Pharmacodynamic, pharmacokinetic and brain uptake studies. *Int J Pharm.* 2020. № 585. P. 119486.

293. Recent expansions of novel strategies towards the drug targeting into the brain / A. Alexander et al. *Int J Nanomedicine.* 2019. № 14. P. 5895-5909.

294. Patel M.M., Patel B.M. Crossing the Blood-Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain. *CNS Drugs.* 2017. № 31 (2). P. 109-133

295. Intranasal delivery system of bacterial antigen using thermosensitive hydrogels based on a Pluronic-Gantrez conjugate / Y. Pastor et al. *Int J Pharm.* 2020. № 579. P. 119154.

296. Nanoemulsions and thermosensitive nanoemulgels of phenytoin and fosphenytoin for intranasal administration: Formulation development and in vitro characterization / P. C. Pires et al. *Eur J Pharm Sci.* 2020. № 141. P. 105099.

297. Brain targeted delivery of mucoadhesive thermosensitive nasal gel of selegiline hydrochloride for treatment of Parkinson's disease / V. Sridhar et al. *J Drug Target.* 2018. № 26 (2). P. 150-161.

298. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8) : Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.0:2011. К., 2011. 33 с.

299. Лікарські засоби. Належна лабораторна практика: СТ-Н МОЗУ 42-6.0:2008 : Настанова МОЗ України. К., 2009. 27 с.

300. Nahavandi S. An expert system for selecting wart treatment method / F. Khozeimeh et all. *Comput Biol Med.* 2017. № 81. P. 167-175.

301. Mutawa A. M., Alzuwawi M. A. Multilayered rule-based expert system for diagnosing uveitis. *Artif Intell Med.* 2019. № 99. P. 101691.

302. SeDeM Expert System, an Innovative Tool for Developing Directly Compressible Tablets: A Review / I. Singh et al. *Curr Drug Res Rev.* 2021. № 13 (1). P. 16-24.

303. Manufacturing processes in the textile industry. Expert Systems for fabrics production / J. Bullon et al. *ADCAIJ: Advances in Distributed Computing and Artificial Intelligence Journal.* 2017. № 6 (1). P. 41-50.

304. Розробка комплексної методики оцінки та прогнозування обстановки в інтелектуальних системах підтримки прийняття рішень / О. Одарущенко та інші. *Збірник наукових праць ЛОГОΣ.* 2021. Режим доступу : <https://doi.org/10.36074/logos-28.05.2021.v1.64>

305. A Forex trading expert system based on a new approach to the rule-base evidential reasoning / L. Dymova et al. *Expert Systems with Applications.* 2016. № 51. P. 1-13.

306. Chen Y., Liu L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012. № 64 (7). P. 640-65.

307. Radchenko E. V., Dyabina A. S., Palyulin V. A. Towards Deep Neural Network Models for the Prediction of the Blood-Brain Barrier Permeability for Diverse Organic Compounds. *Molecules*. 2020. № 25 (24). P. 5901.

308. Aderibigbe B. A., Naki T. Design and Efficacy of Nanogels Formulations for Intranasal Administration. *Molecules*. 2018. № 23 (6). P. 1241.

309. Insights into direct nose to brain delivery: current status and future perspective / D. Mittal et. al. *Drug Deliv*. 2014. № 21 (2). P.75-86.

310. Нейропротекция и нейропластичность / И. Ф. Беленичев и др. К. : Логос, 2015. 510 с.

311. Blood-brain barrier transport studies, aggregation, and molecular dynamics simulation of multiwalled carbon nanotube functionalized with fluorescein isothiocyanate / S. Shityakov et al. *Int J Nanomedicine*. 2015. № 10. P. 1703-13.

312. Shityakov S., Forster C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. *Adv Appl Bioinform Chem*. 2014. № 7. P. 23-36.

313. Abrantes C. G., Duarte D. Reis C. P. An Overview of Pharmaceutical Excipients: Safe or Not Safe? *J Pharm Sci*. 2016. № 105 (7). P. 2019-2026.

314. Excipient Stability in Oral Solid Dosage Forms: A Review / M. A. Darji et al. *AAPS PharmSciTech*. № 19 (1). P. 12-26.

315. Narang A. S., Desai D., Badawy S. Impact of excipient interactions on solid dosage form stability. *Pharm Res*, 2012. № 29 (10). P. 2660-2683.

316. Bharate S., Bharate S., Bajaj A. Interactions and Incompatibilities of Pharmaceutical Excipients with Active Pharmaceutical Ingredients: A Comprehensive Review. *Journal of Excipients and Food Chemicals*. 2010. № 1. P. 3-26.

317. Дериватографічне вивчення мазі з піроктон оламіном для терапії та профілактики себорейного дерматиту / В. А. Солодовник та ін. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2020. Т. 13. № 2 (33). С. 249-253.

318. Мазі ХІ. Дослідження звільнення лікарських речовин з мазей з врахуванням їх розчинності та дисперсності / І. М. Перцев та ін. *Фармац. журн.* 1977. № 3. С. 72–75.

319. Изучение влияния основ-носителей на интенсивность высвобождения каптоприла из назальных мягких лекарственных форм / В. В. Гладышев и др. *Кубанский научный медицинский вестник.* 2013. № 5 (140). С. 69-73.

320. Шматенко В. В. Обоснование состава основы с целью создания мягкого лекарственного средства для лечения раневого процесса. *Вестник фармации.* 2014. № 2 (78). С. 20-24.

321. ДСТУ ГОСТ 2.001:2006 Єдина система конструкторської документації. Загальні положення (ГОСТ 2.001-93, ІДТ).

322. ГОСТ 2.002-72 ЕСКД. Требования к моделям, макетам и темплетам, применяемым при проектировании.

323. ДСТУ ГОСТ 2.052:2006 Єдина система конструкторської документації. Електронна модель виробу. Загальні положення (ГОСТ 2.052-2006, ІДТ).

324. ДСТУ ГОСТ 2.053:2006 Єдина система конструкторської документації. Електронна структура виробу. Загальні положення (ГОСТ 2.053-2006, ІДТ).

325. ГОСТ 2.109-73 ЕСКД. Основные требования к чертежам.

326. Бурлака Б. С. Використання сучасного програмного забезпечення в систематизації літературних даних по інтраназальним лікарським засобам. *Фармацевтичний часопис.* 2015. № 1. С. 29-31.

327. Бурлака Б. Опрацювання фармацевтичних факторів до створення алгоритмічного підходу в методології розробки назальних форм системної дії. *XXIV Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених the 24th international medical congress of students and young scientists* : матеріали конгресу 12-14 квіт. Т., 2021. С. 189.

328. Бурлака Б. С., Беленічев І. Ф. Розробка моделей машинного навчання для *in silico* прогнозу проникності сполук через гематоенцефалічний бар'єр. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. № 2 (16). С. 92-98.
329. Intranasal Delivery of Nanoformulations: A Potential Way of Treatment for Neurological Disorders / S. U. Islam et al. *Molecules*. 2020. № 25 (8). P. 1929.
330. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting / F. Erdő et al. *Brain Res Bull*. 2018. № 143. P. 155-170.
331. Intranasal Delivery: Effects on the Neuroimmune Axes and Treatment of Neuroinflammation / E. M. Rhea et al. *Pharmaceutics*. 2020. № 12 (11). P. 1120.
332. Сравнение фармакологических эффектов гептапептида селанка при внутрибрюшинном и интраназальном введении мышам BALB/C и C57BL/6 / Е. В. Васильева и др. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2016. Т. 79. № 9. С. 3-11.
333. Державний реєстр лікарських засобів станом на 01.01.2016 р. [Електронний ресурс]. Режим доступу : [www.drlz.kiev.ua](http://www.drlz.kiev.ua)
334. Компендіум – лікарські препарати. Режим доступу : <https://compendium.com.ua/uk/>
335. Зарічна Т. П. Маркетингові дослідження національного ринку протитуберкульозних лікарських засобів. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л. Шутика*. 2015. Вип. 24 (2). С. 454-461.
336. Немченко А. С., Косяченко К. Л., Немченко О. А. Ціноутворення на лікарські засоби : монографія. 2-ге вид., доп. та перероб. Х. : Апостроф, 2012. 304 с.
337. Немченко А. С., Балинська М. В. Маркетингові дослідження ринку лікарських засобів для комплексного лікування гострих кишкових інфекцій вірусної етіології у дітей. *Соціальна фармація в охороні здоров'я*. 2017. Т. 3, № 2. С. 70-79.
338. Вивчення цінової кон'юнктури вітчизняного ринку антиагрегантів / Є. А. Редькіна та ін. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2017. № 2 (24). С. 207-213.

339. Бурлака Б. С., Червоненко Н. М., Беленічев І. Ф. Маркетингові дослідження вітчизняного ринку інтраназальних лікарських засобів. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2016. № 3. С. 87-90.

340. Бурлака Б. С. Перспективи створення нового інтраназального лікарського засобу на основі природної сировини для комплексної терапії алергічних ринітів. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2015. № 1. С. 35-37.

341. Аналіз вітчизняного фармацевтичного ринку психостимулюючих та ноотропних засобів групи N06BX / Б. С. Бурлака та ін. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2020. № 3. С. 68-74.

342. Цінові характеристики вітчизняного фармацевтичного ринку лікарських засобів групи N06BX / Б. С. Бурлака та ін. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2020. № 4. С. 66-73.

343. Nose to brain drug delivery – A promising strategy for active components from herbal medicine for treating cerebral ischemia reperfusion / Y. Long et al. *Pharmacol Res*. 2020. № 159. P. 104795.

344. Nanoemulsions for «Nose-to-Brain» Drug Delivery / M.C. Bonferoni et al. *Pharmaceutics*. 2019. № 11 (2). P. 84.

345. Биофармацевтические аспекты дизайна интраназальных лекарственных форм / Н. Б. Демина и др. *Фармация*. 2019. № 68 (3). С. 12-17.

346. Нейропротективные эффекты ноотропного дипептида ГВС-111 при кислородно-глюкозной депривации, глутаматной токсичности и оксидативном стрессе in vitro / Н. А. Андреева и др. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2000. Т. 130. № 10. С. 418-421.

347. Оригинальный ноотропный и нейропротективный препарат ноопепт / Р. У. Островская и др. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2002. Т. 65. № 5. С. 66-72.

348. Островская Р. У., Гудашева Т. А. Дипептидный препарат ноопепт: дизайн, фармакологические свойства и механизм действия. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2021. Т. 84. № 2. С. 41-52.

349. Davis S. S., Illum L. Absorption Enhancers for Nasal Drug Delivery. *Clin Pharmacokinet.* 2003. № 42. P. 1107-1128.

350. Ghadiri M., Young P. M., Traini D. Strategies to Enhance Drug Absorption via Nasal and Pulmonary Routes. *Pharmaceutics.* 2019. № 11. P. 113.

351. Non-ionic surfactants as novel intranasal absorption enhancers: in vitro and in vivo characterization / Ying Li et al. *Drug Delivery.* 2016. № 23:7. P. 2272-2279.

352. Sharma S., Kulkarni J., Pawar A. P. Permeation enhancers in the transmucosal delivery of macromolecules. *Pharmazie.* 2006. № 61. P. 495-504.

353. Thorat S. Formulation and Product Development of Nasal Spray: An Overview. *Sch. J. App. Med. Sci.* 2016. Vol. 4 (8D). P. 2976-2985.

354. Rowe R. C., Sheskey P. J., Quinn M. E. Handbook of Pharmaceutical Excipients: 8th edition. Pharmaceutical Press, 2017. 1216 p.

355. Wesolowski M., Rojek B. Thermogravimetric detection of incompatibilities between atenolol and excipients using multivariate techniques. *J Therm Anal Calorim.* 2013. № 113. P. 169–177.

356. Drug-Excipient Compatibility Studies in Formulation Development: Current Trends and Techniques / Dave Vivek S. et al. *American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Formulation Design and Development (FDD).* 2015. P. 9-15.

357. Мельникова Н. В., Гладышев В. В., Бурлака Б. С. Термогравиметрические исследования вагинальных суппозиторий с эфирным маслом чабреца. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики.* 2015. № 1. С. 44-47.

358. Бурлака Б. С., Беленічев І. Ф., Гладышев В. В. Вивчення впливу допоміжних речовин на вивільнення ноопепту з назальної лікарської форми. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики.* 2019. Т. 12. № 3 (31). С. 304–308.

359. Бурлака Б. С., Беленічев І. Ф., Гладішев В. В. Термогравіметричні дослідження інтраназальної форми ноопепту. *Фармацевтичний журнал*. 2019. Т. 74. № 6. С. 54-61.

360. Бурлака Б. С., Беленічев І. Ф., Гладішев В. В. Дослідження впливу поверхнево-активних речовин на вивільнення ноопепту з назальної лікарської форми. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2020. Т. 13. № 1 (32). С. 105-108.

361. Бурлака Б. С. Перспективи розробки інтраназальних лікарських форм нейропротективної дії. *Сучасні аспекти медицини і фармації - 2014 : зб. тез всеукр.-наук.-практ. конференц. молодих вчених та студ. з міжнар. участю 15-16 травня : тези доповідей*. 2014. С. 164.

362. Бурлака Б. С., Беленічев І. Ф., Гладішев В. В. Створення інтраназального лікарського засобу церебропротективної дії з похідним гліцину. *V національний з'їзд фармакологів України : тези доп. (18-20 жовтня 2017 р., м. Запоріжжя) / Всеукр. громад. орг. "Асоц. фармакологів України", ДУ "Ин-т фармакології та токсикології НАМН України", Запоріз. держ. мед. ун-т, ДП "Держ. експертний центр МОЗ України"*. Запоріжжя : Фарма Старт, 2017. С. 12.

363. Antypenko L. M., Burlaka B. S., Belenichev I. F. Noopept: development and validation of uv-spectrophotometric determination. *Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів: матеріали I Міжнар. наук.-практ. конф., 30-31 берез. X. : НфаУ, 2017. Т. 2. С. 6.*

364. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke / C. Yang et al. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2019. № 316 (2). P. C135-C153.

365. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke / S. E. Khoshnam et al. *Neurol Sci*. 2017. № 38 (7). P. 1167-1186.

366. Цитокінова терапія в комплексному лікуванні цереброваскулярних захворювань: стан, перспективи досліджень / Е. В. Супрун та ін. *Раціональна фармакотерапія*. 2017. № 1 (42). С. 19-30.



367. Супрун Э. В. Громов Л. А., Беленичев И. Ф. Коррекция антагонистом рецепторов интерлейкина-1 неврологических и когнитивных нарушений при экспериментальном ишемическом инсульте. *Український вісник психоневрології*. 2010. Т. 18, вип. 2. С. 39-43.

368. Мітопротективний ефект рецепторного антагоніста інтерлейкіну-1 при експериментальному церебральному інсульті / Е. В. Супрун та ін. *Патологія*. 2012. № 3. С. 71-75.

369. Супрун Е. В., Беленічев І. Ф., Супрун О. С. Вплив рецепторного антагоніста інтерлейкіну-1 на показники тіол-дисульфідної системи й енергетичного метаболізму в клітинах головного мозку щурів в умовах моделювання цукрового діабету та церебральної ішемії. *Одеський медичний журнал*. 2014. № 2. С. 21-27.

370. Симбирцев А. С. Интерлейкин-1: от эксперимента в клинику. *Медицинская иммунология*. 2001. Т. 3. № 3. С. 431-438.

371. Wu H., Hu K., Jiang X. From nose to brain: understanding transport capacity and transport rate of drugs. *Expert Opin Drug Deliv*. 2008. № 5 (10). P. 1159-68.

372. Nose-to-Brain Delivery / Z. Wang et al. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019. № 370 (3). P. 593-601.

373. Martins P. P., Smyth H. D. C., Cui Z. Strategies to facilitate or block nose-to-brain drug delivery. *Int J Pharm*. 2019. № 30;570. P. 118635.

374. Беленичев И. Ф., Ковальчук Д. А., Бурлака Б. С. Нейропротективные эффекты интраназальной формы антагониста il-1b. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації (до 50-річчя заснування ЗДМУ), 18-25 квітня : тези доповідей*. м. Запоріжжя, 2018. С. 5.

375. Обґрунтування вибору допоміжних речовин для створення інтраназального гелю рецепторного антагоніста інтерлейкіна-1β (IL-1ra) / Б. С. Бурлака та ін. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2020. Т. 13. № 2 (33). С. 254-259.

376. Бурлака Б. С. Оптимізація складу назального лікарського засобу з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$ . *Фармацевтичний журнал*. 2021. № 1. С. 43-49.

377. Бурлака Б. С. Термогравіметричні дослідження назального засобу з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$  (IL-1ra). *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2021. № 1. С. 56-63.

378. Дослідження впливу полісорбату-80 на біофармацевтичні та реологічні властивості назальної лікарської форми з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$  (IL-1Ra) / Б. С Бурлака та ін. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. № 1 (15). С. 49-54.

379. Burlaka B. S., Belenichev I. F. A study on acute toxicity, local irritative effect of and allergic response to a novel intranasal medication containing the interleukin- 1 $\beta$  receptor antagonist (il-1ra). *Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine (scientific Journal)*. 2020. Vol. 4 (1). P. 20-23.

380. Burlaka B. S., Bielenichev I. F., A study on toxicity, local irritative effect of and allergic response to a novel intranasal medication containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester. *Запорожский медицинский журнал*. 2021. № 1. С. 126-131.

381. Multiple sclerosis - etiology and diagnostic potential / J. Kamińska et al. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2017. № 71 (0). P. 551-563.

382. Multiple sclerosis / A. J. Thompson et al. *Lancet*. 2018. № 391(10130). P. 1622-1636.

383. Нефьодов О. О. Вплив засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу на орієнтовно-дослідницьку активність щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом у тесті «відкрите поле». *Одеський медичний журнал*. 2015. № 5. С. 14-19.

384. Гусев Е. И., Завалишин И. А., Бойко А. Н. Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. М. : Миклош, 2004. 540 с.

385. Strober L. B., Arnett P. A. Depression in multiple sclerosis: The utility of common self-report instruments and development of a disease-specific measure. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2015. № 37 (7). P. 722-32.

386. Fujimori H. J. *Psychopharmacologia*. № 7. Цит. по Биоскрининг : лекарственные средства / под ред. А. В. Стефанова. К. : Авиценна, 1998. 16 с.

387. Макаренко А. Н., Савосько С. И. Влияние тиопентала натрия на состояние энергетического обмена в головном мозге. *Вісник проблем біології і медицини*. 2016. Вип. 2 (1). С. 56-69.

388. Neuroprotective properties of n-phenylacetyl-l-prolylglycine ethyl ester nasal gel in an experimental model of multiple sclerosis equivalent / B. S. Burlaka et al. *Медичні перспективи*. 2020. № 4. С. 31-38.

389. Нефедов А. А. Моделирование экспериментального аллергического энцефаломиелимита как наиболее адекватной модели рассеянного склероза. *Инновации в фармакологии: от теории к практике* : материалы Всерос. конф. с междунар. участием, посвященной 90-летию со дня рождения акад. АМН СССР Артура Викторовича Вальдмана, 27-28 окт. СанктПетербург, 2014. С. 129.

390. Алифирова В. М. Анализ факторов риска развития рассеянного склероза в Томской области. *Неврол. журнал*. 2012. Т. 17. № 3 С. 20-22.

391. Когнитивные нарушения при рассеянном склерозе / Р. Ц. Бембеева и др. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2006. Т. 106. № 12. С. 11-19.

392. Morpho-functional parameters of neurons in the sensorimotor cortex and neuroapoptosis under conditions of an induced experimental allergic encephalomyelitis in rats and a course of intranasal gel administration containing n-phenylacetyl-l-prolylglycine (Noopept) / B. S. Burlaka et al. *Journal of Education, Health and Sport*. 2021. Vol. 11 (1). P. 191-201.

393. Kim J. Y., Yenari M. A. Heat Shock Proteins and the Stress Response. *Primer on Cerebrovascular Diseases (Second Edition)*. 2017. 968 p.

394. The concentration of hsp70 in the cytosol and mitochondria of the brain in animals with experimental autoimmune encephalo-myelitis and after the time course of intranasally administered n-phenylacetyl-l-prolylglycine ethyl ester (noopept) / B. Burlaka et al. *Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine (scientific Journal)*. 2020. Vol. 4 (2). P. 34-38.

395. Redox signaling mediated by thioredoxin and glutathione systems in the central nervous system / X. Ren et al. *Antioxid. Redox Signal.* 2017. Vol. 27. P. 989 – 1010.

396. Беленічев І. Ф., Алієва О. Г. Нові мішені фармакологічної корекції когнітивних розладів за умов пренатальної дії гіпоксії. *Фармакологія та лікарська токсикологія.* 2019. Т. 13. № 4. С. 235-248.

397. Післяопераційна когнітивна дисфункція у жінок середнього віку: інцидентність та методи профілактики / І. І. Лісний та ін. *Клиническая онкология.* 2013. № 2. С. 79-82.

398. Anesthetics and postoperative cognitive dysfunction: a pathological mechanism mimicking Alzheimer's disease / V. Fodale et al. *Anesthesia.* 2010. Vol. 65 (4). P. 388-395.

399. Усенко Л. В., Полинчук И. С. Когнитивные нарушения после общей анестезии при экстракардиальных вмешательствах и эффект раннего введения Тиоцетама в послеоперационном периоде. *Международ. неврол. журн.* 2011. № 6 (44). С. 132-136.

400. Warner D. S., Sheng H. Anesthetic Neuroprotection? It's Complicated. *Anesthesiology.* 2017. № 126 (4). P. 579-581.

401. Zwerus R., Absalom A. Update on anesthetic neuroprotection. *Current Opinion in Anaesthesiology.* 2015. Vol. 28 (4). P. 424-430.

402. Островская Р. У. Эволюция проблемы нейропротекции. *Эксперим. и клинич. фармакология.* 2003. Т. 66. № 2. С. 32-37.

403. Востриков В. В. Место пирарцетама в современной практической медицине. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* 2017. № 15 (1). С. 14-25.

404. 15-летний опыт применения Цереброкурина в комплексной терапии у детей с органическими заболеваниями нервной системы / О. С. Евтушенко и др. *Міжнародний неврологічний журнал.* 2014. № 3. С. 13-19.

405. Management of amnestic and behavioral disorders after ketamine anesthesia / I. Belenichev et al. *Georgian medical news*. 2019. № 10 (294). P. 141-145.
406. Corriger A., Pickering G. Ketamine and depression: a narrative review. *Drug Des Devel Ther*. 2019. № 13. P.3051-3067.
407. Morgan C. J., Curran H. V. Independent Scientific Committee on Drugs. Ketamine use: a review. *Addiction*. 2012 № 107 (1). С. 27-38.
408. Матеріали експериментальних і клінічних випробувань препарату «Цереброкурин» / Єна Л. М. та ін. К., 1997. 115 с.
409. Сергієнко А. Н. Застосування препарату «Цереброкурин®» при лікуванні дегенеративнодистрофічних захворювань сітківки. *Новини медицини та фармації*. 2001. № 12 (97). С. 8.
410. Dower S. K., Urdal D. L. IL-1 receptors. *Immunol. Today*. 1987. Vol. 8. P. 46-51.
411. Review of acute ischaemic stroke in Pakistan: progress in management and future perspectives / A. Z. Nomani et al. *Stroke Vasc Neurol*. 2017. № 2 (1). P. 30-39.
412. Беленичев И. Ф., Литвиненко Е. С., Горбачова С. В. Влияние селективного модулятора Se-зависимой глутатионпероксидазы на показатели нитрозирующего стресса и нейроаптоза при экспериментальном остром нарушении кровообращения. *The Ukrainian Biochemical Journal*. Київ : КНУ ім. Т. Шевченка. 2014. Т. 86, № 5. С. 128.
413. Yamashita T., Abe K. Recent Progress in Therapeutic Strategies for Ischemic Stroke. *Cell Transplant*. 2016. № 25 (5). P. 893-898.
414. Heat Shock Protein 70 kDa as a Target for Diagnostics and Therapy of Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases / E. V. Konstantinova et al. *Curr Pharm Des*. 2019. № 25 (6). P. 710-714.
415. Жданов Г. Н., Герасимова М. М. Изучение содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови

больных в остром периоде ишемического инсульта. *Цитокины и воспаление*. 2006. Т. 5. № 1. С. 27-30.

416. Dinarello C. A. Clinical relevance of interleukin-1 and its multiple biological activities. *Bull. Inst. Pasteur*. 1987. № 3. P. 267-285.

417. The role and therapeutic potential of heat shock proteins in haemorrhagic stroke / A. Shao et al. *J Cell Mol Med*. 2019. № 23 (9). P. 5846-5858.

418. Increase cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke / C. Ferrarese et al. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 1999. Vol. 19. № 9. P. 1004-1009.

419. Suprun E., Belenichev I., Suprun A. Effectiveness of antihypoxic activity IL-1RA and IL-2 in experimental hemorrhagic stroke. *Фармація XXI століття: тенденції та перспективи* : матеріали VIII Нац. з'їзду фармацевтів України, м. Харків, 13-16 верес. Х., 2016. Т. 2. С. 149.

420. Cell therapy centered on IL-1Ra is neuroprotective in experimental stroke / B. H. Clausen et al. *Acta Neuropathol*. 2016. № 131 (5). P. 775-791.

421. Effects of chronic overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in a model of permanent focal cerebral ischemia in mouse / M. Oprica et al. *Acta Neuropathol*. 2004. № 108 (1). P. 69-80.

422. Горбачова С. В., Беленічев І. Ф., Кучеренко Л. І. Порухення функціонування сполученої системи «відновлені тіоли – оксид азоту» при гострому порухенні мозкового кровообігу та можливі шляхи їх корекції. *Медична та клінічна хімія*. 2015. № 17 (4). С. 63-67.

423. Горбачева С. В., Беленічев І. Ф. Показатели тиол-дисульфидной системы и нитрозативного стресса в нейронах в условиях моделирования глутаматной эксайтотоксичности in vitro и на фоне применения ингибиторов поs различной селективности. *Мир медицины и биологии*. 2015. Т. 11, № 4-2 (54). С. 112-116.

424. Ноотропы в комплексной терапии хронической ишемии мозга / И. С. Чекман и др. *Наука та інновації*. 2014. Т. 10. № 4. С. 61-75.

425. Модулятори тіол-дисульфідної системи в корекції порушень енергетичного метаболізму в при гострій церебральній ішемії / С. В. Горбачова та ін. *Мир медицини и биологии*. 2016. Т. 12, № 1 (55). С. 122-125.

426. Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Suppresses RIP1-Dependent Apoptotic and Necroptotic Cascades / S. R. Srinivasan et al. *Mol Cancer Res*. 2018. № 16 (1). P. 58-68.

427. Expression of HSP70 in the Brain of Rats During Experimental Cerebral Ischemia Modeling and on the Background of Neuroprotection / I. F. Belenichev et al. *Biol. Markers and Guided Ther*. 2017. Vol. 4 (1). P. 105-111.

428. Молекулярно-біохімічні механізми HSP 70-опосередкованої цитопротекції в умовах патологій ішемічного генезу / Павлов С. В. та ін. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Т. 1. №. 3. С. 61-67.

429. Яковлєва Л. В., Міщенко О. Я., Адонкіна В. Ю. Обґрунтування клініко-економічних переваг комплексної нейропротекторної терапії з використанням цитиколіну та актовегіну у порівнянні з базисною та терапією цитиколіном за результатами фармакоеконімічного аналізу : *інформ. лист № 368-2012*, вип. 52 з пробл. «Фармація». К., 2012. 4 с.

430. Pharmacological Correction of Thiol-Disulphide Imbalance in the Rat Brain By Intranasal form of Il-1b Antagonist in a Model of Chronic Cerebral Ischemia / I. F. Belenichev et al. *Neurochemical Journal*. 2021. Vol. 15, №. 1. P. 30-36.

431. Юхимчук Х. В. Види інсульту. Як виникає і як можна застерегтися від інсульту. *Медсестринство*. 2018. № (1). Режим доступу : <https://10.11603/2411-1597.2018.1.9104>

432. Зозуля І. С., Цимбалюк В. І., Зозуля А. І. Інсульт: стратегія і тактика надання медичної допомоги. *Український медичний часопис*. 2012. № 5. С. 36-39.

433. Пат. 126977 Україна, МПК А61К 31/00 (2018.01). Спосіб зменшення ексайтотоксичності в умовах експериментального гострого порушення

мозкового кровообігу / Беленічев І. Ф. та ін. № u 201801583 ; заявл. 19.02.18 ; опубл. 10.07.18. Бюл. № 13.

434. Шведський В. В. Штриголь С. Ю., Ходаківський О. А. Сучасна церебропротекторна терапія гострих порушень мозкового кровообігу при цукровому діабеті та шляхи її оптимізації. *Клінічна фармація*. 2011. № 2. С. 7-12.

435. Neuroprotection in acute brain injury: an up-to-date review / N. Stocchetti et al. *Crit Care*. 2015. Vol. 21. № 19 (1). P. 186.

436. Xiong X. Y., Liu L., Yang Q. W. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. *Prog Neurobiol*. 2016. № 142. С. 23-44.

437. Патент на винахід № 111462 Україна. МПК А61К 31/4196 (2006.01), А61Р25/28 (2006.01), А61Р25/32 (2006.01). Застосування (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату як активної основи лікарських засобів для профілактики та лікування порушень життєзабезпечуючих функцій ЦНС при важких формах гострого отруєння етанолом / Кучеренко Л. І. та ін. № 2016 00367 ; заявл. 16.01.16 ; опубл. 25.04.16.

438. Pavlyuk I. V., Belenichev I. F., Kucherenko L. I. Pharmacological effects on oxidative stress NO-dependent mechanisms in the brain under chronic alcohol intoxication: Angiolin antioxidant effects. *American Scientific Journal*. 2016. № 1 (11). P. 85-88

439. Rhein protects against cerebral ischemic-/reperfusion-induced oxidative stress and apoptosis in rats / Q. Zhao et al. *Int J Mol Med*. 2018. № 41 (5). С. 2802-2812.

440. Киселева А. В., Чурляев Ю. А., Григорьев Е. В. Роль оксида азота в повреждении нейронов при критических состояниях. *Общая реаниматология*. 2009. Т. 5, № 5. С. 80-84.



441. Effects and Mechanism of Action of Inducible Nitric Oxide Synthase on Apoptosis in a Rat Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury / L. Zheng et al. *Anat Rec (Hoboken)*. 2016. № 299 (2). С. 246-55.

442. Doll D. N., Barr T. L., Simpkins J. W. Cytokines: their role in stroke and potential use as biomarkers and therapeutic targets. *Aging Dis.* 2014. № 5 (5). С. 294-306.

443. Lipton S. A. Neuronal protection and destruction by NO. *Cell Death Differ.* 1999. № 6 (10). С. 943-51.

444. Kim J. Y., Yenari. M. A. Heat Shock Proteins and the Stress Response. *Primer on Cerebrovascular Diseases (Second Edition)*, 2017. 968 p.

445. Беленичев И. Ф., Биля Ю. В. Взаимосвязь между концентрацией HSP 70, активностью тиол-дисульфидной системы и степенью неврологических нарушений при моделировании острой церебральной ишемии. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип. 1 (135). С. 86-91.

446. Беленичев И. Ф. Роль белков теплового шока в реализации молекулярно-биохимических механизмов нейропротекции. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2013. № 6 (36). С. 72-80.

447. Беленичев И. Ф., Павлов С. В., Бухтиярова Н. В. Механизмы формирования ишемической нейродеструкции: соотношение оксида азота и тиол-дисульфидной системы, как фактор, определяющий судьбу нейрона. *Международный неврологический журнал*. 2009. № 8 (30). С. 100-106.

448. Rasooli R., Pirsalami F., Moezi L. Possible involvement of nitric oxide in anticonvulsant effects of citicoline on pentylentetrazole and electroshock induced seizures in mice. *Heliyon*. 2020. № 6 (5). P. e03932.

449. Нефедов А., Мамчур В. Изучение влияния комбинированного использования метилпреднизолона с цитиколином на процессы энергообеспечения митохондрий нейронов коры головного мозга и гистоморфометрические показатели его образований в условиях рассеянного склероза в эксперименте. *Modern Science – Moderní věda*. Praha : Česká republika, Nemoros. 2016. № 1. P. 142-156.

450. Савустьяненко А. В. Цитиколин: механизм действия и клиническая эффективность при лечении ишемического инсульта, хронических цереброваскулярных расстройств и травматического повреждения головного мозга. *Международный неврологический журнал*. 2014. № 2 (64). С. 115-120.

451. Супрун Е. В. Роль інтерлейкінів у механізмах розвитку цереброваскулярних захворювань. *Одеський медичний журнал*. 2011. № 3. С. 4-11.

452. Супрун Э. В., Бут Н. А., Терещенко С. В. Динамика неврологических нарушений при экспериментальном геморрагическом инсульте на фоне коррекции интерлейкином-2 (ронколейкином). *Казанский медицинский журнал*. 2014. Т. 95. № 6. С. 801-806.

453. Супрун Э. В., Беленичев И. Ф., Ищенко А. М. Влияние рецепторного антагониста интерлейкина-1 на свободнорадикальное повреждение в условиях билатеральной окклюзии общих сонных артерий у крыс. *Український журнал клінічної та лабораторної медицини*. 2011. Т. 6. № 1. С. 236-239.

454. High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia / J. C. Peraçoli et al. *J Reprod Immunol*. 2013. № 100 (2). С. 129-34.

455. Оптимизация методов выделения митохондрий из разных тканей мыши / А. П. Гуреев и др. *Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2015. № 4. С.61-65.

456. Молекулярні механізми розвитку енцефалопатії : монографія [Г. О. Ушакова, Я. В. Бабець, С. В. Кириченко]; за ред. проф. Г. О. Ушакової. Дніпро : ДНУ ім. Олесь Гончара, 2017. 203 с.

457. Manzo-Avalos S., Saavedra-Molina A. Cellular and Mitochondrial Effects of Alcohol Consumption. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2010. Vol. 7. № 12. P. 4281-4304.

458. Литвиненко О. С. Нейропротективна активність модуляторів системи глутатіону в умовах моделювання церебральної ішемії : автореф. дис. ... канд. біол. наук : 14.03.05 / Литвиненко Олена Семенівна; Нац. акад. мед. наук

України, Держ. установа «Ін-т фармакології та токсикології НАМН України». К., 2018. 20 с.

459. Rajappa S. K., Vijayalakshmi R. Glutaredoxin is essential for maintenance of brain mitochondrial complex I: studies with MPTP. *The FASEB Journal*. 2003. Режим доступу : <https://doi.org/10.1096/fj.02-0771fje>.

460. Murphy M. P. Antioxidants as therapies: can we improve on nature? *Free Radic. Biol. Med.* 2014. Vol. 66. P. 20-23.

461. Mechanisms of cell death in oxidative stress / S. W. Ryter et al. *Antioxid Redox Signal*. 2007. № 9 (1). С. 49-89.

462. Білки теплового шоку – нова ланка в механізмах дії лікарських засобів / Г. В. Зайченко та ін. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип. 4, т. 1 (139). С. 31-41.

463. Inducible HSP70 Antagonizes IL-1 $\beta$  Cytocidal Effects through Inhibiting NF-kB Activation via Destabilizing TAK1 in HeLa Cells / X. Cao et al. *Plos one*. 2012. № 7 (11). С. e50059.

464. HSP70 is a negative regulator of NLRP3 inflammasome activation / Martine P. et al. *Cell Death Dis.* 2019. № 10. P. 256. Режим доступу : <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1491-7>.

465. Соколик Е. П. Коррекция энергетического метаболизма нейропептидами в условиях хронической алкоголизации. *Патологія*. 2010. Т. 7. № 2. С. 50-52.

466. Бурчинський С. Г. Комбинированная нейропротекция при хронической ишемии головного мозга: цели, задачи, инструменты. *Международный неврологический журнал*. 2020. Т. 16. №. 3. С. 50-57.

467. Фармакологічний аналіз нейропротекції за умов експериментального алергічного енцефаломієліту : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 14.03.05 / Нефьодов Олександр Олександрович ; Нац. акад. мед. наук України, Держ. установа «Ін-т фармакології та токсикології НАМН України». К., 2017. 36 с.

468. Формирование инфламмасом: новые механизмы регуляции межклеточных взаимодействий и секреторной активности клеток / Кувачева Н. В. и др. *Сибирское медицинское обозрение*. 2013. № 5. С. 3-10.

469. Ketamine: A Review of Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Anesthesia and Pain Therapy / M. A. Peltoniemi et al. *Clin Pharmacokinet*. 2016. № 55 (9). С. 1059-1077.

470. Bell J. D. In Vogue: Ketamine for Neuroprotection in Acute Neurologic Injury. *Anesth Analg*. 2017. № 124 (4). С. 1237-1243.

471. Intravitreal ketamine promotes neuroprotection in rat eyes after experimental ischemia / L. F. N Dourado et al. *Biomed Pharmacother*. 2021. № 133. С. 110948.

472. Dong C., Anand K. J. Developmental neurotoxicity of ketamine in pediatric clinical use. *Toxicol Lett*. 2013. Vol. 20. № 220 (1). С. 53-60.

473. Yan J., Jiang H. Dual effects of ketamine: neurotoxicity versus neuroprotection in anesthesia for the developing brain. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2014. № 26 (2). С. 155-60.

474. Long-term postoperative dysfunction in the elderly: ISPOCD 1 study / J. T. Moller et al. *Lancet*. 1998. Vol. 351. P. 857-861.

475. Бездетко Н. В. Цитиколин: новое об известном. *Международный неврологический журнал*. 2015. № 4 (74). С. 90-94.

476. Mendiola A. S., Cardona A. E. The IL-1 $\beta$  phenomena in neuroinflammatory diseases. *J Neural Transm (Vienna)*. 2018. № 125 (5). С. 781-795.

477. Possible role of interleukin-1 $\beta$  in type 2 diabetes onset and implications for anti-inflammatory therapy strategies / G. Zhao et al. *PLoS Comput Biol*. 2014. № 10 (8). С. e1003798.

478. Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies / P. K. Kamat et al. *Mol Neurobiol*. 2016. № 53 (1). С. 648-661.

479. Yes-associated protein protects and rescues SH-SY5Y cells from ketamine-induced apoptosis / Y. Chen et al. *Mol Med Rep.* 2020. № 22 (3). C. 2342-2350.

480. Ketamine for the treatment of addiction: Evidence and potential mechanisms / Ivan Ezquerra-Romano I. et al. *Neuropharmacology.* 2018. № 142. C. 72-82.

481. Up-regulation of c-Fos associated with neuronal apoptosis following intracerebral hemorrhage / X. Chen et al. *Cell Mol Neurobiol.* 2015. № 35 (3). C. 363-376.

482. Igor Belenichev, Bogdan Burlaka. Neuroprotective properties of intranasal drug ARIL(IL-1b antagonist) at animals with cognitive deficit, caused by ketamine anesthesia. *Implementing Major Initiative Studies for the Development of Pharmaceutical : 5th World Congress & Expo on Pharmaceutics & Drug Delivery*, February 10-11. Venue : Lisbon, Portugal, 2020. P. 39.

483. Ketamine may exert antidepressant effects via suppressing NLRP3 inflammasome to upregulate AMPA receptors / J. M. Li et al. *Neuropharmacology.* 2019. № 146. C. 149-153.

484. Interleukin-1beta up-regulates the expression of thrombopoietin and transcription factors c-Jun, c-Fos, GATA-1, and NF-E2 in megakaryocytic cells / C. K. Chuen et al. *J Lab Clin Med.* 2004. № 143 (2). C. 75-88.

485. Современная стратегия нейропротекции в терапии цереброваскулярной патологии и коррекции возрастных особенностей нейрометаболизма. *Міжнародний неврологічний журнал.* 2013. № 7. С. 181-184.  
Режим доступу : [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Mnzh\\_2013\\_7\\_18](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Mnzh_2013_7_18)

## Додаток А.1



Продовж. дод. А.1

(11) **141924**(19) **UA**(51) МПК (2020.01)  
A61K 9/00  
A61K 33/06 (2006.01)  
A61K 31/00  
A61P 25/02 (2006.01)

(21) Номер заявки:	u 2020 00817	(72) Винахідники: Бурлака Богдан Сергійович, UA, Бєленічев Ігор Федорович, UA
(22) Дата подання заявки:	10.02.2020	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	27.04.2020	
(46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня:	27.04.2020, Бюл. № 8	(73) Власники: ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035, UA, Бурлака Богдан Сергійович, Хортицьке шосе, 28, кв. 91, м. Запоріжжя, 69124, UA, Бєленічев Ігор Федорович, пр. Ювілейний, 26, кв. 61, м. Запоріжжя, 69074, UA

(54) Назва корисної моделі:

**НАЗАЛЬНИЙ ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ НООТРОПНОЇ ДІЇ**

(57) Формула корисної моделі:

Назальний лікарський засіб ноотропної дії, що містить активну речовину та допоміжні компоненти, який відрізняється тим, що він виготовлений у формі назального гелю, як активну речовину містить етиловий ефір п-фенілацетил-1-пролілгліцину (ноопепт) та як допоміжні речовини - Бішофіт Полтавський, гліцерин, твін-80, натрій КМЦ, бензалконію хлорид та воду очищену, при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

етиловий ефір п-фенілацетил-1-пролілгліцину		0,9-1,1
Бішофіт (стандартизований)	Полтавський	4,8-5,2
гліцерин		4,8-5,2
твін-80		0,9-1,1
натрій КМЦ		0,2-0,4
бензалконію хлорид		0,01-0,03
вода очищена		до 100,0.



## Додаток А.2





## Продовж. дод. А.2

(11) **126979**(19) **UA**(51) **МПК (2018.01)****A61K 9/00****A61K 31/00**(21) Номер заявки: **u 2018 01588**(22) Дата подання заявки: **19.02.2018**(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.07.2018**(46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: **10.07.2018, Бюл. № 13**

(72) Винахідники:

**Беленичев Ігор Федорович,****UA,****Курочкін Михайло Юрійович,****UA,****Риженко Ольга Ігорівна, UA,****Бурлака Богдан Сергійович,****UA,****Бухтіярова Ніна Вікторівна,****UA**

(73) Власник:

**ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ****МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,**

пр. Маяковського, 26, м.

Запоріжжя, 69035, UA

(54) Назва корисної моделі:

**СПОСІБ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОРЕКЦІЇ ПОРУШЕНЬ КОГНІТИВНИХ ФУНКЦІЙ ЦЕНТРАЛЬНОЇ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ І ПСИХОЕМОЦІЙНОЇ СФЕРИ ПІСЛЯ КЕТАМІНОВОЇ АНЕСТЕЗІЇ В ЕКСПЕРИМЕНТІ**

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб фармакологічної корекції порушень когнітивних функцій центральної нервової системи і психоемоційної сфери після кетамінової анестезії в експерименті, який включає застосування лікарського засобу, який **відрізняється** тим, що лабораторним тваринам інтраназально протягом 3 діб вводять ноопепт у дозі 10 мг/кг та цереброкурин у дозі 200 мкл/кг один раз на добу, при цьому використовують лікарську форму гель.



## Додаток Б.2



1. **Назва пропозиції для впровадження:** Методологічні аспекти розробки назальних лікарських форм церебропротективної дії.

2. **Установа, її адреса, виконавці:** Запорізький державний медичний університет, Маяковського 26, кафедри: технології ліків, фармакології та медичної рецептури, докторант Бурлака Б.С.

3. **Джерела інформації:**

- Бурлака Б. Опрацювання фармацевтичних факторів до створення алгоритмічного підходу в методології розробки назальних форм системної дії // XXIV Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених the 24th international medical congress of students and young scientists. Матеріали конгресу 12-14 квітня. Тернопіль 2021. С. 189.
- Експертна система “ExpSys Nasalia”. URL: <https://nasalia.zsmu.zp.ua>

4. **Де впроваджено:** *Biggin profession*

5. **Форма впровадження:** виробничий процес створення нових назальних лікарських засобів.

6. **Термін впровадження:** *листопад 2021 р.*

7. **Ефективність впровадження:**

Показники	За даними	
	розробників	установи, що впроваджує
Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям наведеним у джерелі інформації		
Результати наукових досліджень використовуються співробітниками у виробничому процесі створення нових назальних лікарських засобів		

8. **Зачеження та пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:

Зав. відділу

## Додаток Б.3

**“ЗАТВЕРДЖУЮ”**  
 Генеральний директор  
 ТОВ «БіоТестЛаб»,  
 канд. фарм. наук  
 Салій О. О.  
 « 09 » \_\_\_\_\_ 2021 р.


**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Методологічні аспекти розробки лікарських форм церебропротективної дії.

2. **Установа, її адреса, виконавці:** Запорізький державний медичний університет, Маяковського 26, кафедри: технології ліків, фармакології та медичної рецептури, докторант Бурлака Б.С.

3. **Джерела інформації:**

- Бурлака Б. Опрацювання фармацевтичних факторів до створення алгоритмічного підходу в методології розробки назальних форм системної дії // XXIV Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених the 24th international medical congress of students and young scientists. Матеріали конгресу 12-14 квітня. Тернопіль 2021. С. 189.
- Бурлака Б.С., Беленічев І.Ф. Розробка моделей машинного навчання для in silico прогнозу проникності сполук через гематоенцефалічний бар'єр. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. №2(15). С. 92-98
- Експертна система “ExpSys Nasalia”. URL: <https://nasalia.zsmu.zp.ua>

4. **Де впроваджено:** ТОВ «БіоТестЛаб»

5. **Форма впровадження:** виробничий процес створення нових лікарських засобів.

6. **Термін впровадження:** протягом 2021 року

7. **Ефективність впровадження:**

Показники	За даними	
	розробників	установи, що впроваджує
Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям наведеним у джерелі інформації		
Результати наукових досліджень використовуються співробітниками у виробничому процесі створення нових лікарських засобів		

8. **Зауваження та пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження

Директор з виробництва ТОВ «БіоТестЛаб»

  
 А. І. Чегринець



## Додаток Б.4

“ЗАТВЕРДЖУЮ”  
 Технічний директор АТ Фармак  
 Гой А.М.  
 « 10 » березня 2021 р.




## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: Методологічні аспекти розробки назальних лікарських форм церебропротективної дії.
2. Установа, її адреса, виконавці: Запорізький державний медичний університет, Маяковського 26, кафедри: технології ліків, фармакології та медичної рецептури, докторант Бурлака Б.С.
3. Джерела інформації:
  - Бурлака Б. Опрацювання фармацевтичних факторів до створення алгоритмічного підходу в методології розробки назальних форм системної дії // XXIV Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених the 24th international medical congress of students and young scientists. Матеріали конгресу 12-14 квітня. Тернопіль 2021. С. 189.
  - Експертна система “ExpSys Nasalia”. URL: <https://nasalia.zsmu.zp.ua>
4. Де впроваджено: лабораторія розробки рідких лікарських засобів відділу технологічної розробки департаменту досліджень та розробки АТ Фармак
5. Форма впровадження: як допоміжний елемент в процесі розробки назальних лікарських засобів.
6. Термін впровадження: березень 2021 р.
7. Ефективність впровадження:

Показники	За даними	
	розробників	установи, що впроваджує
<i>Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям наведеним у джерелі інформації</i> <i>Результати наукових досліджень використовуються як допоміжний елемент в процесі розробки назальних лікарських засобів</i>		

8. Зауваження та пропозиції: немає.

Відповідальні за впровадження:

Начальник відділу технологічної розробки департаменту досліджень та розробки, д.фарм.н., проф.,  С.М. Гуреєва

Начальник лабораторії розробки рідких лікарських засобів відділу технологічної розробки

 В. А. Чорний

## Додаток В

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**Український центр наукової медичної інформації**  
**та патентно-ліцензійної роботи**  
**(Укрмедпатентінформ)**

**ІНФОРМАЦІЙНИЙ ЛИСТ**

ПРО НОВОВВЕДЕННЯ В СФЕРІ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я

№ 70 - 2070
-------------

Випуск з проблеми  
«Фармація»  
Підстава: витяг ЕПК  
«Фармація»  
Протокол № 108 від 27.11.19 р.

НАПРЯМ ВПРОВАДЖЕННЯ:  
ФАРМАЦІЯ

**ВИГОТОВЛЕННЯ ІНТРАНАЗАЛЬНОГО ГЕЛЮ З ДІЮЧОЮ**  
**РЕЧОВИНОЮ ЕТИЛОВИЙ ЕФІР N-ФЕНІЛАЦЕТИЛ-L-**  
**ПРОЛІЛГЛЦИНУ В УМОВАХ АПТЕКИ**

УСТАНОВИ-РОЗРОБНИКИ:

**ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ**  
**МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ МОЗ УКРАЇНИ**

**УКРМЕДПАТЕНТИНФОРМ**  
**МОЗ УКРАЇНИ**

А В Т О Р И:

**БУРЛАКА Б.С.**  
**БЕЛЕНІЧЕВ І.Ф.**  
**ГЛАДИШЕВ В.В.**

м. Київ

## Додаток Д.1

Затверджую  
 Генеральний директор  
 ПрАТ «Ліки Кіровоградщини»  
 « 07 » 10 2020р

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір n-фенілацетил-1-пролілгліцину в умовах аптеки
2. **Установа, її адреса, виконавці:** Запорізький державний медичний університет, кафедра технології ліків, кафедра фармакології та медичної рецептури. 69035 м. Запоріжжя, пр. Маяковського 26; Б.С.Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладішев
3. **Джерело інформації:** Бурлака Б.С. Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір n-фенілацетил-1-пролілгліцину в умовах аптеки / Б.С. Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладішев // Інформ. лист МОЗ України. - 2020. - Випуск з проблеми «Фармація». №70. -2020. – 4 с.
4. **Впроваджено:** в виробничий процес аптек з екстемпоральним виготовленням лікарських засобів ПрАТ «Ліки Кіровоградщини»
5. **Термін впровадження:** 2020 20кр.
6. **Ефективність впровадження:**

Показники	За даними	
	розробників	установи, що впроваджує
Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям наведеним у джерелі інформації		
Результати наукових досліджень використовуються у екстемпоральному виготовленні назальних засобів		

Відповідальний за впровадження  
 Завідувач аптеки №1

Хільченко О.О.

## Додаток Д.2

Затверджую

Директор ПКВО «Фармація»

м. Миколаїв



20 2020

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- Назва пропозиції для впровадження:** Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір п-фенілацетил-І-пролілгліцину в умовах аптеки
- Установа, її адреса, виконавці:** Запорізький державний медичний університет, кафедра технології ліків, кафедра фармакології та медичної рецептури. 69035 м. Запоріжжя, пр. Маяковського 26; Б.С.Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладишев
- Джерело інформації:** Бурлака Б.С. Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір п-фенілацетил-І-пролілгліцину в умовах аптеки / Б.С. Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладишев // Інформ. лист МОЗ України. - 2020. - випуск з проблеми «Фармація». №70.- 2020. – 4 с.
- Впроваджено:** в виробничий процес аптек з екстемпоральним виготовленням лікарських засобів ПКВО «Фармація» м. Миколаїв
- Термін впровадження:** впроваджено 20 21р.
- Ефективність впровадження:**

Показники	За даними	
	розробників	установи, що впроваджують
Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям наведеним у джерелі інформації		
Результати наукових досліджень використовуються у екстемпоральному виготовленні назальних засобів		

Відповідальний за впровадження

Зав. ПКВО м. Миколаїв І.В. Савченко  
Ліцензійний відділ



## Додаток Д.3

Затверджую  
Директор  
КП «Фармація» КМР

« 16 » 12 2020р

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір n-фенілацетил-l-пролілгліцину в умовах аптеки
2. **Установа, її адреса, виконавці:** Запорізький державний медичний університет, кафедра технології ліків, кафедра фармакології та медичної рецептури. 69035 м. Запоріжжя, пр. Маяковського 26; Б.С.Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладишев
3. **Джерело інформації:** Бурлака Б.С. Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір n-фенілацетил-l-пролілгліцину в умовах аптеки / Б.С. Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладишев // Інформ. лист МОЗ України. - 2020. - Випуск з проблеми «Фармація». №70. -2020. – 4 с.
4. **Впроваджено:** в виробничий процес аптек з екстемпоральним виготовленням лікарських засобів КП «Фармація» КМР м. Кривий Ріг
5. **Термін впровадження:** грудень 2020 р.
6. **Ефективність впровадження:**

Показники	За даними	
	розробників	установи, що впроваджує
Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям наведеним у джерелі інформації		
Результати наукових досліджень використовуються у екстемпоральному виготовленні назальних засобів		

Відповідальний за впровадження:  
Завідуючий аптеки №7  
Максименко Н.В.

*Наш*

## Додаток Д.4

Затверджую  
Директор КП «ПРИМУЛА»  
м. Запоріжжя

« 26 » \_\_\_\_\_ 2021 р

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. Назва пропозиції для впровадження: Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною стилівий ефір п-фенілацетил-І-пролілгліцину в умовах аптеки
2. Установа, її адреса, виконавці: Запорізький державний медичний університет, кафедра технології ліків, кафедра фармакології та медичної рецептури. 69035 м. Запоріжжя, пр. Маяковського 26; Б.С.Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладішев
3. Джерело інформації: Бурлака Б.С. Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною стилівий ефір п-фенілацетил-І-пролілгліцину в умовах аптеки / Б.С. Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладішев // Інформ. лист МОЗ України. - 2020. - Випуск з проблеми «Фармація». №70. -2020. - 4 с.
4. Впроваджено: в виробничий процес аптек з екстемпоральним виготовленням лікарських засобів КП «ПРИМУЛА»
5. Термін впровадження: вироблено 2021 р.
6. Ефективність впровадження:

Показники	За даними	
	розробників	установи, що впроваджує
Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям наведеним у джерелі інформації		
Результати наукових досліджень використовуються у екстемпоральному виготовленні назальних засобів		

Відповідальний за впровадження  
директор КП «ПРИМУЛА»



О. Б. КРАСОВСЬКА

## Додаток Д.5

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор ПП Медична Лабораторія  
«Сіместа»  
Гарєєв О.Л.

к. 01» \_\_\_\_\_ 03 \_\_\_\_\_ 2021 р

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. *Назва пропозиції для впровадження:* Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір n-фенілацетил-l-пролілгліцину в умовах аптеки
2. *Установа, її адреса, виконавці:* Запорізький державний медичний університет, кафедра технології ліків, кафедра фармакології та медичної рецептури. 69035 м. Запоріжжя, пр. Маяковського 26; Б.С. Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладішев
3. *Джерело інформації:* Бурлака Б.С. Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір n-фенілацетил-l-пролілгліцину в умовах аптеки / Б.С. Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладішев // Інформ. лист МОЗ України. - 2020. - Випуск з проблеми «Фармація». №70. -2020. – 4 с.
4. *Впроваджено:* в виробничий процес ПП Медичної Лабораторії «Сіместа» у аптеки з екстемпоральним виготовленням лікарських засобів.
5. *Термін впровадження:* на протязі 2021 р.
6. *Ефективність впровадження:*

Показники	За даними	
	розробників	установи, що впроваджує
Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям наведеним у джерелі інформації		
Результати наукових досліджень використовуються у екстемпоральному виготовленні назальних засобів		

Відповідальний за впровадження

Директор  
ПП Медична Лабораторія «Сіместа»



О.Л.Гарєєв

## Додаток Д.6

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. *Назва пропозиції для впровадження:* Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір п-фенілацетил-*l*-пролілглїцину в умовах аптеки
2. *Установа, її адреса, виконавці:* Запорізький державний медичний університет, кафедра технології ліків, кафедра фармакології та медичної рецептури. 69035 м. Запоріжжя, пр. Маяковського 26; Б.С.Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладишев
3. *Джерело інформації:* Бурлака Б.С. Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір п-фенілацетил-*l*-пролілглїцину в умовах аптеки / Б.С. Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладишев // Інформ. лист МОЗ України. - 2020. - Випуск з проблеми «Фармація». №70. -2020. – 4 с.
4. *Впроваджено:* в виробничий процес аптек з екстемпоральним виготовленням лікарських засобів згідно з технологією виготовлення
5. *Термін впровадження:* протягом 2021 р.
6. *Ефективність впровадження:*

Показники	За даними	
	розробників	установи, що впроваджує
Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям наведеним у джерелі інформації		
Результати наукових досліджень використовуються у екстемпоральному виготовленні назальних засобів		

Відповідальний за впровадження





## Додаток Д.7



Завідуюча  
Заклад № 80  
Шучна Н.І. м.Слов'янськ  
Шучна Н.І.  
«06» 04 2021р

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- Назва пропозиції для впровадження:** Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір п-фенілацетил-1-пропілгліцину в умовах аптеки
- Установа, її адреса, виконавці:** Запорізький державний медичний університет, кафедра технологій ліків, кафедра фармакології та медичної рецептури. 69035 м. Запоріжжя, пр. Маяковського 26; Б.С.Бурлака, І.Ф.Беленічев, В.В.Гладишев
- Джерело інформації:** Бурлака Б.С. Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір п-фенілацетил-1-пропілгліцину в умовах аптеки / Б.С. Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладишев // Інформ. лист МОЗ України. - 2020. - Випуск з проблеми «Фармація». №70, -2020. - 4 с.
- Впроваджено:** в виробничий процес Аптеки №80 ФОП Шучна Н.І. з екстемпоральним виготовленням лікарських засобів
- Термін впровадження:** з травня 2021р.
- Ефективність впровадження:**

Показники	За даними	
	розробників	установи, що впроваджує
Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям наведеним у джерелі інформації		
Результати наукових досліджень використовуються у екстемпоральному виготовленні назальних засобів		

Відповідальний за впровадження

Завідуюча Аптеки №80 ФОП Шучна Н.І.  
м.Слов'янськ Шучна Н.І.  
Теліха В.О.

## Додаток Д.8



\_\_\_\_\_ Lazkin Khalaf

« 14 » \_\_\_\_\_ 06 \_\_\_\_\_ 2021 p

## IMPLEMENTATION

1. **The name of the proposal for implementation:** Production of intranasal gel with active substance ethyl ester of n-phenylacetyl-L-prolylglycine in a pharmacy
2. **Institution, its address, executors:** Zaporizhzhya State Medical University, Department of Drug Technology, Department of Pharmacology and Medical Prescription. 69035 Zaporizhia, 26 Mayakovsky Ave; BS Burlaka, IF Belenichev, VV Gladyshev
3. **Source of information:** Burlaka BS Production of intranasal gel with active substance ethyl ester of n-phenylacetyl-L-prolylglycine in a pharmacy / B.S. Burlaka, IF Belenichev, VV Gladyshev // Inform. letter of the Ministry of Health of Ukraine. -2020. - Issue on the issue of "Pharmacy". №70. -2020. - 4 p.
4. **Implemented:** in the production process of a pharmacy with extemporaneous manufacture of drugs in Petersberg-Apotheke, Germany
5. **Deadline for implementation:** during 2021
6. **Effectiveness of implementation:** The use of development has shown that the effectiveness of implementation meets the criteria given in the source of information. The results of scientific research are used in the extemporaneous manufacture of nasal products.

Responsible for implementation

Head pharmacist

Lazkin Khalaf

## Додаток Е.1

ДКПІ 32.50.13-79.00

УКНД 11.040.99

**ЗАТВЕРДЖУЮ**  
ТОВ "МОБІЛЬ МЕДКАЛ"

  
А.В. Руденко  
«  »    2021 р

**ПОГОДЖЕНО**

Ректор Запорізького  
державного медичного  
університету  
д. мед. н. професор  
  
Ю.М. Колесник  
«  »    2021 р

**НАСАДКА НАЗАЛЬНА ОДНОРАЗОВОГО ВИКОРИСТАННЯ****СТЕРИЛЬНА**


Технічні умови

ТУ 32.5-38002601-001:2021

Інв. № подл.	Подп. и дата	Взам. инв. №	Инов. № дубл.	Подп. и дата

**РОЗРОБЛЕНО:**

Запорізький державний медичний  
університет, кафедра технології ліків

  
доц. Бурлака Б.С.  
2021 р.



## Додаток Е.2



**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ  
БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**  
вул. Б. Грінченка, 1, м. Київ, 01001, тел. 279-12-70, 279-75-58, факс 279-48-83,  
e-mail: info@dpss.gov.ua

**ЗАТВЕРДЖУЮ**  
Голова Держпродспоживслужби  
Маталенька В.В.  
(прізвище, ім'я, по батькові)  
  
(підпис)  
№ 1

**ВИСНОВОК**  
державної санітарно-епідеміологічної експертизи

від " 11 " 06 2021 року № 12.2-18-21 10941

**Об'єкт експертизи:** ТУ У 38002601:2021 «НАСАДКА НАЗАЛЬНА ДЛЯ ОДНОРАЗОВОГО ЗАСТОСУВАННЯ СТЕРИЛЬНА. ТЕХНІЧНІ УМОВИ»  
(назва об'єкта експертизи)

**Код за ДКПШ** 32.50.13

**Сфера застосування та реалізації об'єкта експертизи** нормативно-технічна документація на насадку назальну для одноразового застосування стерильну

**Розробник** ТОВ «МОБІЛЬ МЕДКАЛ», Україна, 07354, Київська область, Вишгородський район, с. Нові Петрівці, пров. 1-го Травня, буд. 17-А, тел.: +380 44 353-80-02, e-mail: info@mobil-medical.com; Код за СДРПОУ 38002601  
(адреса, місцезнаходження, телефон, факс, E-mail, веб-сайт)

**Заявник експертизи** ТОВ «МОБІЛЬ МЕДКАЛ», Україна, 07354, Київська область, Вишгородський район, с. Нові Петрівці, пров. 1-го Травня, буд. 17-А, тел.: +380 44 353-80-02, e-mail: info@mobil-medical.com; Код за СДРПОУ 38002601  
(адреса, місцезнаходження, телефон, факс, E-mail, веб-сайт)

**За результатами державної санітарно-епідеміологічної експертизи:** ТУ У 38002601:2021 «НАСАДКА НАЗАЛЬНА ДЛЯ ОДНОРАЗОВОГО ЗАСТОСУВАННЯ СТЕРИЛЬНА. ТЕХНІЧНІ УМОВИ» відповідають вимогам діючого санітарного законодавства України і можуть бути погоджені (затверджені)  
**Висновок дійсний на термін дії** ТУ У 38002601:2021 «НАСАДКА НАЗАЛЬНА ДЛЯ ОДНОРАЗОВОГО ЗАСТОСУВАННЯ СТЕРИЛЬНА. ТЕХНІЧНІ УМОВИ» або внесення змін до ТУ У 38002601:2021 «НАСАДКА НАЗАЛЬНА ДЛЯ ОДНОРАЗОВОГО ЗАСТОСУВАННЯ СТЕРИЛЬНА. ТЕХНІЧНІ УМОВИ»

**Відповідальність за дотримання вимог цього висновку** несе заявник. При внесенні змін до нормативного документа щодо сфери застосування, умов застосування об'єкта експертизи даний висновок втрачає силу.

Комісія з питань державної санітарно-епідеміологічної експертизи Центру превентивної медицини Державного Управління справами  
Протокол експертизи

03143, м. Київ, вул. Заболотного, 15  
т.(044) 526-55-32 факс (044)526-50-06  
(найменування, місцезнаходження, телефон, факс, E-mail, веб-сайт)  
№ 3032 від 13.05.2021 р  
(№ протоколу, дата його затвердження)

В.о. голови комісії

 М.П.

  
(підпис) **Н.В. Гадяцька**  
(ініціали та прізвище)



## Додаток Е.3



ТОВ «МОБІЛЬ МЕДІКАЛ»  
07354, Київська обл., Вишгородський р-н, с. Нові Петрівці,  
пров. 1-го Травня, буд. 17А, тел.: (044) 353 8 002

р/р №26005403161 в АТ «Райффайзен Банк Аваль», м.Київ, МФО 380805  
ЄДРПОУ 38002601, ІПН 380026026542

Сайт: [www.mobil-medical.com](http://www.mobil-medical.com), e-mail: [info@mobil-medical.com](mailto:info@mobil-medical.com)

Заступнику Голови спеціалізованої вченої  
ради Д 17.600.03  
доктору фармацевтичних наук,  
професору  
**Коваленко С.І.**

**Вельмишановний Сергію Івановичу!**

Доводимо до Вашого відома, що виріб медичного призначення -  
«Насадка назальна для одноразового застосування, стерильна» включена до  
Перспективного плану впровадження нових засобів на 2021 – 2023 рр.

Генеральний директор  
ТОВ «МОБІЛЬ МЕДІКАЛ»



Руденко А.В.



## Додаток Е.4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Руденко А.В.« 17 » Од 2021р.**АКТ АПРОБАЦІЇ В ПРОМИСЛОВЕ ВИРОБНИЦТВО**

Зазначений акт складений, в зв'язку з успішною апробацією ТОВ «МОБІЛЬ МЕДКАЛ» промислової технології виробництва виробу медичного призначення - «Насадка назальна для одноразового застосування, стерильна» (ТУ У 38002601:2021), перевірено відтворення методик технологічного регламенту та апробовано методики контролю якості.

Генеральний директор  
ТОВ «МОБІЛЬ МЕДКАЛ»

Руденко А.В.

## Додаток Е.5

**АКТ**  
приймання -передачі № 17 від 17.02.2021

ТОВ «МОБІЛЬ МЕДКАЛ» в особі Генерального директора Руденко Андрія Васильовича («Замовник») і доцент кафедри технології ліків Запорізького державного медичного університету («Виконавець») з іншої сторони склали цей Акт про те, що Замовник прийняв від виконавця:

- блок-схеми та технологічну інструкцію для отримання виробу «Насадка назальна для одноразового застосування, стерильна»;
- проект методик контролю якості для опрацювання їх в дос'є

Зазначені документи передані в повному об'ємі, зауважень до їх відтворюваності немає.

«17» 02.2021

Бурлака Б.С.

«17» 02.2021



Руденко А.В.

## Додаток Ж.1



ТОВ «МОБІЛЬ МЕДКАЛ»  
07354, Київська обл., Вишгородський р-н, с. Нові Петрівці,  
пров. 1-го Травня, буд. 17А, тел.: (044) 353 8 002

р/р №26005403161 в АТ «Райффайзен Банк Аваль», м.Київ, МФО 380805  
ЄДРПОУ 38002601, ІПН 380026026542

Сайт: [www.mobil-medical.com](http://www.mobil-medical.com), e-mail: [info@mobil-medical.com](mailto:info@mobil-medical.com)

Голові спеціалізованої вченої ради  
Д 17.600.03  
доктору фармацевтичних наук,  
професору  
Книш Є.Г.

**Вельмишановний Євгенію Григоровичу!**

Доводимо до Вашого відома, що інтраназальний гель з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$  (IL-1ra) включений до Перспективного плану впровадження нових лікарських засобів на 2021 – 2023 рр.

Генеральний директор  
ТОВ «МОБІЛЬ МЕДКАЛ»

Руденко А. В.



## Додаток Ж.2

**«УЗГОДЖЕНО»**  
Голова Державної  
служби України з  
лікарських засобів

№ \_\_\_\_\_

**«УЗГОДЖЕНО»**  
Ректор Закарпатського  
державного медичного  
університету  
д. мед. н., професор  
Колесник Ю. М.



\_\_\_\_\_ 2021 р

**«ЗАТВЕРДЖЕНО»**  
Генеральний директор

ТОВ «МОБІЛЬ МЕДКАЛ»  
Руденко А. В.

« \_\_\_\_\_ »



## ТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПРОМИСЛОВИЙ РЕГЛАМЕНТ

(проект)

на виробництво назального гелю  
з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$  (IL-1ra)

ТПР \_\_\_\_\_

Дія до « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_

Регламент є власністю  
ТОВ «МОБІЛЬ МЕДКАЛ»  
та не може бути  
повністю або частково  
відтворений без дозволу  
Руденко А. В.

## Додаток Ж.3

## АКТ

приймання -передачі № 12-А від 16.02.2021

ТОВ «МОБІЛЬ МЕДІКАЛ» в особі Генерального директора Руденко Андрія Васильовича («Замовник») і доцент кафедри технології ліків Запорізького державного медичного університету («Виконавець») з іншої сторони склали цей Акт про те, що Замовник прийняв від виконавця:

- блок-схеми та технологічні інструкції для отримання назального гелю з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$  (IL-1ra);
- проект методики контролю якості для опрацювання їх в дос'є.

Зазначені документи передані в повному об'ємі, зауважень до їх відтворюваності немає.

« 16 » 02. 2021

« 16 » 02. 2021

  
Бурлака Б.С.

  
Руденко А. В.



## Додаток Ж.4

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**  
Руденко А. В.  
« 16 » 02 2019 р.

**АКТ АПРОБАЦІЇ В ПРОМИСЛОВЕ ВИРОБНИЦТВО**

Зазначений акт складений, в зв'язку з успішною апробацією ТОВ «МОБІЛЬ МЕДІКАЛ» технології виробництва назального гелю з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), перевірено відтворення методик технологічного регламенту, та апробовано методики контролю якості.

Генеральний директор  
ТОВ «МОБІЛЬ МЕДІКАЛ»



Руденко А. В.



## Додаток 3.1

**“ЗАТВЕРДЖУЮ”**  
 В.о. ректора Одеського національного  
 медичного університету  
 д.мед.н., професор  
 Вастьянов Р.С.




02 2021 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Методологічні аспекти розробки назальних лікарських форм церебропротективної дії.
2. **Установа, її адреса, виконавець:** Запорізький державний медичний університет, м.Запоріжжя, Маяковського 26, кафедри технології ліків, фармакології та медичної рецептури, докторант Бурлака Б.С.
3. **Джерело інформації:**
  - 1) Belenichev I.F Management of amnestic and behavioral disorders after ketamine anesthesia / Belenichev I., Burlaka B., Puzyrenko A., Ryzhenko O., Kurochkin M., Yusuf J. // Georgian medical news. – 2019. – No10. – P. 141-145.
  - 2) Burlaka B.S. Neuroprotective properties of n-phenylacetyl-l-prolylglycine ethyl ester nasal gel in an experimental model of multiple sclerosis equivalent / Burlaka B.S., Belenichev I.F., Nefedov O.O., Aliyeva O.G., Bukhtiyarova N.V. // Медичні перспективи. – 2020. - №4. – С. 31-38.
4. **Де і коли впроваджено:** Одеський національний медичний університет, кафедра фармакології та фармакогнозії. Протокол №3 від “ 10 ” 01. 2021р.
5. **Термін впровадження:** навчальні семестри 2020/2021 років.
6. **Ефективність впровадження:** Результати наукових досліджень впроваджені в учбовий процес кафедри фармакології та фармакогнозії та сприяли поглибленню знань з питання ноотропних засобів та лікарських препаратів, що поліпшують мозковий кровообіг.
7. **Зауваження, пропозиції:** немає

Відповідальний за впровадження:


 проф. Антоненко П.Б.

 Зав. кафедри фармакології та фармакогнозії,  
 д.мед.н., професор


 Рожковський Я.В.



## Додаток 3.2

**“ЗАТВЕРДЖУЮ”**  
 Директор ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ»  
 чл.-кор. НАМНУ Бухтіарова Т.А.  
 «26» 01 2021 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

**1. Назва пропозиції для впровадження:** Методологічні аспекти розробки назальних лікарських форм церебропротективної дії.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** Запорізький державний медичний університет, Маяковського 26, кафедри технології ліків, фармакології та медичної рецептури, докторант Бурлака Б.С.

**3. Джерела інформації:**

1. Belenichev I.F Management of amnestic and behavioral disorders after ketamine anesthesia / Belenichev I., Burlaka B., Puzyrenko A., Ryzhenko O., Kurochkin M., Yusuf J. // Georgian medical news.- No 10 (294) 2019.- P. 141-145
2. Igor Belenichev Neuroprotective properties of intranasal drug ARIL(IL-1b antagonist) at animals with cognitive deficit, caused by ketamine anesthesia /Igor Belenichev, Bogdan Burlaka // 5th World Congress & Expo on Pharmaceutics & Drug Delivery Systems Theme: Implementing Major Initiative Studies for the Development of Pharmaceutical Community Date : February 10-11, 2020 Venue : Lisbon, Portugal. – P.39
3. Burlaka B.S. Neuroprotective properties of n-phenylacetyl-l-prolylglycine ethyl ester nasal gel in an experimental model of multiple sclerosis equivalent // Burlaka B.S., Belenichev I.F., Nefedov O.O., Aliyeva O.G.,Bukhtiyarova N.V./ Медичні перспективи. 2020. №4. – С. 31-38

**4. Де впроваджено:** Відділ медичної хімії.

**5. Форма впровадження:** науково-педагогічний процес.

**6. Термін впровадження:** з 26.01.2021

**7. Ефективність впровадження:**

Показники	За даними	
	Розробників	Установи, що впроваджує
Ефективність впровадження	Методологічні аспекти розробки назальних лікарських форм церебропротективної дії на прикладі нової інтраназальної форми препарату ноопепт /етилловий ефір N-фенілацетил-L-пролілгліцину)	Використання розробки показала, що (відповідає критеріям наведеним у джерелі інформації. Результати наукових досліджень використовуватимуться студентами-практикантами у відділі Медичної хімії

Обговорено та затверджено на засіданні відділу Медичної хімії ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України. Протокол №1 від 26.01.2021

**8. Зауваження та пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження: В.о. зав. Відділом Медичної хімії д.б.н. Ядловський О.С.  
 протокол № 1 від 26.01 2021 р.

В.о. зав.відділом медичної хімії, д.б.н.



Ядловський О.С.

## Додаток 3.3

**“ЗАТВЕРДЖУЮ”**  
заступник директора з наукової  
роботи  
Фізико-хімічного інституту  
ім. О.В. Богатського НАН України,  
д.б.н., професор І.І. Романовська

« 25.01.2021 » \_\_\_\_\_ 2021 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

**1. Назва пропозиції для впровадження:** “Методологічні аспекти розробки назальних лікарських форм церебропротективної дії.”

**2. Установа, її адреса, виконавці:** Запорізький державний медичний університет, Маяковського 26, кафедри технології ліків, фармакології та медичної рецептури, докторант Бурлака Б.С.

**3. Джерела інформації:**

1. Belenichev I.F Management of amnestic and behavioral disorders after ketamine anesthesia / Belenichev I., Burlaka B., Puzyrenko A., Ryzhenko O., Kurochkin M., Yusuf J. // Georgian medical news.- No 10 (294) 2019.- P. 141-145
2. Burlaka B.S. Neuroprotective properties of n-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester nasal gel in an experimental model of multiple sclerosis equivalent // Burlaka B.S., Belenichev I.F., Nefedov O.O., Aliyeva O.G., Bukhtiyarova N.V./ Медичні перспективи. 2020. №4. – С. 31-38

**4. Де впроваджено:** лабораторія фізико-хімічної фармакології відділу медичної хімії

**5. Форма впровадження:** науково-педагогічний процес.

**6. Термін впровадження:** \_\_\_\_\_

**7. Ефективність впровадження:**

Показники	За даними	
	розробників	установи, що впроваджує
<i>Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям наведеним у джерелі інформації</i>		
<i>Результати наукових досліджень використовуються у роботі лабораторії при проведенні скринінгу активності нових біологічно активних сполук, для прогнозування ефекту нейроактивних сполук при різних шляхах введення.</i>		

Обговорено та затверджено на засіданні лабораторії, протокол № 1 від 25.01.2021 року.

**8. Зауваження та пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач лабораторії фізико-хімічної фармакології,  
д.б.н.

протокол № 1 від 25.01.2021 р.



Ларіонов В.Б.

## Додаток 3.4

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Перший проректор  
Державного закладу  
«Дніпропетровська медична академія  
Міністерства охорони здоров'я  
України»  
професор І.С. Шпонька



« 18 » січня 2021 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Методологічні аспекти розробки назальних лікарських форм церебропротективної дії.

2. **Установа, її адреса, виконавці:** Запорізький державний медичний університет, Маяковського 26, кафедри технології ліків, фармакології та медичної рецептури, докторант Бурлака Б.С.

3. **Джерела інформації:**

1. Belenichev I.F Management of amnestic and behavioral disorders after ketamine anesthesia / Belenichev I., Burlaka B., Puzyrenko A., Ryzhenko O., Kurochkin M., Yusuf J. // Georgian medical news.- No 10 (294), 2019. - P. 141-145
2. Burlaka B.S. Neuroprotective properties of n-phenylacetyl-l-prolylglycine ethyl ester nasal gel in an experimental model of multiple sclerosis equivalent / Burlaka B.S., Belenichev I.F., Nefedov O.O., Aliyeva O.G., Bukhtiyarova N.V. // Медичні перспективи. 2020. №4. – С. 31-38

4. **Де впроваджено:** кафедра загальної та клінічної фармації Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України»

5. **Форма впровадження:** науково-педагогічний процес.

6. **Термін впровадження:** 2021-2023 рр.

7. **Ефективність впровадження:**

Показники	За даними	
	розробників	установи, що впроваджує
Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям наведеним у джерелі інформації. Результати наукових досліджень використовуються студентами на кафедрі загальної та клінічної фармації		

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри загальної та клінічної фармації

8. **Зауваження та пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:

Н.В. Логвиненко

Зав. кафедри загальної та клінічної фармації  
ДЗ «ДМА МОЗ України»  
д.фарм.н. професор

О.А. Подплетня

протокол № 5 від 18 січня 2021 р.



## Додаток 3.5

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Перший проректор  
з науково-педагогічної роботи  
Львівського національного медичного  
університету імені Данила Галицького  
чл.-кор. НАМН України,  
д.мед.н., проф. Гжегоцький М.Р.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Методологічні аспекти розробки назальних лікарських форм церебропротективної дії.

2. **Установа, її адреса, виконавці:** Запорізький державний медичний університет, Маяковського 26, кафедри: технології ліків, фармакології та медичної рецептури, докторант Б.С. Бурлака.

3. **Джерела інформації:**

1. Обґрунтування вибору допоміжних речовин для створення інтраназального гелю рецепторного антагоніста інтерлейкіна-1 $\beta$  (IL-1ra) / Б.С. Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладішев, Е.В. Супрун, Г.П. Лисянська, *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2020. Т.13. №2 (33). С. 254-259.
2. Бурлака Б.С., Беленічев І.Ф., Гладішев В.В. Термогравіметричні дослідження інтраназальної форми ноопепту. *Фармацевтичний журнал*. 2019. Т.74. №6. С. 54-61.
3. Бурлака Б.С., Беленічев І.Ф., Гладішев В.В. Дослідження впливу поверхнево-активних речовин на вивільнення ноопепту з назальної лікарської форми. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2020. Т.13. №1 (32). С. 105-108.

4. **Де впроваджено:** кафедра технології ліків і біофармації Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

5. **Форма впровадження:** в навчальний процес при вивченні теми «Назальні лікарські засоби».

6. **Термін впровадження:** листопад 2020 р. – січень 2021 р.

7. **Ефективність впровадження:**

Показники	За даними	
	розробників	установи, що впроваджує
Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям наведеним у джерелі інформації. Результати наукових досліджень використовуються студентами на кафедрі технології ліків і біофармації		

Відповідальні за впровадження:

Доцент кафедри технології ліків і біофармації,  
кандидат фармацевтичних наук

Ващенко К.Ф.

Завідувач кафедри технології ліків і біофармації,  
доктор фармацевтичних наук, доцент

Білоус С.Б.

## Додаток 3.6



1. **Назва пропозиції для впровадження:** Методологічні аспекти розробки назальних лікарських форм церебропротективної дії.

2. **Установа, її адреса, виконавці:** Запорізький державний медичний університет, Маяковського 26, кафедри: технології ліків, фармакології та медичної рецептури, докторант Бурлака Б.С.

3. **Джерела інформації:**

1. Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір п-фенілацетил-1-пролілгліцину в умовах аптеки / Б.С. Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладишев // Інформ. лист МОЗ України. - 2020. - Випуск з проблеми «Фармація». №70. -2020. - 4 с.

2. Бурлака Б.С. Термогравіметричні дослідження інтраназальної форми ноопепту // Б.С. Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладишев // Фармацевтичний журнал.- 2019.- Т. 74.- № 6.- С.54-61

3. Бурлака Б. С. Дослідження впливу поверхнево-активних речовин на вивільнення ноопепту з назальної лікарської форми/ Б.С. Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладишев // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики.- 2020. - Т. 13, № 1(32). - С. 105–108

4. **Впроваджено:** В навчальний процес кафедри з фармацевтичної технології і біофармації Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, у лекційний курс при вивченні теми «М'які лікарські форми».

5. **Термін впровадження:** 2020-2021 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 використовуються студентами на кафедрі фармацевтичної технології і біофармації		

Відповідальний за впровадження:  
Завідувач кафедри фармацевтичної технології  
і біофармації НМАПО імені П.Л. Шупика,  
доктор фармацевтичних наук, професор

Л. Л. Давтян

## Додаток 3.7

**ЗАТВЕРДЖУЮ»**  
 Проректор  
 з наукової роботи  
 Національного медичного університету  
 імені О.О. Богомольця,  
 д.мед.н., проф. Земсков



«16» 02 2021 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

**1. Назва пропозиції для впровадження:** Методологічні аспекти розробки назальних лікарських форм церебропротективної дії.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** Запорізький державний медичний університет, Маяковського 26, кафедри: технології ліків, фармакології та медичної рецептури, докторант Бурлака Б.С.

**3. Джерела інформації:**

1. Бурлака Б.С., Беленічев І.Ф., Гладішев В.В., Супрун Е. В., Лисянська Г.П. Обґрунтування вибору допоміжних речовин для створення інтраназального гелю рецепторного антагоніста інтерлейкіна-1 $\beta$  (IL-1ra) // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. - 2020. - Т. 13. - №2(33). - С. 254-259
2. Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір п-фенілацетил-1-пролілгліцину в умовах аптеки / Б.С. Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладішев // Інформ. лист МОЗ України. - 2020. - Випуск з проблеми «Фармація». №70. -2020. – 4 с.

**4. Впроваджено:** в навчальний процес кафедри аптечної та промислової технології ліків при вивченні тем з промислової технології ліків «Рідкі лікарські форми», «згідно протоколу № 3 засідання кафедри від 15 лютого 2021 року.

**5. Термін впровадження:** 2020 – 2021 н.р.

**6. Ефективність впровадження:** Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведених у джерелах інформації. Результати наукових досліджень включено в навчальний процес кафедри.

**7. Зауваження:** немає.

**Завідувачка кафедри аптечної та промислової технології ліків,**

**д.фарм.н., професор**

Відповідальний за навчально-методичну роботу

кафедри, к.фарм.н.

Відповідальний за впровадження, к.фарм.н.



**Ж.М. Полова**

Т.С. Негода

Н.О. Козіко



## Додаток 3.8

**“ЗАТВЕРДЖУЮ”**  
 Проректор з наукової роботи  
 Тернопільського національного медичного  
 університету імені І.Я. Горбачевського  
 Проф. І.М. Кліщ

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 р.


**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Методологічні аспекти розробки назальних лікарських форм церебропротективної дії.

2. **Установа, її адреса, виконавці:** Запорізький державний медичний університет, Маяковського 26, кафедри: технології ліків, фармакології та медичної рецептури, докторант Бурлака Б.С.

3. **Джерела інформації:**

- Бурлака Б.С. Цінові характеристики вітчизняного фармацевтичного ринку лікарських засобів групи N06BX / Б.С. Бурлака, І.Ф. Бєленічев, Н.М. Сінча, К.А. Сінча, А.І. Зедан Фаді // Управління, економіка та забезпечення якості в фармацевції 2020. - №4. С. 66-73
- Бурлака Б.С. Термогравіметричні дослідження інтраназальної форми поопетту / Б.С. Бурлака, І.Ф. Бєленічев, В.В. Гладішев // Фармацевтичний журнал. - 2019. - Т. 74. - № 6. - С.54-61
- Бурлака Б.С. Маркетингові дослідження вітчизняного ринку інтраназальних лікарських засобів / Б.С. Бурлака, Н. М. Червоненко, І. Ф. Бєленічев // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. - 2016. - № 3. - С. 87-90.

4. **Де впроваджено:** кафедра управління та економіки фармацевції з технологією ліків

5. **Форма впровадження:** науково-педагогічний процес.

6. **Термін впровадження:** 2020-2021 н.р.

7. **Ефективність впровадження:**

Показники	За даними	
	розробників	установи, що впроваджує
Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям наведеним у джерелі інформації		
Результати наукових досліджень використовуються у навчальному процесі для студентів та у науковому - магістрами та молодими науковцями на кафедрі управління та економіки фармацевції з технологією ліків		

8. **Зауваження та пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри управління та економіки фармацевції  
 з технологією ліків ТНМУ ім. І.Я. Горбачевського,  
 доктор фармацевтичних наук, професор



Т. А. Грошовий

## Додаток 3.9

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Методологічні аспекти розробки назальних лікарських форм церебропротективної дії.

2. **Установа, її адреса, виконавці:** Запорізький державний медичний університет, Маяковського 26, кафедри: технології ліків, фармакології та медичної рецептури, докторант Бурлака Б.С.

3. **Джерела інформації:**

1. Бурлака Б.С., Беленічев І.Ф., Гладішев В.В., Супрун Е. В., Лисянська Г.П. Обґрунтування вибору допоміжних речовин для створення інтраназального гелю рецепторного антагоніста інтерлейкіна-1 $\beta$  (IL-1ra) // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики.- 2020. - Т. 13. - №2(33). - С. 254-259
2. Бурлака Б. С. Дослідження впливу поверхнево-активних речовин на вивільнення проопепту з назальної лікарської форми/ Б.С. Бурлака, І.Ф. Беленічев, В.В. Гладішев // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики.- 2020. - Т. 13, № 1(32). - С. 105–108

4. **Де впроваджено:** кафедра технологій фармацевтичних препаратів

5. **Форма впровадження:** науково-педагогічний процес.

6. **Термін впровадження:** з лютого 2021 року.

7. **Ефективність впровадження:**

Показники	За даними	
	розробників	установи, що впроваджують
<i>Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям наведеним у джерелі інформації</i>		
<i>Результати наукових досліджень використовуються студентами на кафедрі технологій фармацевтичних препаратів</i>		

8. **Зауваження та пропозиції:** немає.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри:  
 протокол № \_\_\_\_\_ від « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020\_р.

**Відповідальний за впровадження:**  
 Завідувач кафедри технологій фармацевтичних препаратів  
 Національного фармацевтичного університету  
 доктор фармацевтичних наук, доцент

  
 Олександр КУХТЕНКО



## Додаток 3.10

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з наукової роботи  
Запорізького державного медичного  
університету д. мед. н., професор  
Туманський В.О.



2021 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Методологічні аспекти розробки назальних лікарських форм церебропротективної дії.

2. **Установа, її адреса, виконавці:** Запорізький державний медичний університет, Маяковського 26, кафедри: технології ліків, фармакології та медичної рецептури, докторант Бурлака Б.С.

3. **Джерела інформації:**

- Бурлака Б.С. Оптимізація складу назального лікарського засобу з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$ . *Фармацевтичний журнал*. 2021. №1. С. 43-49.
- Бурлака Б.С. Термогравіметричні дослідження назального засобу з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$  (IL-1ra). *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2021. № 1. С. 56-63.
- Дослідження впливу полісорбату-80 на біофармацевтичні та реологічні властивості назальної лікарської форми з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$  (IL-1Ra) / Б.С Бурлака., І.Ф Беленічев., Ал Зедан Фаді, Е. В. Супрун *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. №1(15). С. 49-54.

4. **Де впроваджено:** кафедра управління і економіки фармації та фармацевтичної технології

5. **Форма впровадження:** науково-педагогічний процес

6. **Термін впровадження:** протягом 2021 року

**Ефективність впровадження:** Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям наведеним у джерелі інформації. Результати наукових досліджень використовуються провізорами-інтернами та слухачами передатестаційних курсів удосконалення кваліфікації на кафедрі управління і економіки фармації та фармацевтичної технології.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри управління і економіки фармації та фармацевтичної технології  
протокол № 3 від 12.06.2021 р.

4. **Зауваження та пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження:  
завідувачка кафедри управління і економіки фармації  
та фармацевтичної технології, д. фарм. н., професор

І.В. Бушуєва

## Додаток И

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

1. Бурлака Б. С. Використання сучасного програмного забезпечення в систематизації літературних даних по інтраназальним лікарським засобам. *Фармацевтичний часопис*. 2015. № 1. С. 29-31.

2. Бурлака Б. С. Перспективи створення нового інтраназального лікарського засобу на основі природної сировини для комплексної терапії алергічних ринітів. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2015. № 1. С. 35-37.

3. Бурлака Б. С., Червоненко Н. М., Беленічев І. Ф. Маркетингові дослідження вітчизняного ринку інтраназальних лікарських засобів. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2016. № 3. С. 87-90. (Особистий внесок: формулювання мети, проведення літературного пошуку, аналіз отриманих даних, узагальнення результатів, оформлення статті).

4. Бурлака Б. С., Беленічев І. Ф., Гладишев В. В. Вивчення впливу допоміжних речовин на вивільнення ноопепту з назальної лікарської форми. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2019. Т. 12. № 3 (31). С. 304-308. (Особистий внесок: участь у постановці завдань дослідження, проведення експериментальних досліджень, аналіз отриманих даних, написання статті).

5. Бурлака Б. С., Беленічев І. Ф., Гладишев В. В. Термогравіметричні дослідження інтраназальної форми ноопепту. *Фармацевтичний журнал*. 2019. Т. 74. № 6. С. 54-61. (Особистий внесок: участь у постановці завдань дослідження, проведення експериментальних досліджень, аналіз отриманих даних, написання статті).

6. Розробка методики спектрофотометричного визначення рекомбінантного рецепторного антагоніста інтерлейкіну-1 людини в напівфабрикаті-розчині / К. П. Мєведєва, Б. С. Бурлака, В. В. Бугайова,

## Продовж. дод. И

С. О. Васюк, І. Ф. Беленічев, Е. В. Супрун. *Фармацевтичний часопис*. 2019. № 4. С. 29-36. (Особистий внесок: участь у постановці завдань та експериментальних дослідженнях, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

7. Бурлака Б. С., Беленічев І. Ф., Гладишев В. В. Дослідження впливу поверхнево-активних речовин на вивільнення ноопепту з назальної лікарської форми. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2020. Т. 13. № 1 (32). С. 105-108. (Особистий внесок: участь у постановці завдань дослідження, проведення експериментальних досліджень, аналіз отриманих даних, написання статті).

8. Обґрунтування вибору допоміжних речовин для створення інтраназального гелю рецепторного антагоніста інтерлейкіна-1 $\beta$  (IL-1ra) / Б. С. Бурлака, І. Ф. Беленічев, В. В. Гладишев, Е. В. Супрун, Г. П. Лисянська. *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2020. Т. 13. № 2 (33). С. 254-259. (Особистий внесок: участь у постановці завдань дослідження, проведення експериментальних досліджень, аналіз отриманих даних, написання статті).

9. Аналіз вітчизняного фармацевтичного ринку психостимулюючих та ноотропних засобів групи N06BX / Б. С. Бурлака, І. Ф. Беленічев, Н. М. Сінча, К. А. Сінча, Ал Зедан Фаді. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2020. № 3. С. 68-74. (Особистий внесок: участь у постановці завдань та експериментальних дослідженнях, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

10. Цінові характеристики вітчизняного фармацевтичного ринку лікарських засобів групи N06BX / Б. С. Бурлака, І. Ф. Беленічев, Н. М. Сінча, К. А. Сінча, Ал Зедан Фаді. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2020. № 4. С. 66-73. (Особистий внесок: участь у постановці завдань

## Продовж. дод. И

та експериментальних дослідженнях, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

11. Бурлака Б. С. Оптимізація складу назального лікарського засобу з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$ . *Фармацевтичний журнал*. 2021. № 1. С. 43-49.

12. Бурлака Б. С. Термогравіметричні дослідження назального засобу з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$  (IL-1ra). *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2021. № 1. С. 56-63.

13. Дослідження впливу полісорбату-80 на біофармацевтичні та реологічні властивості назальної лікарської форми з антагоністом інтерлейкіну-1  $\beta$  (IL-1Ra) / Б. С. Бурлака., І. Ф. Беленічев, Ал Зедан Фаді, Е. В. Супрун. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. № 1 (15). С. 49-54. (Особистий внесок: участь у постановці завдань, проведення літературного пошуку та експериментальних досліджень, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

14. Burlaka B. S., Bielenichev I. F. A study on toxicity, local irritative effect of and allergic response to a novel intranasal medication containing N-phenylacetyl-L-propylglycine ethyl ester. *Запорожский медицинский журнал*. 2021. № 1. С. 126-131. (Особистий внесок: участь у постановці завдань та експериментальних дослідженнях, концепція та дизайн дослідження, приготування тест-зразків, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

15. Antypenko L., Burlaka B., Belenichev I. Noopept: Development and validation of UV-VIS Spectrophotometric method for the quantification of (s)-N-phenylacetyl-1-propylglycine ethyl ester in bulk drugs substance. *Pharmakeftiki*. 2016. Vol. 28 (4):161. P. 161-169. (Особистий внесок: участь у постановці завдань дослідження, проведення літературного пошуку, приготування тест-зразків, концепція та дизайн дослідження, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

## Продовж. дод. И

16. Management of amnestic and behavioral disorders after ketamine anesthesia / I. Belenichev, B. Burlaka, A. Puzyrenko, O. Ryzhenko, M. Kurochkin, J. Yusuf. *Georgian medical news*. 2019. № 10 (294). P. 141-145. (Особистий внесок: участь у постановці завдань дослідження, приготування тест-зразків, концепція та дизайн дослідження, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

17. Neuroprotective properties of n-phenylacetyl-l-prolylglycine ethyl ester nasal gel in an experimental model of multiple sclerosis equivalent / B.S. Burlaka, I. F. Belenichev, O. O. Nefedov, O. G. Aliyeva, N. V. Bukhtiyarova. *Медичні перспективи*. 2020. № 4. С. 31-38. (Особистий внесок: участь у постановці завдань та експериментальних дослідженнях, концепція та дизайн дослідження, приготування тест-зразків, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

18. Burlaka B. S., Belenichev I. F. A study on acute toxicity, local irritative effect of and allergic response to a novel intranasal medication containing the interleukin- 1 $\beta$  receptor antagonist (il-1ra). *Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine (scientific Journal)*. 2020. Vol. 4 (1). P. 20-23. (Особистий внесок: участь у постановці завдань та експериментальних дослідженнях, концепція та дизайн дослідження, приготування тест-зразків, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

19. The concentration of hsp70 in the cytosol and mitochondria of the brain in animals with experimental autoimmune encephalo-myelitis and after the time course of intranasally administered n-phenylacetyl-l-prolylglycine ethyl ester (noopept) / B. Burlaka, I. Belenichev, I. Samura, N. Bukhtiyarova. *Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine (scientific Journal)*. 2020. Vol. 4 (2). P. 34-38. (Особистий внесок: участь у постановці завдань та експериментальних дослідженнях, концепція та дизайн дослідження, приготування тест-зразків,

## Продовж. дод. И

проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

20. Morpho-functional parameters of neurons in the sensorimotor cortex and neuroapoptosis under conditions of an induced experimental allergic encephalomyelitis in rats and a course of intranasal gel administration containing n-phenylacetyl-l-prolylglycine (Noopept) / Burlaka B. S., Bielenichev I. F., Nosach S. G., Nefedov A. A. *Journal of Education, Health and Sport*. 2021. Vol. 11 (1). P. 191-201. (Особистий внесок: участь у постановці завдань та експериментальних дослідженнях, концепція та дизайн дослідження, приготування тест-зразків, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

21. Pharmacological Correction of Thiol-Disulphide Imbalance in the Rat Brain By Intranasal form of Il-1b Antagonist in a Model of Chronic Cerebral Ischemia / I. F. Belenichev, B. S. Burlaka, N. V. Bukhtiyarova, E. G. Aliyeva, E. V. Suprun, A. M. Ishchenko, A. S. Simbirtsev. *Neurochemical Journal*. 2021. Vol. 15. №. 1. P. 30-36. (Особистий внесок: участь у постановці завдань та експериментальних дослідженнях, концепція та дизайн дослідження, приготування тест-зразків, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

22. Цитокінова терапія в комплексному лікуванні цереброваскулярних захворювань: стан, перспективи досліджень / Е. В. Супрун, І. С. Чекман, І. Ф. Беленічев, Н. О. Горчакова, А. С. Свінціцький, М. І. Загородній, Б. С. Бурлака. *Раціональна фармакотерапія*. 2017. № 1 (42). С.19-30. (Особистий внесок: участь у постановці завдань дослідження, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих даних, участь у написанні статті).

23. Спосіб фармакологічної корекції порушень когнітивних функцій центральної нервової системи і психоемоційної сфери після кетамінової анестезії в експерименті : пат. 126979 України, МПК 2018.01 А61К9//00 А61К

## Продовж. дод. И

31//00. Беленічев І. Ф., Курочкін М. Ю., Риженко О. І., Бурлака Б. С., Бухтіярова Н. В. № 126979 ; заявл. 19.02.18, опубл. 10.07.18, Бюл. № 13. 4 с. (Особистий внесок: розробка складу і технології назального гелю, підготовка формули й опису до патенту).

24. Назальний лікарський засіб ноотропної дії : пат. 141924 України, МПК: А61К 9/00, А61К 31/00. Бурлака Б. С., Беленічев І. Ф. № 141924 ; заявл. 10.02.20, опубл. 27.04.20, Бюл. № 8. 4 с. (Особистий внесок: розробка складу і технології назального гелю, підготовка формули й опису до патенту).

25. Бурлака Б. С. Перспективи розробки інтраназальних лікарських форм нейропротективної дії. *Сучасні аспекти медицини і фармації – 2014* : збірник тез всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів з міжнар. участю, 15-16 трав. 2014 р. Запоріжжя, 2014. С. 164.

26. Бурлака Б. С., Беленічев І. Ф., Гладишев В. В. Створення інтраназального лікарського засобу церебропротективної дії з похідним гліцин. *V Національний з'їзд фармакологів України* : тези доповідей, 18-20 жовтня 2017 р. Запоріжжя, 2017. С. 12. (Особистий внесок: формулювання мети, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих результатів, підготовка тез до публікації).

27. Antypenko L. M., Burlaka B. S., Belenichev I. F. Noopept: development and validation of uv-spectrophotometric. *Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів* : матеріали I Міжнар. наук.-практ. конф., 30-31 берез. 2017 р. Х. : НфаУ, 2017. Т. 2. С. 6. (Особистий внесок: формулювання мети, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих результатів, підготовка тез до публікації).

28. Беленічев І. Ф. Ковальчук Д. А., Бурлака Б. С. Нейропротективні ефекти інтраназальної форми антагоніста іІ-1b. *Актуальні питання сучасної медицини і фармації (до 50-річчя заснування ЗДМУ)* : тези доповідей, 18-25 квіт. 2018 р. Запоріжжя, 2018. С. 5. (Особистий внесок: формулювання мети,

## Продовж. дод. И

проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих результатів, підготовка тез до публікації).

29. Igor Belenichev, Bogdan Burlaka. Neuroprotective properties of intranasal drug ARIL(IL-1b antagonist) at animals with cognitive deficit, caused by ketamine anesthesia. *5th World Congress & Expo on Pharmaceutics & Drug Delivery Systems Theme : Implementing Major Initiative Studies for the Development of Pharmaceutical Community*, 2020. Venue : Lisbon, Portugal, 2020. P. 39. (Особистий внесок: формулювання мети, проведення літературного пошуку, узагальнення отриманих результатів, підготовка тез до публікації).

30. Бурлака Богдан. Опрацювання фармацевтичних факторів до створення алгоритмічного підходу в методології розробки назальних форм системної дії. *XXIV Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених the 24th international medical congress of students and young scientists* : матеріали конгресу, 12-14 квіт. 2021 р. Т., 2021. С. 189.

31. Бурлака Б. С., Беленічев І. Ф., Гладишев В. В. Виготовлення інтраназального гелю з діючою речовиною етиловий ефір n-фенілацетил-І-пролілгліцину в умовах аптеки. *Інформаційний лист про нововведення в сфері охорони здоров'я*. К. : Укрмедпатентінформ, 2020. Випуск з проблеми «Фармація», № 70. 4 с. (Особистий внесок: узагальнення даних і написання інформаційного листа).



## Додаток К

## АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. XXIV Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених (м. Тернопіль, 2021, форма участі – публікація тез).
2. 5th World Congress & Expo on Pharmaceutics & Drug Delivery Systems Theme: Implementing Major Initiative Studies for the Development of Pharmaceutical Community (Lisbon, Portugal, 2020, форма участі – публікація тез).
3. Актуальні питання сучасної медицини і фармації (до 50-річчя заснування ЗДМУ) (м. Запоріжжя, 2018, форма участі – публікація тез).
4. Ліки – людині. «Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (м. Харків, 2017, форма участі – публікація тез).
5. V національний з'їзд фармакологів України (м. Запоріжжя, 2017); Сучасні аспекти медицини і фармації (м. Запоріжжя, 2014, форма участі – публікація тез).