

Бркич Лилиана Любановна

**РАЗРАБОТКА СОСТАВА И ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ
КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ
ХИТОЗАНСОДЕРЖАЩИХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ**

14.04.01 – Технология получения лекарств

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Москва – 2020

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор

Пятигорская Наталья Валерьевна

Официальные оппоненты:

Сливкин Алексей Иванович – доктор фармацевтических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», кафедра фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета, заведующий кафедрой

Гузев Константин Сергеевич – доктор фармацевтических наук, ЗАО Фармацевтическое научно-производственное предприятие «Ретиноиды» г. Москва, уполномоченное лицо

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России)

Защита диссертации состоится «__» _____ 2020 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.040.09 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д.13.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский б-р., д. 37/1 и на сайте организации: www.sechenov.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 208.040.09

доктор фармацевтических наук,
профессор

Дёмина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Целью Стратегии национальной безопасности Российской Федерации, утвержденной Указом Президента Российской Федерации от 31.12.2015 г. № 683 «О Стратегии национальной безопасности Российской Федерации» и «Стратегии инновационного развития Российской Федерации на период до 2020 года», утвержденной распоряжением Правительства Российской Федерации от 08.12.2011 г. № 2227-р, является переход к 2020 году экономики Российской Федерации на инновационный путь развития. Фармацевтическая и медицинская промышленность входят в 5 приоритетных направлений высокотехнологичного развития российской экономики, включая прикладную науку и инженерию. Задачей Государственной программы Российской Федерации «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности», утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 15.04.2014 № 305 является вывод на рынок инновационных лекарственных средств (ЛС), выпускаемых отечественной фармацевтической промышленностью.

Лечение инфицированных ран остается важной проблемой в ежедневной хирургической практике. Одним из направлений поиска эффективного способа лечения таких ран является разработка комбинированных лекарственных препаратов (ЛП) мультифункционального действия для наружного применения, содержащих в своем составе несколько лекарственных компонентов, обладающих комплексной терапевтической активностью в отношении основных субстратов сложной, длительно незаживающей раны.

Фармацевтическая композиция на основе двух инновационных хитозансодержащих субстанций: комплекс хитозан-химопсин (ХтХ) и комплекс хитозан-мирамистин (ХтМ), для лечения инфицированных ран в лекарственной форме (ЛФ) гель для наружного применения обладает четырьмя видами фармакологических эффектов – некролитическим, антимикробным, ранозаживляющим и обезболивающим. Комплекс ХтХ обеспечивает пролонгированное протеолитическое действие фермента, восстанавливает микроциркуляцию в стенках раны, улучшает обменные процессы и снимает местное воспаление. Комплекс ХтМ обладает выраженным бактерицидным действием в отношении аэробных и анаэробных бактерий, грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, как в виде монокультур, так и в виде ассоциаций, включая госпитальные штаммы, обладающие полирезистентностью к антибиотикам.

ЛП «Гель ранозаживляющий» обладает косвенным обезболивающим эффектом благодаря охлаждающему эффекту при аппликации на поврежденную поверхность. В процессе патентного поиска было подтверждено, что не существует зарубежных и российских объектов техники аналогичных по составу разрабатываемым технологиям.

Комбинированный ЛП на основе хитозансодержащих фармацевтических субстанций (ФС) обладает патентной чистотой и является патентоспособным в соответствии с имеющимся уровнем новизны и изобретательности, а его разработка является актуальной задачей фармацевтической науки.

Степень разработанности темы исследования. На основании изучения данных базы патентов Российской Федерации и зарубежных патентных ведомств, российской и иностранной научной литературы было установлено, что отсутствует информация о разработке состава и технологии получения инновационного комбинированного ЛП с комплексной терапевтической активностью на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров, содержащего комплексы соединений ХтХ и ХтМ.

В Институте трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России был впервые разработан, теоретически и экспериментально обоснован рациональный состав и оптимальная технологическая схема получения ЛП на основе хитозансодержащих ФС, ставших объектами настоящего исследования.

Цель и задачи исследования. Целью исследования является научно-обоснованная разработка состава и технологии получения, комбинированного ЛП для наружного применения на основе инновационных хитозансодержащих ФС для лечения инфицированных ран различного генеза.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Провести сравнительный анализ современной номенклатуры средств, используемых для лечения инфицированных ран различного генеза.
2. Разработать и обосновать состав комбинированного ЛП для наружного применения на основе инновационных хитозансодержащих ФС.
3. Разработать технологию получения ЛП для наружного применения «Гель ранозаживляющий».
4. Разработать методики контроля качества ЛП «Гель ранозаживляющий».
5. Провести исследование стабильности ЛП «Гель ранозаживляющий».
6. Разработать проект нормативной документации (НД) и опытно-промышленный регламент (ОПР) на ЛП для наружного применения «Гель ранозаживляющий».

Научная новизна. С использованием экспериментальных методов разработан инновационный комбинированный ЛП на основе комплекса ХтХ и комплекса ХтМ, которые были впервые использованы в качестве ФС для получения готовой лекарственной формы (ГЛФ). Впервые проведена фармацевтическая разработка: выбран состав,

разработана технология получения, разработаны методики анализа, изучена стабильность ЛП на основе инновационных субстанций в ГЛФ.

Научная новизна проведенных исследований подтверждена тремя патентами: Патент РФ № RU 2691144 С1. «Комбинированная композиция для лечения инфицированных ран различного генеза»; Патент РФ № RU 2687102 С1. «Фармацевтическая субстанция для лечения инфицированных ран различного генеза»; Патент РФ № RU 2697869 С1. «Фармацевтическая субстанция для лечения инфицированных ран различного генеза».

Теоретическая и практическая значимость работы. В результате проведенных исследований обоснована перспективность использования инновационного комбинированного ЛП – гель для наружного применения, содержащего в своем составе в качестве действующих веществ (ДВ) комплексы ХтХ и ХтМ.

В результате проведенных исследований разработан состав и технология получения инновационного ЛП – гель для наружного применения. Проведена апробация технологии получения и методик контроля качества мягкой ЛФ на ООО «Тульская фармацевтическая фабрика». Результаты исследований вошли в комплексный отчет о проделанной работе в рамках Государственного контракта от 30.09.2016 г. № 14. N08.11.0113 по теме «Доклинические исследования лекарственного средства с комплексной терапевтической активностью на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров для лечения инфицированных ран различного генеза».

Основные положения, выносимые на защиту:

- результаты исследований по выбору и обоснованию вспомогательных веществ (ВВ) для получения ЛФ гель для наружного применения;
- результаты исследования по определению пространства проектных параметров при разработке технологии получения ГЛФ для наружного применения;
- результаты по разработке методик контроля качества ЛП;
- результаты по разработке технологии получения ЛП;
- результаты изучения стабильности ЛП.

Методология и методы исследования. Методологическую основу исследований составили труды российских ученых в области разработки научных основ получения ЛС на основе высокомолекулярных соединений И.И. Краснюка, С.А. Кедика, Н.Б. Деминой, Н.Д. Бунятян, А.И. Сливкина, М.В. Погорелова, Е.О. Медушевой, А.А. Белова, В.Л.Лапенко, О.А.Сафонова, С.Н.Суслиной и др.

В работе использованы фармакопейные методы, включенные в Государственную Фармакопею Российской Федерации, требования Приказа Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении правил надлежащей производственной практики»,

Решение Совета ЕЭК от 03 ноября 2016 года № 77 «Об утверждении правил Надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза», Решение Коллегии ЕЭК от 10.05.2018 № 69 «Об утверждении Требований к исследованию стабильности лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций». Также были учтены рекомендации, представленные в руководствах под редакцией В.В. Береговых: «Валидация аналитических методик для производителей лекарств. ВЭЖХ, ТСХ, титрование и ГЖХ. Обоснование референтных стандартов. Тесты пригодности системы, перенос методов, ревалидация» и «Валидация в производстве лекарственных средств».

Основными методами исследования, которые использованы в работе, являются: литературный поиск, контент-анализ, патентный поиск, статистические методы, методы технологического контроля, методы анализа ЛС, фармацевтико-технологические испытания на ЛФ, методы планирования и проведения валидации.

Достоверность научных положений и выводов. Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментального материала, однородностью выборки объектов эксперимента, применением современных методов исследования и сертифицированного оборудования, валидацией разработанных методик, применением методов математической статистики, теоретическим обоснованием полученных экспериментальных данных.

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертационной работе, обоснованы, достоверны и логично вытекают из полученных автором данных. При проведении экспериментальной работы использовано сертифицированное современное оборудование, методами статистической обработки установлена воспроизводимость и правильность результатов исследований, что позволяет считать их достоверными.

Апробация результатов исследования. Основные положения работы и результаты исследования доложены на конференциях: Biocatalysis-2017: Fundamentals & Applications (25-30 июня 2017г., Москва, Россия); Bionanotox 2017 – 8th International Conference «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues» (7-14 мая 2017 г., Ираклион, Греция); XIV Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии (30 октября – 2 ноября 2018 г., Москва); Конференция «Актуальные аспекты химической технологии биологически активных веществ» (25 мая 2018 г., Москва).

Апробация результатов диссертации состоялась на межкафедральной конференции кафедры фармацевтической технологии Института фармации, кафедры промышленной фармации Института профессионального образования и Центра фармацевтических

технологий Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 10 от 06.06.2019 года.

Личный вклад автора. Автору принадлежит ведущая роль в постановке задач и их реализации в экспериментальной части. Автором лично проведены исследования технологических характеристик инновационных ФС, проведена разработка состава и технологии ГЛФ. Научные результаты, обобщенные в диссертационной работе, получены автором самостоятельно и внедрены в практику.

Внедрение результатов исследования. Научно-практические результаты исследования – ОПР на производство (Акт внедрения № 35 от 18.12.2017 г.) и методики контроля качества (Акт внедрения № 17 от 23.09.2017 г.) на ЛП «Гель ранозаживляющий» внедрены в работу ООО «Тульская фармацевтическая фабрика»; результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре фармацевтической технологии Института фармации (Акт внедрения № 12 от 27.09.2019 г.); получены 3 патента РФ на изобретения.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.01 – Технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 3 и 4 паспорта специальности «Технология получения лекарств».

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки. Диссертационная работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 г. и дальнейшую перспективу» по Государственному контракту от 30.09.2016 г. № 14. N08.11.0113 на проведение прикладных научных исследований и экспериментальных разработок по теме «Доклинические исследования лекарственного средства с комплексной терапевтической активностью на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров для лечения инфицированных ран различного генеза». Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и является фрагментом исследования по теме «Развитие научных и научно-методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств» (номер государственной регистрации 01201261653).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауке России и 7

статей в журналах, индексируемых в международных базах, данных Scopus и Web of Science, 3 патента РФ на изобретения.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 190 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), выводов, списка литературы, приложений. Работа иллюстрирована 27 таблицами, 25 рисунками и 3 формулами. Библиографический указатель включает 156 источников, из них 42 на иностранных языках.

В приложениях вынесены патенты, титульный лист ОПР получения ЛП «Гель ранозаживляющий», Акт внедрения ОПР получения ЛП «Гель ранозаживляющий», Акт внедрения методик контроля качества ЛП «Гель ранозаживляющий», Акт внедрения научных результатов в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии, результаты изучения механизма действия ЛП, выдержка из отчета о доклинических исследованиях ЛС, проект нормативной документации на ЛП «Гель ранозаживляющий», проект инструкции по медицинскому применению на ЛП «Гель ранозаживляющий».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований. Объектами исследования являлись ФС комплекса ХтХ и ФС комплекса ХтМ, разработанные в Центре фармацевтических технологий Института трансляционной медицины ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Комплекс ХтХ представляет собой комбинированную ФС ферментного препарата протеолитического действия – химопсина и высокомолекулярного полисахарида природного происхождения – хитозана (Хт) кислоторастворимого. Комплекс ХтМ представляет собой ФС, содержащую в качестве ДВ антибактериальный препарат мирамистин. Ферментный препарат химопсин и антибактериальный препарат мирамистин иммобилизованы в структуру Хт за счет образования водородных связей и сил Ван-дер-Ваальса. В качестве местного анестетика был использован Лидокаина гидрохлорид («Дж. Амфрейлабораториз», Индия).

В качестве ВВ были использованы: гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) (Methocel K4M Premium CR, ID34680, производства Colorcon Limited, England), полиакриламид (ПАА) для медицинского применения (ООО НТФ «Атомбиотех», Россия), глицерин (ЗАО «Аист», Россия) для придания эластичности системе и вода очищенная (Система водоподготовки KLS 8/60, KLS 12/60, Германия).

Оценку показателей качества ГЛФ проводили согласно ГФ РФ ОФС.1.4.1.0008.18 «Мази», рН водного извлечения определяли методике, приведенной в ГФ РФ. Агрегативную устойчивость гелей определяли методом центрифугирования по величине

коэффициента кинетической стабильности. Реологические свойства ГЛФ «Гель ранозаживляющий» определяли на ротационном вискозиметре (Rheotest RN4.1, Германия) с программным обеспечением в измерительной системе типа «цилиндр в цилиндре» ms din 33 и ms din 11 (объем ячейки 17 и 32 мл соответственно), при температуре (20 ± 1) °С, в диапазоне изменения градиента скорости сдвига от 5 до 300 с^{-1} . Эффективная вязкость должна быть в интервале от 0,70 до 1,20 Па·с. Динамическую вязкость изучали по системе «малый сдвиг-большой сдвиг-малый сдвиг» в двух диапазонах скоростей сдвига от 0 до 10 с^{-1} и от 0 до 300 с^{-1} . Аналитические диапазоны скоростей сдвига рассчитывались по средним градиентам скоростей сдвига, соответствующим условиям производства и применения ЛП.

Определение подлинности ГЛФ «Гель ранозаживляющий» по химопсину определяли по створаживающему действию на растворы молока. Основное оборудование: термостат с прозрачными стенками (ТПС, СлавМедТехника, Россия). Время створаживания химопсина для ЛС должно быть не более 50 сек. Протеолитическую активность ГЛФ «Гель ранозаживляющий», активным компонентом которого является комплекс ХтХ, определяли гидролизом ферментным препаратом казеина по Гаммерстону до пептидов и аминокислот с последующим их определением. Основное оборудование: UV-Vis-спектрофотометр (Shimadzu UV-2600, Япония) с термостатируемой кинетической ячейкой (ТСС-240А), ИК-Фурье спектрометр (Nicolet 380, Thermo Scientific, США). Протеолитическая активность геля должна быть не меньше $(2,0 \pm 0,5)$ ПЕ/г геля.

Для определения антимикробного действия мирамистина использовалась культура *Staphylococcus aureus*, которая преобладает в микрофлоре инфицированной раневой поверхности. Подсчет клеток микроорганизмов производился по методу Коха ($\text{КОЕ} = 1,8 \cdot 10^{10}$ кл/мл). Исследование было проведено методом «колодцев». После чего была проведена оценка, критерием которой являлась зона задержки роста микрофлоры: до 10 мм или ее отсутствие – микроорганизмы не чувствительны к препарату; 11-15 мм – обладали малой чувствительностью и более 15 мм чувствительные штаммы.

Также был проведен эксперимент с использованием 96-луночного планшета. В питательную среду (L бульон) вносили инокулят культуры и инкубировали на термостатируемом шейкере (Thermo-Shaker PST-60HI-4, BioSan, Россия) при 350 об/мин, при $37 \pm 0,5$ °С в течение 24 часов. Полученную культуру клеток разбавляли в 1000 раз. В лунки планшета вносили 20 мкл культуры, 80 мкл стерильной питательной среды (L бульон) и 100 мкл препарата. Через каждые 2 часа проводили измерения оптической плотности при длине волны 505 нм на фотометре для микропланшетов (i Mark, Bio-Rad Lab. Inc., США) в течение 48 часов.

Для изучения характеристик поверхности геля был использован атомно-силовой микроскоп Ntegra Prima (NT-MDT, Россия), который был оснащен сканером и кремниевым кантелевером HA-NC Etalon (длина консоли 124 мкм, силовая константа 3,5 Н/м, резонансная частота 140 кГц, радиус закругления иглы менее 10 нм в соответствии с производственной спецификацией).

Качественное и количественное определение мирамистина и лидокаина в ГЛФ проводили методом ВЭЖХ. Основное оборудование: Хроматограф жидкостный (Agilent, США) снабженный УФ-детектором (MWD, зав. № DE64256455; DAD, зав. № DE64262550); колонка из нержавеющей стали размером 150 x 4,6 мм, заполненная сорбентом C18 (Zorbax Eclipse XDB-C18, Agilent, США), с размером частиц 5 мкм или аналогичная. Содержание мирамистина в ГЛФ от 95 до 105% от заявленного количества. Содержание лидокаина в ГЛФ от 95 до 105% от заявленного количества. При валидации методик были определены следующие показатели: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, повторяемость.

Результаты исследований

Целью исследования была разработка комбинированного ЛП в форме геля для наружного применения с комплексной протеолитической, антимикробной и регенерирующей активностью для местной терапии инфицированных ран различного генеза, купирующего болевой синдром и способствующего процессу регенерации.

В рамках выполняемой диссертационной работы в соответствии с международными требованиями и подходами были изучены следующие элементы фармацевтической разработки: компоненты ЛП (ФС, ВВ); ЛП (разработка ЛФ, физико-химические свойства (контроль качества), разработка технологического процесса), микробиологические характеристики. На первом этапе исследования проводили изучение физико-химических свойств ФС комплекса ХтХ и ФС комплекса ХтМ. Исходя из НД субстанций, эмпирическим путем было рассчитано количество ФС в составе ГЛФ. В комплексе ХтХ необходимая протеолитическая активность соответствует 2,0% химопсина в 100,0 г субстанции. Количество мирамистина в ГЛФ было установлено из результатов микробиологических исследований и составило 0,5% на 100,0 г.

Основа для мягкой ЛФ подбиралась с учетом технологических характеристик и будущего применения ЛП: составные части основы геля должны быть совместимы, не вызывать раздражающего действия, способствовать максимальному высвобождению ДВ, обеспечивать легкость нанесения и фасуемость геля, а также обеспечивать стабильность в течение срока годности. Время нахождения геля на поврежденной поверхности составляет, в среднем, одни сутки и в значительной степени зависит от следующих факторов:

температуры тела, рН среды, состояния раны. Обычно рН раны составляет 6,2 с увеличением ацидоза в случае инфицированной раны до 5,6, в то время как рН неповрежденной кожи от 3,8 до 5,6. Вязкость раневого отделяемого инфицированной раны составляет 0,6-0,8 Па·с и обусловлена наличием детрита, представляющего собой разрушенные эндогенными протеазами компоненты внеклеточного матрикса. В ходе реализации исследований по формированию целевого профиля качества осуществляли экспериментально-обоснованный выбор ВВ гелеобразователей, являющихся модификаторами вязкости в ГЛФ, и обладающих оптимальными характеристиками. В процессе разработки ГЛФ были исследованы растворы следующих веществ: 1-2% натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы; 1-2% метилгидроксиэтилцеллюлозы; от 0,5 до 6,0% ГПМЦ. Полученные растворы были исследованы по показателю вязкости.

На основании полученных данных была проведена оценка зависимости вязкости исследуемых растворов от их концентрации (табл. 1). Растворы ГПМЦ в концентрации 1 и 2%, наиболее подходили для последующих экспериментов, так как вязкость данных растворов лежала в диапазоне от 0,6 до 1,0 Па·с, то есть приближалась к значениям вязкости раневого отделяемого (экссудата). Растворы ГПМЦ других концентраций также были выбраны для последующих экспериментов, при изучении гелеобразующих свойств с другими компонентами основы.

Таблица 1 – Вязкость исследуемых растворов производных целлюлозы

Растворы натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы							
Концентрация, %	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	-	-	-	-	-
Вязкость, Па·с	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1	-	-	-	-	-
Растворы метилгидроксиэтилцеллюлозы							
Концентрация, %	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	-	-	-	-	-
Вязкость, Па·с	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	-	-	-	-	-
Растворы ГПМЦ							
Концентрация, %	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	4,0 ± 0,1	5,0 ± 0,1	6,0 ± 0,1
Вязкость, Па·с	0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,1	2,7 ± 0,1	3,2 ± 0,1

Исходя из свойств системы «раневого дефект/раневого отделяемого», для моделирования поведения разрабатываемого ЛП была разработана подложка (раневого дефект) и среды (раневого отделяемого) из искусственных материалов. Поведение ЛП в такой системе характеризуется следующими параметрами: моделированием раневой поверхности; осмотической активностью; взаимодействием модельного отделяемого с такими компонентами, как Хт, ПАА, глицерин.

Для проведения экспериментов на основании реологических характеристик и значения рН была разработана модель раны, воспроизводящая раневые условия *in vitro*. Также была смоделирована поверхность, имитирующая поверхность раневого дефекта,

полученная на основе ПАА. На чашках Петри были получены тонкие пленки ПАА из растворов различных концентраций. Для устранения хрупкости и ломкости пленок добавляли небольшое количество глицерина (не более 5,0 г на 100,0 г раствора). В целях изучения процесса моделирования раневой поверхности на пленку наносились капли ГПМЦ различных концентраций, которые сохраняли ровные контуры и не растекались.

Нами было исследовано взаимодействие модельного отделяемого с гидрофильными соединениями на примере воды, глицерина и Хт. Аналогично проводили эксперимент по взаимодействию раствора 1 и 2% ГПМЦ с раствором Хт. Было обнаружено, что добавление Хт в виде гелевого раствора в соотношении 1:1 приводило к образованию устойчивой однородной гелевой системы. Затем добавляли глицерин в количестве от 2 до 5%, что не нарушало устойчивости и однородности системы. Для исследования совместимости ДВ разрабатываемого геля с основами готовили образцы основ и вводили растворы компонентов в индивидуальном порядке в основу.

В ходе разработки состава и технологии основы геля были получены 9 экспериментальных образцов, которые представляли собой гелевую матричную многокомпонентную основу из производных целлюлозы, Хт и производных акриловой кислоты, с различными концентрациями.

В ходе проведенных исследований было обнаружено влияние модификаторов вязкости на биофармацевтические характеристики ГЛФ, что связано с различным строением производных целлюлозы, длиной полимерных цепей и, как следствие, различной плотностью образующихся полимерных гелевых структур (табл. 2). Были выбраны интактные полимеры – ГПМЦ и ПАА. Так как Хт является составной частью ФС, то необходимо было изучить его гелеобразующие свойства при исследовании свойств других основы.

Таблица 2 – Составы образцов геля (г)

Образцы	ГПМЦ	ПАА	Хт	Глицерин	Вода, до
Образец 1	4,00	0,20	1,00	4,00	100,00
Образец 2	3,50	0,20	1,00	4,50	100,00
Образец 3	3,00	0,20	1,00	5,00	100,00
Образец 4	2,50	0,10	1,00	5,00	100,00
Образец 5	3,50	0,20	2,00	4,50	100,00
Образец 6	2,00	0,10	2,00	5,00	100,00
Образец 7	1,00	0,10	1,00	5,00	100,00
Образец 8	0,75	0,10	1,00	5,00	100,00
Образец 9	0,50	0,10	1,00	5,00	100,00

Для изучения реологических характеристик образцов ГЛФ строили кривые вязкости и течения, а также определяли предел текучести и вязкость по реологической модели Кэссона. Наиболее наглядно тиксотропный эффект наблюдался в условиях циклических сдвиговых деформаций «малый сдвиг – большой сдвиг – малый сдвиг», когда структура

материала сначала разрушается на нисходящей ветви зависимости, а затем восстанавливается на восходящей части цикла, образуя так называемую «петлю гистерезиса». Динамическую вязкость образцов ГЛФ на основе 1 и 2% ГПМЦ изучали при температуре (20 ± 1) °С в диапазоне градиента скоростей сдвига от 5 до 300 c^{-1} . Все исследуемые образцы обладали высокой степенью тиксотропии. Но значения динамической вязкости образцов ГЛФ на основе 2% ГПМЦ, более чем в 5 раз превосходили аналогичные параметры образцов ГЛФ на основе 1% ГПМЦ.

Тиксотропный эффект их был более выраженным и достигал почти исходного значения вязкости при изменении градиента скорости сдвига 5 до 300 c^{-1} . На объединенном графическом изображении реограмм образцов ГЛФ (рис. 1) наглядно продемонстрировано преимущество реологических свойств образцов ГЛФ на основе 2% ГПМЦ.

По кривым течения экспериментальных образцов можно достоверно судить о типе течения и косвенно – о пределе текучести. Были проведены эксперименты по изучению поведения образцов ГЛФ при изменении градиента скорости сдвига в широком диапазоне от 5,0 до 1000 c^{-1} и получены графики зависимости напряжения сдвига от градиента скорости сдвига (рис. 2).

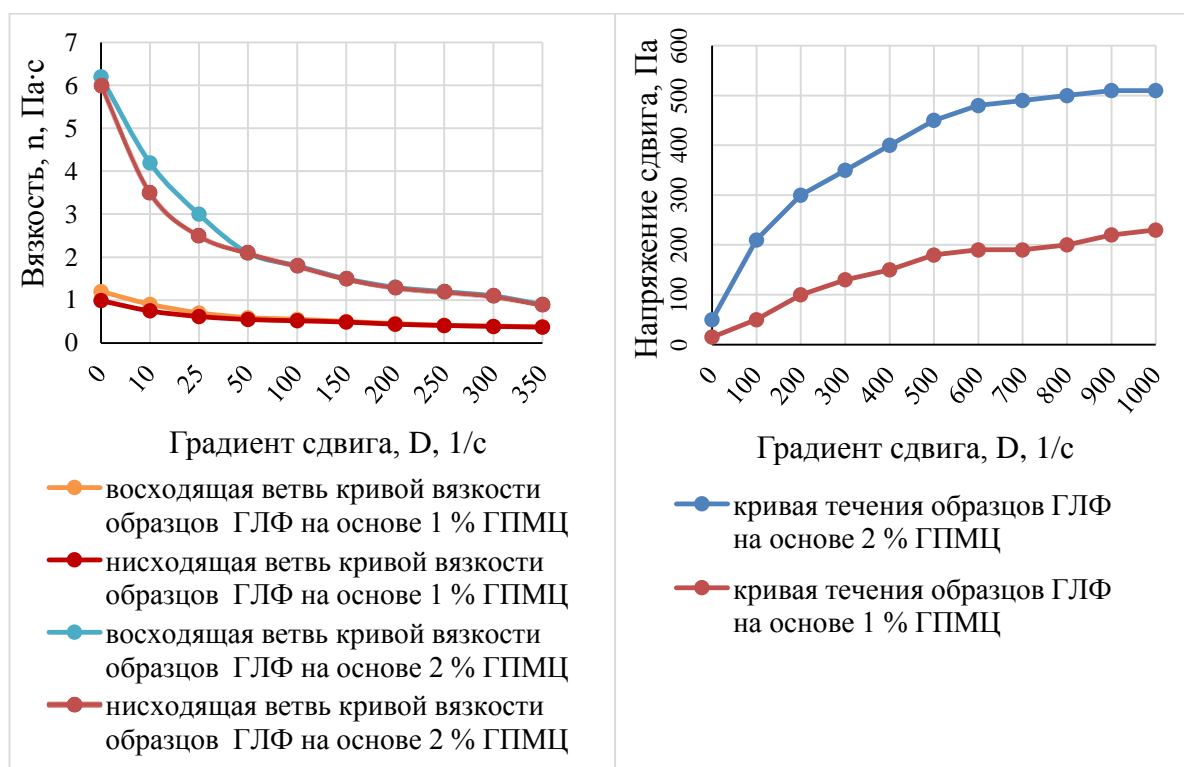


Рисунок 1 – Зависимость вязкости ГЛФ от градиента скорости сдвига

Кривые течения ГЛФ

Рисунок 2 – Кривые течения ГЛФ на основе 1% и 2% ГПМЦ

Все исследуемые образцы обладали псевдопластическим, неньютоновским типом течения, но образцы ГЛФ на основе 2% ГПМЦ имели величину пластической вязкости в 2,5

раза, а предел текучести в 1,5 раза больше, чем образцы ГЛФ на основе 1% ГПМЦ. Введение лидокаина в композицию не приводило к изменению вязкости системы.

Для изучения осмотической активности образцов №№ 1-9 использовали модифицированный метод Гунько В.Г., основанный на диализе через полупроницаемую мембрану. В качестве полупроницаемой мембраны была использована повязка плёночная OPSITE FLEXIGRID 10x12 см (Smith&Nephew, Великобритания). Эксперимент вели до установления постоянной массы исследуемой системы. В качестве контроля использовали гипертонический 13% раствор натрия хлорида.

Предельную величину набухания оценивали одновременно с процессом набухания и процессом растворения полимерных композиций. В качестве среды, в которой происходило набухание полимеров, были выбраны следующие модельные варианты: фосфатный буфер рН 7,0, 1 М – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4$ в качестве модели крови человека, так как соответствует рН 7,0 крови человека; фосфатный буфер рН 6,0, 1 М – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4$ в качестве модели раны рН 6,0; дистиллированная вода.

Из проведенных экспериментов было видно, что наиболее активно процесс набухания пленки из ГПМЦ происходил в период от 2 до 30 мин, затем набухание на протяжении некоторого времени (от 30 до 45 мин) существенно не менялось, а затем начиналась деструкция и растворение полимера (рис. 3–7). Изменение рН среды в более кислую область, увеличивало степень набухания полимеров.

Присутствие ГПМЦ увеличивало набухание, а присутствие Хт – время растворения пленки, изготовленной из смеси этих полимеров. Через некоторое время, после начала растворения пленки происходило высвобождение ДВ из смеси этих полимеров, что приводило к быстрому высвобождению терапевтической дозы ЛС.

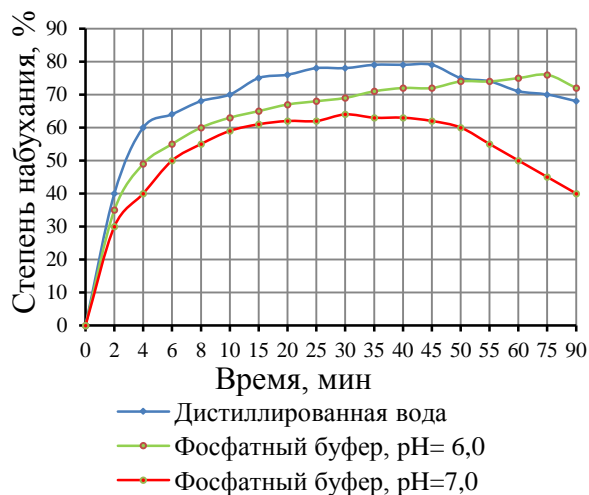


Рисунок 3 – Кинетические кривые набухания пленки 2% ГПМЦ

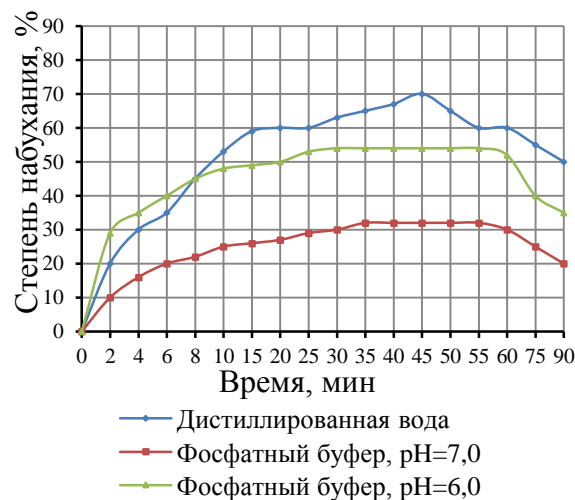


Рисунок 4 – Кинетические кривые набухания пленки Хт

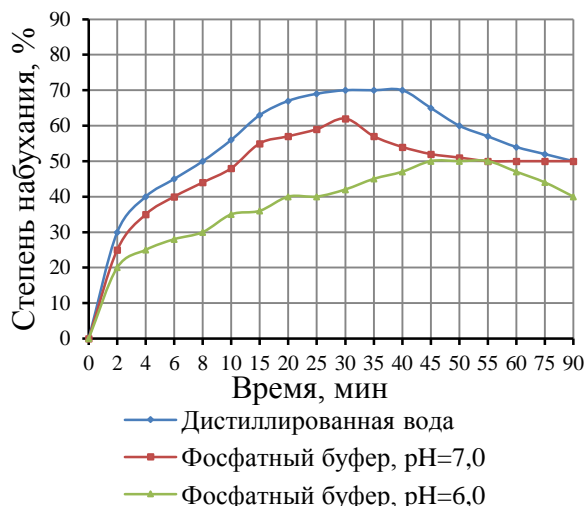


Рисунок 5 – Кинетические кривые набухания пленки из ПАА

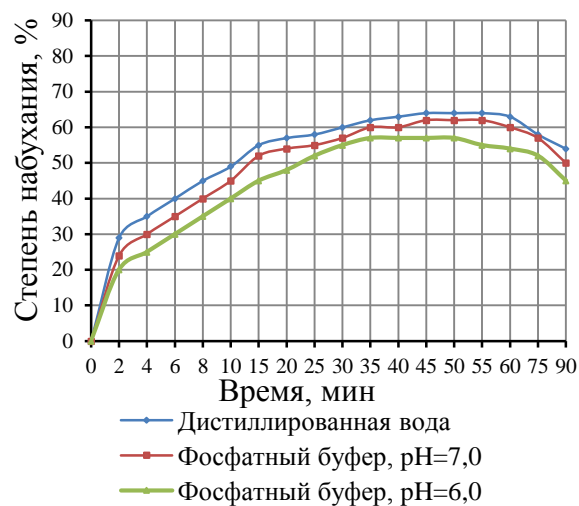


Рисунок 6 – Кинетические кривые набухания пленок из полимеров ГПМЦ и ПАА

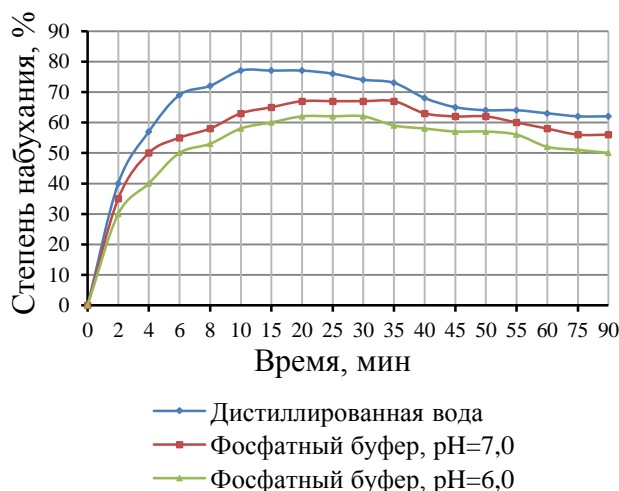


Рисунок 7 – Кинетические кривые набухания пленок из полимеров ГПМЦ и Хт

Пространство проектных параметров, определенное по общей области эффективных рабочих диапазонов для вязкости и набухания представлено на рисунке 8 и 9.

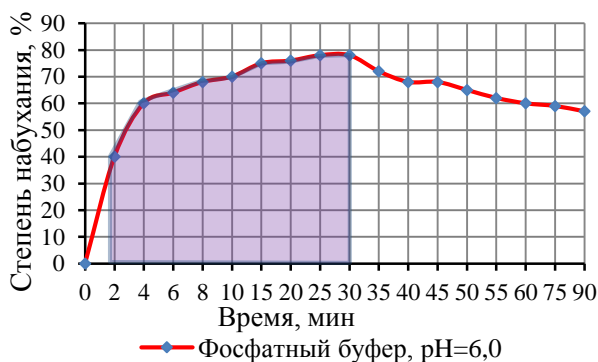


Рисунок 8 – Кинетическая кривая набухания пленки полимера; Проектное поле

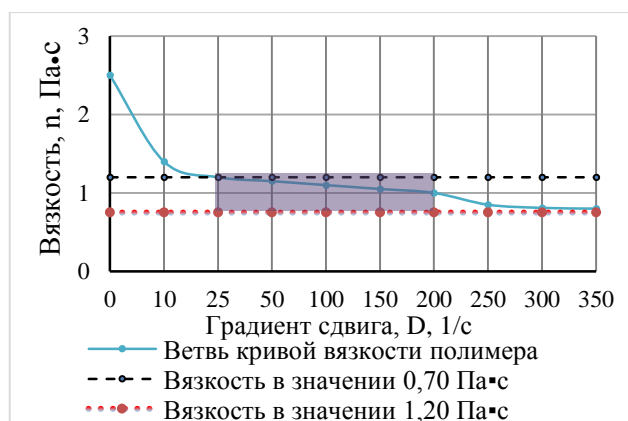


Рисунок 9 – Кривая вязкости от градиента скорости сдвига; Проектное поле

На основании полученных данных, был сделан вывод о целесообразности применения изучаемых пленок полимеров и их смесей для применения в необходимых концентрациях и с возможными полимерными композициями из ГПМЦ и Хт с небольшим количеством ПАА.

Для дальнейших исследований и разработки технологии получения геля был выбран образец № 6 (состав образца представлен в табл. 3), на основе 2% ГПМЦ, как наиболее полно отвечающий заявленным требованиям – пластическая вязкость образца ГЛФ на основе 2% ГПМЦ составила 1,0 Па·с предел текучести 25,2 Па·с.

Таблица 3 – Состав разработанного препарата на 100 г

Состав	Масса, г
Химопсин	0,20
Мирамистин	0,05
Лидокаин	0,10
Хитозан	2,00
Полиакриламид	0,10
Гидроксипропилметилцеллюлоза	2,00
Глицерин	5,00
Вода очищенная	до 100,00

На следующем этапе методом атомно-силовой микроскопии, выполненной на АСМ NT-MDT (рис.10-13), для определения однородности ГЛФ были проведены дополнительные исследования ФС с целью изучения изменения поверхности самого Хт, его комплексов и тройной композиции на его основе, с учетом того, чтобы далее в технологическом процессе объединить обе полученные субстанции, а уже затем включать их в основу геля ГЛФ.

Исследования методом АСМ выполнены для четырех образцов пленок: «Хт»; «хитозан+химопсин»; «хитозан+мирамистин»; «хитозан+химопсин+мирамистин».

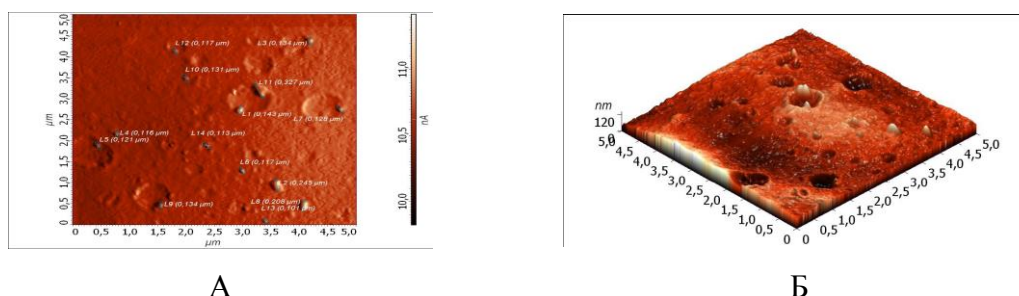
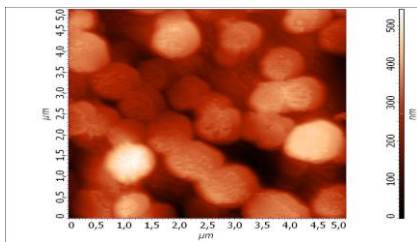
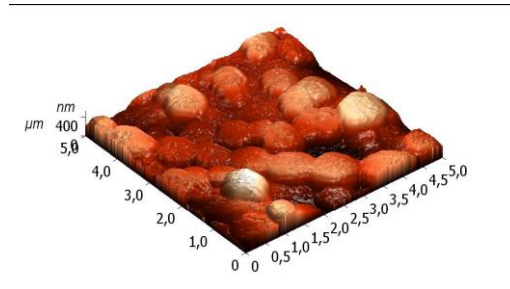


Рисунок 10 – А. АСМ образца «Хт» 5х5 мкм;
Б. 3D АСМ образца «Хт» 5х5 мкм

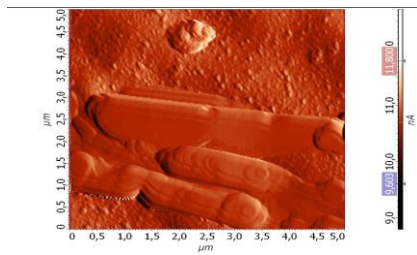


А

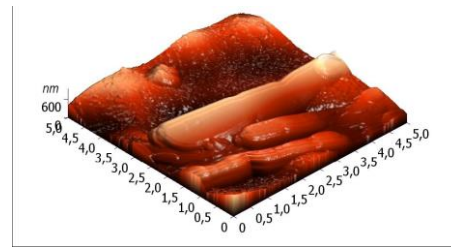


Б

Рисунок 11 – А. АСМ образца «хитозан+химопсин» 5х5 мкм;
Б. 3D АСМ образца «хитозан+химопсин» 5х5 мкм

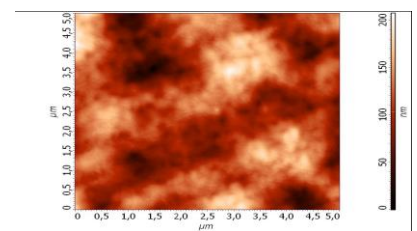


А

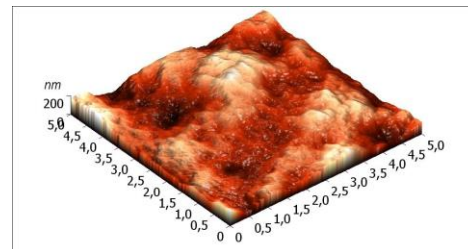


Б

Рисунок 12 – А. АСМ образца «хитозан+мирамистин» 5х5 мкм;
Б. 3D АСМ образца «хитозан+мирамистин» 5х5 мкм



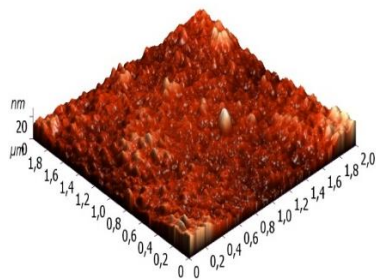
А



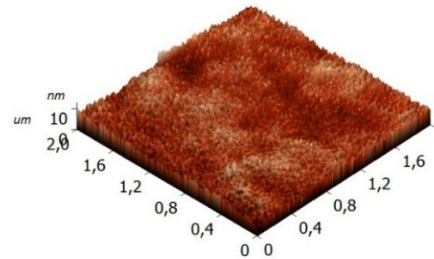
Б

Рисунок 13 – А. АСМ образца «хитозан+химопсин+мирамистин» 5х5 мкм;
Б. 3D АСМ образца «хитозан+химопсин+мирамистин» 5х5 мкм

При наличии глицерина в составе смеси в Хт происходит упорядочивание структуры, и наблюдается отсутствие конгломератов Хт (рис. 14).



А



Б

Рисунок 14 – А. 3D АСМ «Хт»;
Б. 3D АСМ Хт с глицерином

Поскольку очищение раневой поверхности от гнойно-некротических масс, происходит благодаря протеолитической активности химопсина, в работе была изучена кинетика выхода протеиназ из геля.

При изучении кинетики выхода навеска геля заливалась 1 М фосфатным буферным раствором рН-6,2 при гидромодуле 1:50 или 1:100 и через определенные промежутки времени определяли протеолитическую активность раствора. Через 2 часа определяли 100% ферментативную активность геля.

При дальнейшей инкубации (до 24 часов), как при 25 °С, так и при 37 °С активность в пределах погрешности определения не менялась.

Высвобождение мирамистина из ГЛФ определяли по антимикробной активности, изучая ингибирующее действие препарата на микробную культуру посредством посева на агаризованную питательную среду (L агар) методом «колодцев» с последующим измерением зоны задержки роста. Также был проведен эксперимент с использованием 96-луночного планшета.

Технология получения ГЛФ «Гель ранозаживляющий»

Получение ГЛФ начинали с подготовки ДВ и основы. В операцию подготовки входил процесс взвешивания сырья и материалов, и процесс растворения и набухания основы.

С целью получения раствора лидокаина в ПАА в реактор, с нагретой до температуры 60-65 °С водой очищенной при перемешивании, добавляли ПАА, оставляли настаиваться до набухания и структурирования полимерной массы, после чего прибавляли лидокаин. Полученную реакционную массу, периодически перемешивая, выдерживали при комнатной температуре до полного растворения лидокаина.

В производственную емкость с водой очищенной, предварительно подогретой до 60-65 °С, добавляли ГПМЦ и оставляли для набухания и исчезновения комочков, затем состав перемешивали в реакторе с пропеллерной мешалкой и подогревом (GR-10L., Greatwall Scientific, Китай) до получения гомогенной структуры.

После этого при постоянном перемешивании объединяли с ПАА с предварительно растворенным в нем анестетиком лидокаином.

Для получения водного раствора комплексов ХтХ и ХтМ в реактор при комнатной температуре заливали воду очищенную и добавляли лиофилизированный порошок ФС ХтХ. Реакционную массу перемешивали на магнитной мешалке до полного растворения ФС ХтХ и добавляли лиофилизированный порошок ФС ХтМ. Образовавшуюся массу перемешивали до полного растворения.

С целью получения ГЛФ объединяли полученную основу с водным раствором комплексов ХтХ и ХтМ, добавляли глицерин и полученную смесь подвергали гомогенизации в течение 10-15 минут при скорости 2000-3000 об/мин. (Смеситель-гомогенизатор APZRJ-20B, Китай). В результате получили реакционную массу в виде густой белой пены, которую выдерживали при комнатной температуре в течение 24 часов для удаления пузырьков воздуха (дегазации).

После дегазации смесь приобрела форму от бесцветного до слабо молочно-белого оттенка. Соблюдение установленных технологических режимов обеспечивалось в контрольных точках производства (технологическая схема получения ГЛФ «Гель ранозаживляющий» представлена на рис.15).

В качестве первичной упаковки ГЛФ «Гель ранозаживляющий» были выбраны тубы AVL с защитной мембраной и завинчивающейся полимерной крышкой, обладающие значительной химической инертностью, высокой прочностью и устойчивостью к перепадам температуры.

Тубы, вместимостью 30,0 г, наполняли с помощью тубонаполнительной машины (MIC Machinery R-30, Китай). Состав ГЛФ на одну тубу представлен в табл. 4.

Таблица 4 – Состав ГЛФ на одну тубу

Состав	Масса, г 30,000
Действующие вещества	
Комплекс ХтХ, в том числе:	0,450
химопсин	0,060
Комплекс ХтМ, в том числе:	0,420
мирамистин	0,015
Лидокаин	0,030
Вспомогательные вещества	
Гидроксипропилметилцеллюлоза	0,600
Полиакриламид	0,030
Глицерин	1,500
Вода	до 30,000

Оценку качества ГЛФ проводили в соответствии с разработанным проектом НД.

Для изучения стабильности в процессе хранения, полученную ГЛФ оценивали по показателям качества, представленным в спецификации.

На хранение закладывались три партии ГЛФ при температуре (20±5) °С; от 2 до 8 °С, при влажности от 45 до 60%. Через 2 года хранения при температуре от 2 до 8 °С было установлено, что образцы ГЛФ, полученные по опытно-промышленному регламенту (ОПР 71.05-2017 от 15.01.2017г.) по всем установленным в спецификации НД параметрам соответствуют предъявляемым к ним требованиям (табл.5).

Технологическая схема получения ГЛФ «Гель ранозаживляющий»

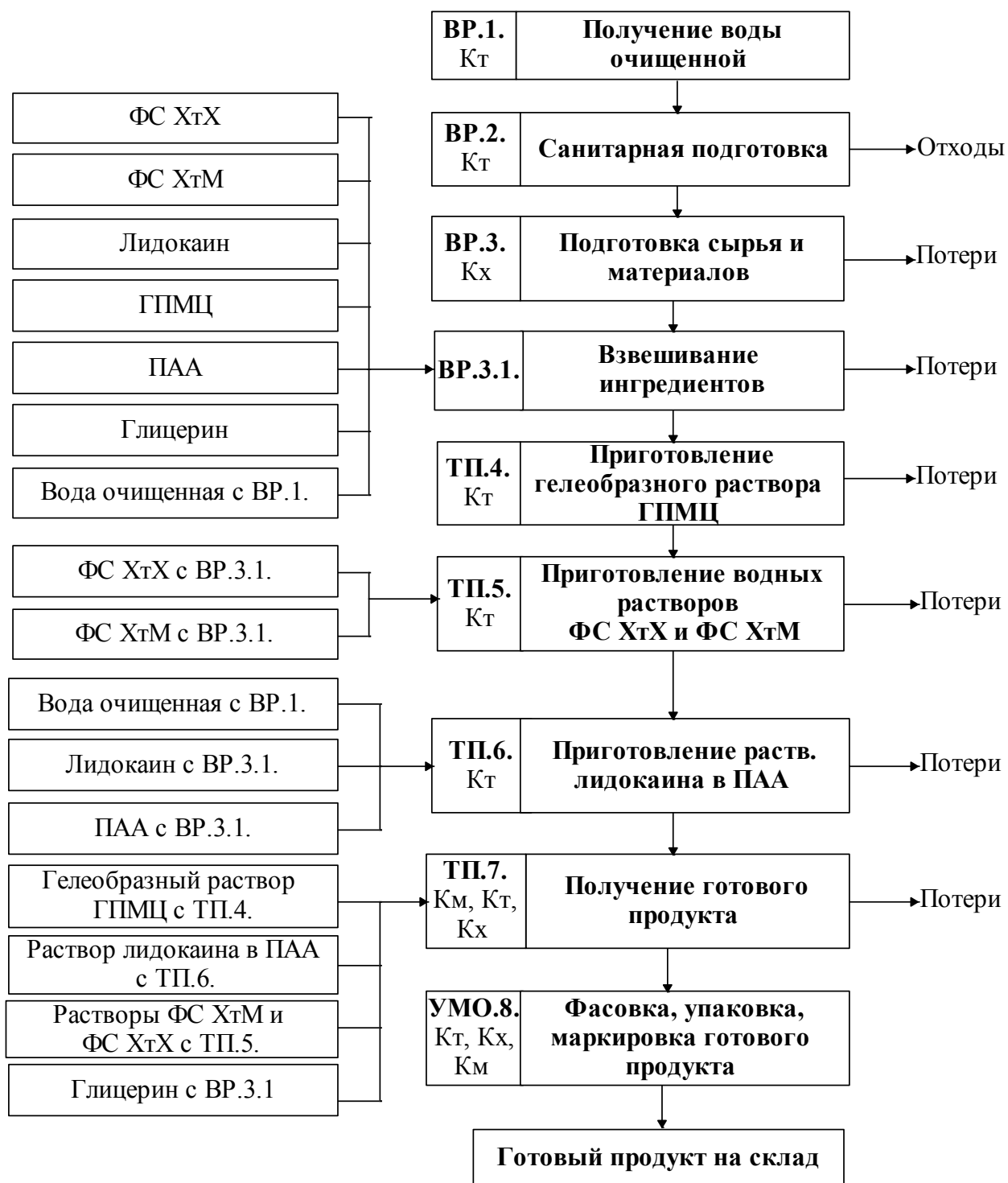


Рисунок 15 – Технологическая схема производства «Гель ранозаживляющий»

Таблица 5 – Спецификация качества ГЛФ «Гель ранозаживляющий»

Показатель	Метод	Норма
Описание	Визуальный Органолептический ГФ РФ ОФС.1.1.0001.18	Гомогенный гель от бесцветного до слабо молочно-белого цвета, без запаха
Подлинность Химопсин	А. Протеолитическая активность, спектрофотометрический метод Б. Качественная реакция на химопсин	Гель должен обладать протеолитической активностью Гель должен обладать способностью створаживать молоко за время не более 50 сек
Мирамистин	А. ВЭЖХ	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора геля, приготовленного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца мирамистина
Лидокаин	А. ВЭЖХ Б. Качественная реакция с кобальта хлоридом	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора геля, приготовленного для количественного определения, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме стандартного образца лидокаина Появление ярко-зеленого окрашивания
Масса (объем) содержимого упаковки	ГФ РФ ОФС.1.4.2.0007.15	Среднее значение массы содержимого упаковки не должно быть менее 95% от указанной массы
рН	ГФ РФ ОФС.1.2.1.0004.15 Потенциометрический	от 5,1 до 5,3 (1,0% водный раствор)
Вязкость	ГФ РФ ОФС.1.2.1.0015.15	от 0,70 до 1,20 Па·с
Микробиологическая чистота	ГФ РФ ОФС.1.2.4.0002.18	Категория 2
Количественное определение:		
Химопсин	Протеолитическая активность - Спектрофотометрический	Не менее (2,0±0,5) ПЕ/ г химопсина
Мирамистин	ВЭЖХ	от 95% до 105% от заявленного количества
Лидокаин	ВЭЖХ	от 95% до 105% от заявленного количества
Упаковка	Гель упаковывают в тубы. Тубы вместимостью 30,0 г (тубы АВL, диаметр тубы – 25 мм), с защитной мембраной и завинчивающейся полимерной крышкой. Каждую тубу вместе с инструкцией по применению помещают в картонную пачку.	
Маркировка	На этикетке пачки на русском языке указывают: наименование лекарственного препарата, наименование производителя, номер серии, номер РУ, срок годности, способ применения, объем, лекарственная форма, условия отпуска, условия хранения, предупредительные надписи.	
Хранение	В сухом, защищенном от света месте при температуре от 2 до 8 °С	
Срок годности	2 года	

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведенный сравнительный анализ современной номенклатуры средств, используемых для лечения инфицированных ран, позволил установить, что инновационным подходом в разработке ЛП является конструирование ГЛФ на основе субстанций известного спектра действия с использованием технологий, позволяющих получить ЛП с высокой терапевтической эффективностью.

2. Разработан и обоснован состав комбинированного ЛП для наружного применения на основе инновационных хитозансодержащих ФС комплексов ХтХ и ХтМ. Осуществлен подбор ВВ, выбрана полимерная основа для ГЛФ; изучена осмотическая активность исследуемых образцов; изучен процесс набухания полимерных пленок, позволивший выбрать полимерные композиции из ГПМЦ, Хт, ПАА; изучены реологические свойства образцов; с использованием метода АСМ, исследована однородность ГЛФ.

3. Разработана технология получения ЛП «Гель ранозаживляющий». Разработаны технологическая и аппаратная схема получения ГЛФ, выбраны оптимальные технологические режимы и определены контрольные точки, выбрана наиболее удобная упаковка в форме туб. Выявлено, что к основным показателям качества ГЛФ, которые должны обеспечить желаемое качество продукта при производстве относятся: внешний вид, рН водного извлечения, вязкость, подлинность, микробиологическая чистота. Получены 3 патента РФ на изобретения.

4. Разработаны методики контроля качества ЛП «Гель ранозаживляющий». Выбор и соответствие их разработанной ГЛФ основывался на возможности данных методик оценить подлинность ЛП по ДВ и провести количественное определение.

5. Проведено исследование стабильности ЛП «Гель ранозаживляющий». Опытные образцы ГЛФ через 24 месяца хранения по всем показателям качества, установленным в спецификации НД, соответствуют предъявляемым к ним требованиям. Оптимальной температурой хранения ЛП «Гель ранозаживляющий» является температура от 2 до 8 °С, в сухом, защищенном от света месте.

6. Разработаны проекты НД и ОПР на ЛП для наружного применения «Гель ранозаживляющий».

Практические рекомендации. Выполненные исследования позволили разработать опытно-промышленную технологию получения ГЛФ на основе производных глюкозамина и акриловых полимеров, которая может быть масштабирована в производство для последующей подачи документов на регистрацию в качестве ЛП для лечения инфицированных ран различного генеза.

Перспективой дальнейшей разработки темы является наработка образцов ЛП «Гель ранозаживляющий» для проведения клинического исследования эффективности и безопасности при однократном и многократном накожном нанесении.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Досадина, Э.Э. Использование хитозана в качестве носителя протеиназ и мирамистина для получения ферментсодержащего геля / Э.Э. Досадина, **Л.Л. Бркич**, Н.В. Пятигорская [и др.] // **Бутлеровские сообщения**. – 2016. – Т.48, №10. – С. 49-59.
2. Савельева, Е.Е. Хитозансодержащие композиты протеиназ / Е.Е. Савельева, Э.Э. Досадина, **Л.Л. Бркич** [и др.] // **Химическая промышленность сегодня**. – 2017. – №7. – С. 32-42.
3. **Brkich, L.L.** Development of a scientific methodological approach to expansion of product range for treatment of infected wounds / **L.L. Brkich**, N.V. Pyatigorskaya // *Asian Journal of Pharmaceutics*. – 2017 – Vol. 11– №4. – P. 731-736.
4. Досадина, Э.Э. Биомедицинские материалы с пролонгированным действием на основе модифицированной целлюлозы / Э.Э. Досадина, Е.Е. Савельева, А.Ю. Евдокименко, **Л.Л. Бркич**, Д.А. Быданов, Е.О. Медушева, Н.В. Пятигорская, Г.Э. Бркич, А.А. Белов // **Бутлеровские сообщения**. – 2017. – Т. 50, №5. – С.109-117.
5. **Brkich, L.L.** Formulation and production of a novel pharmaceutical substance for treatment of infected wounds - a chitosan chymopsin complex / **L.L. Brkich**, T.S. Salnikova, G.E. Brkich et al. // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2018. – Vol. 10 – №6. – P.1310-1313.
6. **Brkich, L.L.** The study of the specific activity of the gel containing chitosan-miramistin-chymopsin complex on the linear and planar wounds' model / **L.L. Brkich**, N.V. Pyatigorskaya, T.A Demura et al. // *Asian Journal of Pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 12 – №3. – P.S901-S906.
7. Досадина, Э.Э. Влияние высушивания и сроков хранения на биологические свойства хитозановых композитов содержащих ферменты и различные терапевтические агенты/ Э.Э. Досадина, Е.Е. Савельева, **Л.Л. Бркич** [и др.] // **Бутлеровские сообщения**. – 2018. – Т. 55, №7. – С.64-73.
8. **Brkich, L.L.** Development of assay method for miramistin in an innovative medication wound healing gel / **L.L. Brkich**, P.A. Markin, N.V. Pyatigorskaya et al. // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2018. – Vol. 10 - №11. – P.2731-2734.
9. **Brkich, L.L.** Development of composition and manufacturing method for combination drug product based on chitosan-containing pharmaceutical substances / **L.L. Brkich**, N.V. Pyatigorskaya, G.E. Brkich et al. // *International Journal of Pharmaceutical Research*. – 2018. – Vol. 10 – №4. – P.292-296.
10. **Brkich, L.L.** Miramistin as an antimicrobial component in the innovative substance of Chitosan-Miramistin Complex (CMC) for the treatment of infected wounds of various genesis / **L.L. Brkich**, N.V. Pyatigorskaya, G.E. Brkich et al. // *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. – 2018. – Vol. 10 – №8. – P. 2027-2029.
11. **Brkich, L.L.** The Study of the Wound Healing Activity of the Gel with a Comprehensive Therapeutic Effect / **L.L. Brkich**, A. A. Nedorubov, N.V. Pyatigorskaya et al. // *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. – 2019. – Vol. 7– №6. – P.908-912.
12. Belov, A.A. Stabilization of proteinases by polymers and therapeutic agents during production, storing and exploitation of enzyme-containing gel / A.A. Belov, N.Y. Evdokimenko, E.E. Savelyeva, **L.L. Brkich**, N.V. Pyatigorskaya, E.E. Dosadina // *BIOCATALYSIS-2017 : fundamentals and applications: Proc. of Int. conf.* – M., 2017. – С.46 – 48.
13. Dosadina, E.E. Hydrogel enzymes-containing compositions for wound healing / E.E. Dosadina, N.Y. Evdokimenko, E.E. Savelyeva, V.I. Panfilov, **L.L. Brkich**, N.V. Pyatigorskaya, N.S. Markvichev, A.A. Belov // *Biomaterials and nanobiomaterials: recent advances safety - toxicology and ecology issues: 8th int. conf., including russian-hellenic workshop and school of young scientists*. – Heraklion, 2017. – P09.

14. Markvichev, N.S. Dressing polysaccharide preparations containing enzymes for wound healing / N.S. Markvichev, E.E. Savelyeva, E.E. Dosadina, A.A. Khanafina, A.A. Vaniushenkova, **L.L. Brkich**, V.I. Panfilov, A.A. Belov // Biomaterials and nanobiomaterials: recent advances safety - toxicology and ecology issues: 9th int. conf., including russian-hellenic workshop and school of young scientists. – Heraklion, 2018. – P09.
15. Ванюшенкова, А. А. Стабилизация трипсина иммобилизованного на хитозане в присутствии терапевтических агентов / А. А. Ванюшенкова, А. А. Ханафина, Е. Е. Савельева, **Л.Л. Брkich**, А.А. Белов [и др.] // Успехи в химии и химической технологии. –Т. 32. – РХТУ им. Д.И.Менделеева Москва, 2018. – С. 6–8.
16. Ванюшенкова, А. А. Влияние различных терапевтических агентов на протеиназы, иммобилизованные на хитозане / А. А. Ванюшенкова, **Л.Л. Брkich**, Аль Окби Хидаер Махмуд Али [и др.] // Актуальные аспекты химической технологии БАВ. – Т. 190. – РХТУ Москва, 2018. – С. 135–137.
17. Ханафина, А.А. Влияние высушивания и сроков хранения на биологическую активность мирамистина и протеиназ, иммобилизованных на хитозане / А.А. Ханафина, Е.Е. Савельева, **Л.Л. Брkich** [и др.] // Актуальные аспекты химической технологии БАВ. – Т. 190. – РХТУ Москва, 2018. – С. 141–143.
18. Патент РФ № RU 2691144 С1. Комбинированная композиция для лечения инфицированных ран различного генеза. Авторы: Пятигорская Наталья Валерьевна, **Брkich Лилиана Любановна**, Медушева Елена Олеговна, Брkich Галина Эдуардовна, Белов Алексей Алексеевич, Кулагина Алла Семеновна, Береговых Валерий Васильевич, Свистунов Андрей Алексеевич, Сальникова Татьяна Сергеевна // Заявка: 2018116176, 2019 г.
19. Патент РФ № RU 2687102 С1. Фармацевтическая субстанция для лечения инфицированных ран различного генеза. Авторы: Пятигорская Наталья Валерьевна, **Брkich Лилиана Любановна**, Медушева Елена Олеговна, Брkich Галина Эдуардовна, Белов Алексей Алексеевич, Кулагина Алла Семеновна, Береговых Валерий Васильевич, Свистунов Андрей Алексеевич // Заявка: 2018116181, 2019 г.
20. Патент РФ № RU 2697869 С1. Фармацевтическая субстанция для лечения инфицированных ран различного генеза. Авторы: Пятигорская Наталья Валерьевна, **Брkich Лилиана Любановна**, Медушева Елена Олеговна, Брkich Галина Эдуардовна, Белов Алексей Алексеевич, Кулагина Алла Семеновна, Береговых Валерий Васильевич, Свистунов Андрей Алексеевич // Заявка: 2018116179, 2019 г.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВВ	-	Вспомогательные вещества
ВЭЖХ	-	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГЛФ	-	Готовая лекарственная форма
ГПМЦ	-	Гидроксипропилметилцеллюлоза
ДВ	-	Действующие вещества
ЛП	-	Лекарственный препарат
ЛС	-	Лекарственное средство
ЛФ	-	Лекарственная форма
ПАА	-	Полиакриламид
ФС	-	Фармацевтическая субстанция
Хт	-	Хитозан
ХтМ	-	Хитозан-мирамистин
ХтХ	-	Хитозан-химопсин