

Кузнецова Евгения Геннадьевна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ
БИОСОВМЕСТИМЫХ СИСТЕМ ЧРЕСКОЖНОЙ ДОСТАВКИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ**

3.1.14 – трансплантология и искусственные органы

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные оппоненты:

Посыпанова Галина Ароновна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Шайтан Константин Вольдемарович – доктор физико-математических наук, профессор кафедры биоинженерии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Кирпатовский Владимир Игоревич - доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник Научно-исследовательского института урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства Обороны Российской Федерации.

Защита состоится «25» октября 2022 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСТИО 001.21 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России по адресу: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России и на сайте <http://transpl.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ДСТИО 001.21
кандидат ветеринарных наук

Волкова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

На протяжении последних десятилетий наблюдается интенсивный рост научных исследований в области разработки и внедрения в клиническую практику методов, основанных на использовании искусственных и биоискусственных систем для временной замены функций поврежденных органов и тканей, в том числе, технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины (Готье С.В., 2018).

Развитие биомедицинских технологий, как альтернативы трансплантации, требует решение сложной задачи, связанной с сохранением жизнеспособности и функциональной активности биомедицинских клеточных продуктов, предназначенных для стимуляции внутренней регенерации поврежденных органов и/или для выращивания *in vitro/in vivo/in situ* тканевых эквивалентов жизненно важных органов (Севастьянов В.И., 2009; Готье С.В., 2018). Одним из таких подходов является разработка систем доставки, позволяющих длительно поддерживать постоянную терапевтическую концентрацию биологически активных веществ в крови. Так, установлено, что пролонгированное введение никотинамида (более известного как витамин РР или В3) подавляет отторжение пересаженных β -клеток у N00-мышей (Nomicos I. N. at al, 1986) и благоприятствует регенерации островковых клеток у крыс с частичной панкреатэктомией (Yonemura Y. at al, 1984).

К таким системам пролонгированного действия относятся системы чрескожной доставки, являющиеся основой трансдермальных форм биологически активных веществ - трансдермальных терапевтических систем. Трансдермальные формы предназначены для непрерывной и длительной подачи биологически активных веществ, включая лекарственные вещества, через неповрежденную кожу в системный кровоток с заранее заданной скоростью (Севастьянов В.И., Кирпичников М.П., 2011). Использование трансдермального способа введения биологически активных веществ в организм позволяет не только увеличить биодоступность, но и минимизировать проявление отрицательного побочного действия препаратов (Васильев А.Е. и др., 2001; Береговых В.В. и др., 2012; Filipczak N. at al, 2021), что особенно актуально при проведении иммуносупрессивной терапии (Готье С.В., 2018). Можно предположить, что чрескожное введение биологически активных веществ в трансдермальной форме позволит повысить эффективность восстановительной терапии и ускорить темпы регенерации поврежденных органов и тканей.

Механизмом чрескожного проникновения биологически активных веществ является пассивная диффузия. Для эффективного чрескожного переноса лекарственное вещество должно обладать определенными свойствами: иметь молекулярную массу не более 500 Да и сродство как к гидрофобному роговому слою, так и к гидрофильной дерме; молекула лекарственного вещества должна быть нейтральной, поскольку заряд может препятствовать ее чрескожному переносу. Все эти показатели в той или иной степени влияют на эффективность трансдермального переноса (Ashok K. et al, 2007; Севастьянов В.И. и др., 2011; Zhou X. et al, 2018). К тому же лекарственное вещество не

должно вызывать раздражение при контакте с кожей, и быть пригодно для заместительной терапии, профилактического или длительного терапевтического использования.

Основной проблемой в создании трансдермальной терапевтической системы является разработка конструкции и состава биосовместимой системы чрескожной доставки, способствующим лекарственному веществу преодолевать главный барьер - неповрежденный роговой слой кожи - в терапевтически эффективных концентрациях (Ryan D.G. et al, 2003; Brown B.A.S., 2007). Это подтверждается тем, что, несмотря на доказанные преимущества чрескожной доставки, существует ограниченное количество лекарственных веществ (около 20), выпускаемых в трансдермальной форме (Tsakovska I. et al, 2017).

Продолжается поиск путей повышения эффективности трансдермального переноса лекарственных веществ с молекулярной массой более 500 Да с разной степенью растворимостью в гидрофильных и гидрофобных растворителях (Akhtar N. et al, 2020). Один из подходов заключается в использовании так называемых активаторов переноса, которые изменяют термодинамические параметры кожи. Химические переносчики могут создавать пути для диффузии лекарственных веществ, воздействуя на липиды рогового слоя и приводя к нарушению их высокоупорядоченной структуры. Также применяют химические способы модифицирования молекул лекарственных веществ, но, в ряде случаев это приводит к заметному снижению их специфической активности (Karande P. et al, 2009).

Физические способы улучшения проницаемости кожи включают в себя такие воздействия как ионофорез, сонофорез, электропорация, радиочастотные импульсы (Farlow M.R., 2011). Из новейших разработок в этой области можно отметить применение микроигл: ведутся разработки конструкций полых микроигл как резервуара высокомолекулярных лекарственных веществ в трансдермальных системах (Севастьянов В.И. и др., 2011).

Несмотря на то, что с момента появления первых трансдермальных форм прошло более 40 лет, до настоящего времени выбор функционально эффективной системы чрескожной доставки для конкретного вещества проводится эмпирическим путем. Это обусловлено целым рядом причин, а именно:

- жесткими требованиями к биосовместимым свойствам компонентов систем чрескожной доставки,
- сложностью прогнозирования процессов взаимодействия компонентов систем чрескожной доставки и лекарственных веществ с морфологическими структурами кожи,
- влиянием лекарственных веществ на стабильность систем чрескожной доставки,
- особыми требованиями к физико-химическим свойствам лекарственных веществ.

Цель исследования: разработка экспериментальных подходов к созданию и исследованию биосовместимых систем чрескожной доставки лекарственных веществ.

Задачи исследования

1. На основании результатов собственных исследований предложить общий алгоритм создания систем чрескожной доставки лекарственных веществ.
2. Разработать эмульсионную композицию системы чрескожной доставки.
3. Разработать алгоритм выбора типа (полимерная/эмульсионная) матричной системы чрескожной доставки в зависимости от физико-химических свойств лекарственного вещества.
4. Найти способы повышения диффузии через кожу для конкретного лекарственного вещества.
5. Разработать метод *in vitro* для подбора оптимального состава системы чрескожной доставки лекарственного вещества.
6. Исследовать биосовместимость полимерной и эмульсионной систем чрескожной доставки.
7. Доказать функциональную эффективность трансдермальных терапевтических систем на основе полимерной и эмульсионной систем чрескожной доставки.
8. Доказать возможность использования системы чрескожной доставки иммуномодулятора в составе трансдермальных терапевтических систем для поддерживающей терапии в технологиях регенеративной медицины.
9. Изучить возможное накопление лекарственного вещества в коже при аппликации трансдермальной терапевтической системы.

Научная новизна

1. Предложен и экспериментально обоснован общий алгоритм создания биосовместимых полимерной и эмульсионной систем чрескожной доставки лекарственных веществ.
2. Показано, что разработанная эмульсионная композиция вода в масле повышает эффективность трансдермального переноса как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных (не более 6000 Да) лекарственных веществ.
3. Предложены и экспериментально обоснованы пути оптимизации чрескожного переноса лекарственных веществ с помощью химических и/или физических активаторов.
4. Разработан двухэтапный метод *in vitro* нахождения оптимального состава системы чрескожной доставки лекарственного вещества с последовательным использованием двух тест-систем.
5. Доказаны биосовместимые свойства полимерной и эмульсионной системы чрескожной доставки.
6. На примере иммуномодулятора аминодигидрофталазиндион натрия в экспериментах *in vivo* показана возможность использования системы чрескожной доставки биологически активных веществ для поддерживающей терапии в технологиях регенеративной медицины.
7. В экспериментах *in vivo* и ограниченных испытаниях с участием добровольцев (фаза 1 и 2) доказана функциональная эффективность лабораторных образцов

трансдермальных терапевтических систем с разработанными полимерной и эмульсионной системами чрескожной доставки лекарственных веществ.

8. Установлено, что после применения трансдермальной терапевтической системы в коже может сохраняться лекарственное вещество, в количестве, способном оказывать терапевтическое действие.

Теоретическая и практическая значимость

Общий алгоритм создания биосовместимых полимерной и эмульсионной систем чрескожной доставки лекарственных веществ может быть использован для создания систем чрескожной доставки различных биологически активных веществ, включая лекарственные вещества.

Показана эффективность применения биосовместимой эмульсионной системы доставки, содержащей докучат натрия, для чрескожного переноса как низко-, так и высокомолекулярных веществ, растворимых в водных средах (патент РФ № 2481822 «Микроэмульсионные композиции для создания трансдермальных и трансмукозальных форм фармацевтических средств и косметических препаратов и способ их получения»).

Наличие в коже лекарственного вещества после применения трансдермальной терапевтической системы, ставит под сомнение утверждение о прекращении ее действия после снятия пациентом. Активное вещество, которое будет продолжать поступать в кровоток после снятия трансдермальной терапевтической системы с кожи, может компенсировать временную задержку начала действия трансдермальной лекарственной формы, что необходимо принимать во внимание при разработке схемы её многократного применения.

Разработанный скрининг-метод *in vitro*, представляющий собой последовательное использование синтетической (мембрана Strat-M) и биологической (лоскут неконсервированной кожи кролика) тест-систем можно использовать для нахождения оптимального состава системы чрескожной доставки различных биологически активных веществ.

Показана возможность применения чрескожной системы доставки для поддерживающей терапии в технологиях регенеративной медицины. В экспериментах *in vivo* установлено, что аппликация трансдермальной терапевтической системы иммуномодулятора аминодигидрофталазиндиона натрия у крыс стимулирует процессы восстановления печени при ее обширной резекции.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационного исследования явились труды отечественных и зарубежных авторов в области разработок трансдермальных систем доставки. Для решения поставленных задач использован комплекс физико-химических, микроскопических и биологических методов исследования, включающих метод спектрофотометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, атомно-абсорбционной спектрометрии, сканирующей электронной и световой микроскопии. Изучение диффузии лекарственных веществ через мембрану и неконсервированную кожу кролика из лабораторных образцов трансдермальных терапевтических систем

проводили в диффузионных ячейках Франца. Биологическое действие трансдермальных терапевтических систем плацебо оценивали методами *in vitro* и *in vivo*, рекомендованными серией межгосударственных стандартов ГОСТ ISO 10993 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий». Функциональную эффективность лабораторных образцов трансдермальной терапевтической системы инсулина изучали на крысах на экспериментальной модели сахарного диабета. Стимулирующее действие лабораторных образцов трансдермальной терапевтической системы иммуномодулятора аминодигидрофталазиндиона натрия исследовали на модели обширной резекции печени крыс по митотической (пролиферативной) активности гепатоцитов в остатке резецированной печени.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Алгоритм создания биосовместимых и терапевтически эффективных полимерной и эмульсионной систем чрескожной доставки лекарственных веществ включает в себя выбор типа системы доставки, подбор активаторов трансдермального переноса *in vitro*, оценку функциональных свойств в модельных экспериментах на животных, а также исследование биологического действия.
2. Диоктилсульфосукцинат натрия в качестве чрескожного переносчика обеспечивает трансдермальный транспорт как низко-, так и высокомолекулярным лекарственным веществам (до 6000 Да).
3. Последовательное использование синтетических мембран и неконсервированной кожи животного при скрининговых исследованиях *in vitro* систем чрескожной доставки сокращает время проводимых исследований и существенно уменьшает количество экспериментов на животных.
4. Разработанные полимерная и эмульсионная системы чрескожной доставки не проявляют местного раздражающего и общетоксического действия.
5. Эксперименты *in vivo* и ограниченные испытания с участием добровольцев (фаза 1 и 2) доказывают функциональную эффективность разработанных систем чрескожной доставки в составе трансдермальных терапевтических систем.
6. Аппликация трансдермальной терапевтической системы на основе эмульсионной системы чрескожной доставки с иммуномодулятором аминодигидрофталазиндионом натрия стимулирует процессы регенерации поврежденной печени крыс в модели обширной резекции печени.
7. После прекращения использования трансдермальной терапевтической системы в коже может определяться остаточное количество лекарственного вещества, способное оказывать терапевтическое действие.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности представленной работы обеспечивается четкой постановкой задач, большим количеством экспериментальных данных, использованием современных методов исследования, применением современных методов статистической обработки, сравнением полученных результатов с данными научной литературы.

Апробация работы состоялась 08 июня 2022 г. на совместной конференции научных и клинических подразделений Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Основные положения и результаты диссертации были представлены и обсуждены на 1st EUFEPS Conference on Optimising Drug Delivery and Formulation: New Challenges in drug Delivery (Франция, Версаль, сентябрь 2003), XII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 18-22 апреля 2005 г.), 5th World Meeting on Pharmaceutical, Biopharmaceutical and Pharmaceutical Technology (Швейцария, Женева, 27-30 марта 2006), VII Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 28-30 мая 2014 г.), IX Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 17–19 сентября 2018 г.), IV Национальном конгрессе «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 7–9 октября 2019); IV Ежегодной международной конференции Futuremed (Санкт-Петербург, октябрь 2019); X Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 5–7 октября 2020 г.); V Российском национальном конгрессе трансплантологов (Москва, 27-29 сентября 2021 г.); Международной конференции Future Pharmaceuticals and Novel Drug Delivery Systems (Франция, Париж, 28-29 марта 2022 г.).

Связь работы с научными программами, планами, темами

Диссертационная работа выполнялась в рамках научно-исследовательской работы по теме «Исследование по разработке новых систем контролируемой доставки малых доз лекарственных препаратов для оказания медицинской помощи раненым и пораженным на этапах медицинской эвакуации», НИР, шифр «Элдар» (2006-2008 гг.) и государственного контракта № 6551, ОКР, шифр «Стерля» (2011-2013 гг.); государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации на осуществление научных исследований и разработок по теме НИР: «Разработка и экспериментальное исследование трансдермальных терапевтических систем (ТТС) высокомолекулярных лекарственных веществ» (2015-2017 гг.), номер государственной регистрации 115102010017.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в практику отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; клинического отдела радиационной медицины и Центра биомедицинских и аддитивных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения Государственного научного центра «Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России; обособленного подразделения «Центр перспективных технологий» автономной некоммерческой организации «Институт медико-

биологических исследований и технологий» (г. Краснознаменск); а также в образовательный процесс кафедры трансплантологии и искусственных органов Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет) и учебно-методическую работу Физтех-школы биологической и медицинской физики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Московского физико-технического института (национальный исследовательский университет).

Личный вклад автора

Автором сформулированы концепция, цели, задачи и методология работы, разработаны дизайны доклинических и ограниченных клинических исследований. Автор принимала участие в выборе лекарственных веществ, в разработке методик определения лекарственных веществ в различных средах, подборе составов систем чрескожной доставки, изготовлении и экспериментальных исследованиях биосовместимых и функциональных свойств лабораторных образцов трансдермальных терапевтических систем *in vitro* и *in vivo* с последующей статистической обработкой, анализом и обобщением полученных результатов.

Публикации по теме диссертации

По материалам исследования автором опубликовано 38 научных работ, в том числе 1 глава в книге, 26 статей: из них 21 - в российских и зарубежных журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Центра, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (из них 19 статей в изданиях, индексируемых Scopus и Web of Science). Получен патент РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 223 страницах машинописного текста в виде монографии и состоит из введения, 7 глав (первая глава содержит научное обоснование цели и задач работы, в остальных шести рассматриваются пути решения сформулированных задач на основе анализа данных литературы и результатов собственных исследований), заключения, выводов, практических рекомендаций, списка используемой литературы. Указатель литературы содержит 155 отечественных и 169 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 69 таблицами, 51 рисунком и 21 формулой. Содержит 4 приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Лекарственные вещества для создания трансдермальных терапевтических систем

При разработке экспериментальных подходов к созданию систем доставки для чрескожного переноса лекарственных веществ (ЛВ) в работе были выбраны 10 лекарственных субстанций:

1. Инсулин (Sigma-Aldrich[®], США; Экспериментальное предприятие Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН),
2. Диацетат бис (1-винилимидазол-N) цинка (Ацизол[®]) (Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского),
3. Кофеин-натрий бензоат (Shandong Xinhua Pharmaceutical Co. Ltd., Китай),
4. Лидокаина гидрохлорид (Bharat serums and vaccines, Индия),
5. Анилокаин (Бромокаин) (ВТК «Анилокаин», Россия),
6. Аминодигидрофталазиндиона натрия (Галавит[®]) («СЭЛВИМ», Россия),
7. Ликопид[®] (АО «Пептек», Россия),
8. Феназепам[®] (АО «Валента Фарм»),
9. Хлорпропамид (Dipharma Francis, Испания),
10. Циклоспорин (Afine, Китай).

Основными требованиями к выбранным субстанциям являются необходимость длительного поддержания постоянной концентрации ЛВ в крови и социальная значимость новой формы лекарственного вещества.

Полимерные композиции для чрескожной системы доставки

Выбор той или иной полимерной композиции для трансдермальной терапевтической системы (ТТС) зависит от природы включаемого в нее лекарственного вещества и необходимой скорости доставки этого вещества в кровотоки. Высокомолекулярные полимеры должны обеспечивать эффективное высвобождение ЛВ, но при этом не участвовать в переносе активного вещества и не проникать в глубокие слои кожи. Все полимерные композиции, используемые для разработки систем чрескожной доставки (СЧД), должны соответствовать требованиям документа ЕМА/СНМР/QWP/608924/2014 «Руководство по качеству трансдермальных пластырей».

При наработке лабораторных образцов ТТС с полимерной системой чрескожной доставки в работе были использованы композиции, разрешенные для применения в трансдермальных терапевтических системах:

- «Композиция акриловая адгезивная для трансдермальных терапевтических систем» (ЗАО «Биомир сервис», ТУ 9398-003-54969743-2006) на основе пластифицированного сополимера бутилметакрилата с метакриловой кислотой в смеси диоктилфталата и этилового спирта (акрилового сополимера - 25%). Вязкость составляет 8450 мПа·с (23,3°C). Данная адгезивная композиция не требует стадии полимеризации. Пленкообразование происходит в результате сушки при температуре не выше 30°C. Полученная в результате пленка обладает хорошими адгезивными свойствами, не

вызывает раздражения кожи, имеет высокую емкость относительно спирторастворимых лекарственных веществ. В состав композиции также входит альфа-токоферол в качестве активатора чрескожного переноса и антиоксиданта.

- акриловый адгезив DURO-TAK 87-4287 фирмы Henkel Chemical Company. Полимерная композиция содержит винил ацетат, ее вязкость составляет 8000 мПа·с, имеет хорошую адгезию к коже и низкое сдвиговое сопротивление.

- полилактидгликолид (P1941, Sigma). Биоразлагаемые полиэфиры полилактид-ко-гликолида (ПЛГА) часто используются для доставки лекарств и биомолекул. Физико-химические свойства ПЛГА определяются молярным соотношением молочной и гликолевых кислот. В работе использовали полимер с соотношением кислот 75:25 соответственно.

Эмульсионные композиции для чрескожной системы доставки

Характерной особенностью эмульсий является возможность вводить в состав как водо-, так и жирорастворимые компоненты, обеспечивая в дальнейшем более высокую абсорбцию активных веществ неповрежденным участком кожного покрова.

Первая эмульсионная композиция была разработана нами для СЧД инсулина. В присутствии переносчика диоктилсульфосукцината натрия удалось подобрать состав эмульсионной композиции, которая бы обеспечивала скорость диффузии гормона через кожу, равную 1,0 Ед/час, что соответствует базальной секреции инсулина поджелудочной железой здорового человека.

В дальнейшем при разработке эмульсионных композиций для каждого конкретного ЛВ состав менялся и усовершенствовался. В таблице 1 представлен состав эмульсии, который был принят за базовый при разработке ТТС различных водорастворимых лекарственных веществ.

Таблица 1 – Базовый состав эмульсионной композиции

Фаза	Наименование вещества	Назначение в трансдермальной терапевтической системе	Свойства
Водная	Вода очищенная	Основа водной фазы	В соответствии с ФС 42-2620-97
	Лекарственная субстанция	Активное вещество	Гидрофильный порошок
Масляная	Масло ядер абрикосовых косточек	Основа масляной фазы	Содержит линолевую (30-45%) и олеиновую (55-70%) кислоты
	α -токоферола ацетат	Разрыхлитель кожи и антиоксидант	Липофильная жидкость
	Диоктилсульфосукцинат натрия	Переносчик ЛВ	Амфифильный анионный детергент
	Decaglyn PR-20	Эмульгатор	Липофильное поверхностно-активное вещество с гидрофильно-липофильным балансом 3,2

Вспомогательные вещества для полимерных и эмульсионных систем чрескожной доставки

При разработке как полимерных, так и эмульсионных систем чрескожной доставки в их состав вводили формообразующие вспомогательные вещества, а также активаторы чрескожного переноса, одобренные для использования в лекарственных формах, контактирующих с кожей. Все растворители и вспомогательные вещества, входящие в состав системы чрескожной доставки (СЧД), не должны вызывать токсического, раздражающего и аллергического действия, вступать в реакцию с лекарственным веществом.

В таблице 2 перечислены вспомогательные вещества, которые были использованы в работе при разработке полимерных и эмульсионных систем чрескожной доставки ЛВ.

Таблица 2 – Вспомогательные вещества

№	Вспомогательное вещество	Производитель
1	Спирт этиловый	ООО БиоФармКомбинат, Россия
2	Вода очищенная	ФС 42-2620-97
3	α -токоферола ацетат	BASF SE, Германия
4	Масло ядер косточек абрикоса	Desert Whale Jojoba Company Ltd., США
5	Кора дуба измельченная	АО Красногорсклексредства, Россия
6	Гидрокарбонат натрия	Sigma-Aldrich [®] , США
7	Додецилсульфат натрия	AppliChem Panreac, Испания
8	Диоктилсульфосукцинат натрия	Sigma [®] , США
9	Эмульгатор Nikkol Decaglyn PR-20	Nikko Chemicals CO., LTD, Япония
10	Ланолин	Aroma-Zone, Франция
11	Цетиловый спирт	Sigma Aldrich, США

В качестве переносчика ЛВ через кожу в работе использовали синтетический аналог фосфолипидов липофильно-гидрофильной природы - диоктилсульфосукцинат натрия (докузат натрия). Данное анионное поверхностно-активное вещество широко используется в медицине. Оно склонно к спонтанному мицеллообразованию в водных и органических средах, а также способно менять свою пространственную ориентацию в зависимости от полярности растворителя. Благодаря наличию двух углеводородных цепей докузат натрия способен образовывать стабильные агрегаты с минимальным межфазным натяжением вода/масло. Возможный механизм трансдермального переноса лекарственного вещества в его присутствии заключается в следующем: при прохождении мицелл, содержащих водный раствор ЛВ, через эпидермис их внешняя поверхность обогащена гидрофобными группами, при последующей диффузии мицелл через гидрофильную дерму молекулы докузата натрия начинают разворачивать свои гидрофильные группы в сторону окружающей среды, высвобождая при этом молекулы ЛВ, которое затем диффундирует через стенки капилляров в кровоток.

Вспомогательные материалы для трансдермальных терапевтических систем

Основными элементами конструкций, существующих в настоящее время ТТС, являются: непроницаемая подложка (внешний покровный слой), препятствующий диффузии ЛВ в сторону противоположную коже, а также попаданию влаги извне; чрескожная система доставки, состоящая из матрицы/резервуара и вспомогательных веществ; лекарственное вещество, диспергированное или растворенное в матрице/резервуаре; адгезивный слой для фиксации на коже и защитная антиадгезионная плёнка, которая снимается перед аппликацией.

Одним из основных требований к вспомогательным материалам для изготовления ТТС является отсутствие диффузии ЛВ через внешний покровный и защитный слой. Кроме того, покровный слой должен защищать трансдермальную систему от внешнего воздействия во время применения.

В работе для изготовления лабораторных образцов матричных ТТС были использованы следующие вспомогательные материалы:

1. ТТС с полимерной системой чрескожной доставки: подложка Cotran 9715 film (3М, США); защитная пленка Scotchpack 1022 pet film (3М, США);
2. ТТС с эмульсионной системой чрескожной доставки: подложка из эластичного микрогубчатого материала на основе вспененного поливинилхлорида с адгезивом 3М Foam tape 9773 (3М, США); нетканый материал, являющийся впитывающим элементом повязки ПАЛВ-01 (ООО «Группа Компаний Пальма», Россия, ТУ 9393-005-17168608-2004); защитная антиадгезивная пленка Scotchpack 1022 Release Liner (3М, США).

Для первичной упаковки лабораторных образцов как полимерной, так и эмульсионной ТТС использовали саше (Proflex company, Россия).

Исследования диффузии лекарственных веществ через мембрану/неконсервированную кожу кролика

Динамику выхода ЛВ из лабораторных образцов ТТС изучали через мембрану или неконсервированную кожу кролика в стеклянных диффузионных ячейках Франца при непрерывном перемешивании при 32°C на анализаторе диффузии лекарственных препаратов HDT 1000 (Copley Scientific Ltd., Великобритания).

Пробы водных растворов лекарственного вещества, отобранные в ходе эксперимента из приемных камер диффузионных ячеек, исследовали одним из трех аналитических методов: спектрофотометрическим, атомно-абсорбционным или методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Использование животных или их изолированной кожи при исследовании чрескожной диффузии лекарственных веществ имеет первостепенное значение для оценки улучшения проницаемости кожи и понимания свойств и механизма действия усилителей переноса. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с международными правилами надлежащей лабораторной практики (Директива 86/609/ЕЕС) и российским законодательством (приказ МЗ РФ № 199н от 01.04.16). В

экспериментах *in vitro* и *in vivo* были использованы самцы кроликов породы Шиншилла массой 2,5-3,0 кг и крысы породы Вистар массой 250-350 г, полученные из питомника лабораторных животных «Кролинфо» Московской области. Все животные имели необходимые ветеринарные свидетельства. После доставки из питомника кролики были осмотрены ветеринарным врачом, проходили карантин в течение 14 суток. Каждое животное содержалось в индивидуальной клетке на подстилке для лабораторных животных при искусственном освещении и продолжительности светового дня 12 ч. Температура в помещении поддерживалась на уровне $22\pm 1^\circ\text{C}$, относительная влажность воздуха – 45–65%. Рацион питания животных соответствовал ГОСТ Р 50258-92.

Забор кожного лоскута кролика проводили после усыпления животного, используя препараты «Золетил 100» (Virbac Sante Animale, Франция) и «Рометар» (Bioveta, Чехия). На коже в области живота животного был предварительно удален волосяной покров. Кожный лоскут без подкожно-жировой клетчатки использовали в диффузионных ячейках Франца сразу после выделения.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel. Вычисляли показатели описательной статистики: число наблюдений, среднее арифметическое, медиану, стандартное отклонение, межквартильный разброс. Для определения статистической достоверности различий средних между выборками с нормальным распределением (согласно критерию Колмогорова-Смирнова) применяли параметрические методы (t-критерий Стьюдента). Различия считали статистически достоверными в том случае, если уровень значимости p не превышал порогового значения 0,05.

Экспериментальный подход к подбору систем чрескожной доставки

Конструкция и состав трансдермальной терапевтической системы

Все существующие ТТС можно отнести к одному из трёх видов конструкций: резервуарная, матричная и комбинированная. В работе использовали матричную конструкцию ТТС, простая технология изготовления и удобство в применении которой делает ее более предпочтительной для большинства производителей и потребителей.

Из существующих матричных систем чрескожной доставки было выбрано два типа: полимерная и эмульсионная. Подбор конкретной системы чрескожной доставки осуществляли исходя из свойств лекарственного вещества, а именно, его растворимости (рисунок 1).

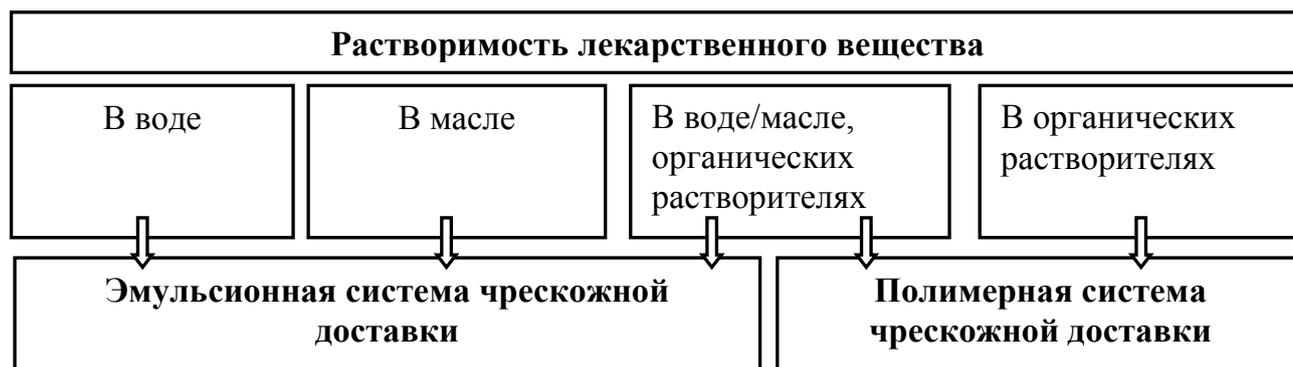


Рисунок 1 - Схема выбора типа системы чрескожной доставки для трансдермальных терапевтических систем в зависимости от растворимости лекарственного вещества

Если лекарственное вещество хорошо растворимо как в воде/масле, так и в органических растворителях, то выбор чрескожной системы делают на основании сравнения результатов диффузии ЛВ *in vitro* через мембрану или кожу. Определяющим принципом в таком случае будет служить возможность использования тех вспомогательных веществ (переносчиков, активаторов переноса), которые необходимы для диффузии ЛВ через кожу в терапевтически эффективном количестве.

Методика выбора полимерной системы чрескожной доставки лекарственного вещества. Тест растворения

Тест растворения часто используют в качестве метода изучения систем доставки лекарственных веществ с контролируемым высвобождением. В работе этот метод использовали при определении скорости высвобождения ЛВ из СЧД для оценки степени его связывания с полимерной композицией.

На рисунке 2 представлена блок-схема подбора полимерной СЧД для ТТС по результатам теста растворения.



Рисунок 2 - Схема подбора полимерной системы чрескожной доставки лекарственного вещества

За основной параметр теста растворения обычно принимают процент лекарственного вещества, перешедшего в раствор за определенный промежуток времени. При выборе системы чрескожной доставки для ТТС тест растворения проводили на приборе «лопасть для перемешивания» VK 7000/7010 (VARIAN, США) в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм».

В качестве примера выбора полимерной композиции для трансдермальной терапевтической системы приведены результаты сравнения параметров теста растворения для лабораторных образцов ТТС Ацизола® и ТТС лидокаина, где для каждой субстанции были изготовлены 2 вида СЧД: полилактидгликолидная и полиакрилатная. Количество лекарственных и вспомогательных веществ было одинаковым в обоих случаях. Площадь ТТС составляла 10 см². Определение концентрации лекарственных веществ в растворах проводили методом спектрофотометрического анализа по их УФ-спектрам на спектрофотометре Shimadzu UV-2600 (Япония). Для Ацизола® максимум спектра поглощения соответствует длине волны 226±2 нм, а для лидокаина – 261±2 нм.

Было показано, что количество ЛВ, вышедшее в 0,9% раствор хлорида натрия из лабораторных образцов ТТС на основе полиакрилатной композиции выше (18,7±2,5 мг

Ацизола® и $21,9 \pm 2,1$ мг лидокаина ($n=6$)), чем для полилактидгликолидной ($8,8 \pm 1,0$ мг Ацизола® и $11,8 \pm 1,7$ мг лидокаина ($n=6$)).

В случае получения одинаковых величин выхода лекарственного вещества из разных полимерных композиций в тесте растворения, выбор подходящей СЧД целесообразно сделать исходя из результатов исследования диффузии ЛВ из ТТС через неконсервированную кожу кролика *in vitro*.

Такая ситуация сложилась при разработке СЧД хлорпропамида. Были изготовлены две лабораторные партии образцов ТТС с различными полимерными композициями в составе СЧД: «Композиция акриловая адгезивная для ТТС» (СЧД №1) и акриловый сополимер DURO-TAK 87-4287 (СЧД №2). Каждая ТТС содержала по 15 мг хлорпропамида и одинаковое количество вспомогательных веществ.

В тесте растворения количество хлорпропамида, вышедшее из ТТС с разными полимерными системами чрескожной доставки, достоверно не отличалось и составляло $5,3 \pm 1,5$ мг ($n=6$) и $5,6 \pm 1,0$ мг ($n=6$) соответственно. Количество ЛВ определяли спектрофотометрическим методом по максимуму спектра поглощения на длине волны 231 ± 2 нм. Для дальнейшего выбора полимера была исследована диффузия ЛВ из ТТС через неконсервированную кожу кролика в диффузионных ячейках Франца в течение 24 часов.

Количество хлорпропамида (определяли методом ВЭЖХ), прошедшее через кожу в приемную камеру диффузионной ячейки из ТТС с полимерной СЧД №1 составило $17,5 \pm 4,1\%$ ($n=5$), а из ТТС с полимерной СЧД №2 – $28 \pm 6,8\%$ ($n=5$). Таким образом, для ТТС хлорпропамида следует выбрать систему чрескожной доставки на основе акрилового сополимера DURO-TAK 87-4287, так как для трансдермальных лекарственных форм выход лекарственного вещества в пределах 30-60% считается приемлемым.

Выбор типа матрицы для чрескожной системы доставки лекарственных веществ широкого спектра растворения

Для лекарственных веществ, растворимых как в воде/масле, так и в органических растворителях, выбор полимерной или эмульсионной системы чрескожной доставки для ТТС может быть сделан на основании результатов исследования диффузии ЛВ из ТТС через неконсервированную кожу животного *in vitro*. Примерами таких лекарственных веществ могут служить антидот угарного газа диацетат бис (1-винилимидазол-N) цинка (Ацизол®) и психостимулирующее вещество кофеин.

Измерение количества Ацизола®, диффундировавшего через кожу кролика в приемную камеру ячейки Франца, проводили с использованием атомно-абсорбционного анализатора PerkinElmer Analyst A100 (Англия), а кофеина - методом спектрофотометрического анализа на спектрофотометре Shimadzu UV-2600 (Япония) при длине волны 273 ± 2 нм, соответствующей максимуму спектра поглощения.

В таблице 3 приведены средние значения скоростей диффузии Ацизола® и кофеина из ТТС площадью 10 см^2 с полимерной и эмульсионной композицией за 24 часа эксперимента. В качестве полимерной композиции использовали «Композицию

акриловую адгезивную для ТТС», в качестве эмульсионной композиции был выбран базовый состав (таблица 3).

Таблица 3 - Диффузия Ацизола® и кофеина через кожу кролика *in vitro* из систем чрескожной доставки различного типа

Лекарственное вещество, содержание в трансдермальной терапевтической системе	Тип чрескожной системы доставки	Скорость диффузии с площади трансдермальной терапевтической системы 10 см ² , мкг/ч
Ацизол®, 200 мг	Полимерная	119 ± 23
	Эмульсионная	1840 ± 430
Кофеин, 20 мг	Полимерная	574 ± 77
	Эмульсионная	1431 ± 172

Как видно из таблицы эмульсионная система доставки обеспечивает более высокие значения скорости диффузии обеих субстанций через кожу по сравнению с полимерной.

Исходя из требуемой высокой лечебной дозы Ацизола® для достижения терапевтического эффекта антидота (по 60 мг/мл в/м 2–4 раза в сутки), для создания ТТС была выбрана эмульсионная система чрескожной доставки.

При полученной скорости диффузии кофеина его теоретически рассчитанная постоянная концентрация в крови в течение 24 часов составит 5,7 мкг/мл для эмульсионной ТТС и 2,2 мкг/мл для полимерной ТТС. По данным литературы при пероральном приеме 100 мг кофеина максимальная концентрация его в крови равна 1,58–1,76 мкг/мл. Таким образом, терапевтическую концентрацию кофеина в крови пациента можно создать с помощью аппликации ТТС с системой чрескожной доставки на основе полимерной композиции, которая проще в изготовлении по сравнению с эмульсионной композицией.

Оптимизация системы чрескожной доставки для усиления чрескожного переноса лекарственных веществ

Оптимизацию состава системы доставки для усиления чрескожного переноса лекарственных веществ следует осуществлять после выбора ее типа. Тестом может служить исследование диффузии ЛВ через синтетическую мембрану или неконсервированную кожу животного *in vitro*. Для увеличения скорости диффузии лекарственного вещества через кожу применяют химические или физические активаторы чрескожного переноса. Выбор того или иного способа воздействия на кожу зависит от свойств лекарственного вещества.

На рисунке 3 представлена разработанная нами схема подбора чрескожных активаторов переноса лекарственных веществ.

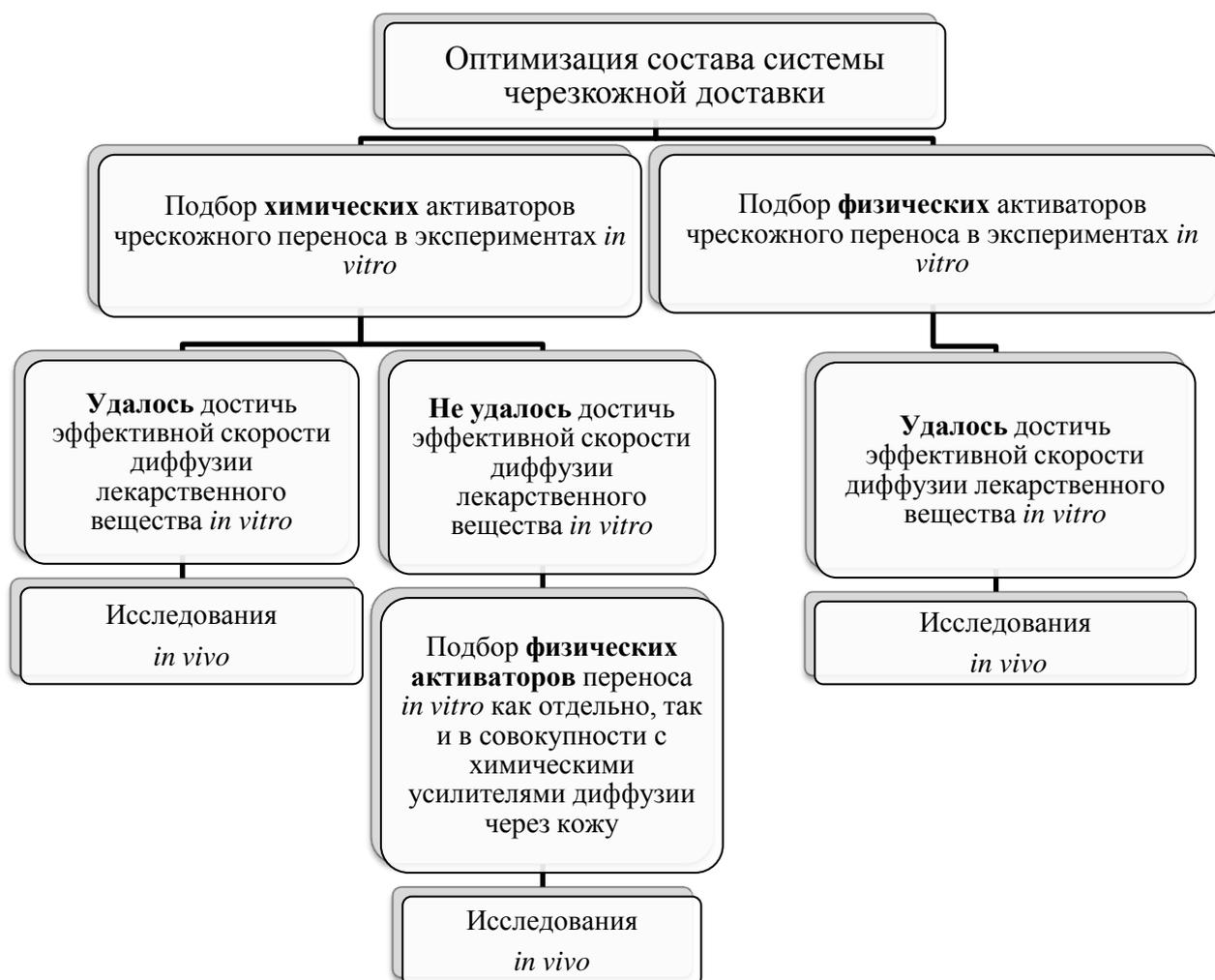


Рисунок 3 – Этапы оптимизации состава систем черезкожной доставки лекарственных веществ

Увеличение черезкожной диффузии лекарственных веществ с помощью химических переносчиков

Водный экстракт коры дуба

Для оптимизации состава СЧД инсулина были проведены эксперименты по исследованию скорости диффузии гормона через неконсервированную кожу кролика *in vitro* из лабораторных образцов ТТС, в которых водной фазой эмульсионной композиции был экстракт коры дуба с добавлением гидрокарбоната натрия (0,2М). Количество гормона и вспомогательных веществ во всех лабораторных образцах ТТС площадью 10 см² было одинаковым. В качестве контроля исследовали лабораторные образцы ТТС инсулина с эмульсионной композицией, где в качестве водной фазы использовали 0,2М раствор гидрокарбоната натрия. Концентрацию гормона в приемной камере диффузионной ячейки измеряли после 24-часовой аппликации ТТС.

Показано, что масса инсулина, прошедшего через кожу из эмульсионной композиции на основе экстракта коры дубы в среднем в 2,3 раза больше по сравнению с ТТС без добавления экстракта (n=30): 3,51±1,33 мг и 1,55±0,18 мг соответственно.

Диоктилсульфосукцинат натрия

Для исследования влияния диоктилсульфосукцината натрия (докузата натрия) на диффузию ЛВ через кожу были изготовлены лабораторные образцы эмульсионной ТТС бромокаина (анилокаина) с содержанием данного переносчика и без него. Количество бромокаина в исследуемых растворах определяли методом ВЭЖХ после 26-часовой аппликации.

При добавлении докузата натрия в эмульсионную композицию для трансдермальной системы доставки с содержанием бромокаина 50 мг удалось добиться увеличения скорости диффузии ЛВ через кожу с $23,1 \pm 3,7$ мкг/ч \times см² до $120,1 \pm 21,6$ мкг/ч \times см². Более существенное увеличение этого параметра наблюдалось при внесении переносчика в ТТС с содержанием бромокаина 100 мг: скорость возрастала с $31,3 \pm 8,1$ мкг/ч \times см² до $332,3 \pm 70,7$ мкг/ч \times см².

Таким образом, данные, полученные при исследовании диффузии низкомолекулярного вещества бромокаина через неконсервированную кожу кролика *in vitro*, подтверждают необходимость внесения переносчика докузата натрия в состав эмульсионных систем чрескожной доставки ТТС.

Обоснование необходимости совместного использования двух тест-систем при подборе нескольких активаторов чрескожного переноса *in vitro*

В случае, когда для ЛВ необходим подбор нескольких активаторов чрескожного переноса, исследования становятся трудоемкими и дорогостоящими. Поэтому был предложен двухэтапный *in vitro* скрининг-метод подбора оптимального состава эмульсионных систем доставки с последовательным использованием синтетической мембраны и неконсервированной кожи кролика.

В работе была использована мембрана Strat-M (MercMillipore, Германия), которую применяют для исследования аппликационных лекарственных форм в качестве альтернативы кожи животных. Эта мембрана имеет структуру похожую на человеческую кожу. В отличие от кожи, мембраны Strat-M не требуют специальной подготовки при исследовании диффузии ЛВ. Изучая *in vitro*, например, диффузию циклоспорина из эмульсионной системы чрескожной доставки через мембрану Strat-M, была продемонстрирована принципиальная возможность трансдермального переноса иммуносупрессора.

В качестве биологической тест-системы использовали лоскуты неконсервированной кожи кролика с предварительно удаленным волосяным покровом.

Целесообразность совместного использования синтетической и биологической тест-систем показана при выборе оптимального состава эмульсионной системы чрескожной доставки иммуномодулятора аминодигидрофталазиндиона натрия (Галавит®). Каждая ТТС содержала 4,6 мг лекарственного вещества. Количество ЛВ, прошедшее через мембрану/кожу определяли методом ВЭЖХ.

При исследовании диффузии аминодигидрофталазиндиона натрия из эмульсионных ТТС шести различных составов в тест-системе 1 (ячейка Франца с мембраной Strat-M) было отобрано два состава эмульсионной композиции с наибольшим выходом ЛВ

($29,8 \pm 7,1$ и $31,0 \pm 5,6$ %) для испытаний в тест-системе 2 (ячейка Франца с неконсервированной кожей кролика) в тех же условиях.

Масса ЛВ, прошедшего через неконсервированную кожу из ТТС аминодигидрофталазиндиона натрия за 24 часа аппликации, для одной эмульсии составила 58-71% от начального количества ЛВ в ТТС и 39-50% - для второй эмульсии. Заметим, что использование неконсервированной кожи кролика в отличие от синтетической тест-системы позволило выявить различие в скорости диффузии ЛВ из ТТС двух составов, то есть биологическая тест-система оказалась более чувствительной к составам эмульсионных композиций.

Последовательное использование синтетической и биологической тест-систем на начальных стадиях разработки трансдермальных систем доставки дает возможность значительно сократить трудоемкость исследований.

Физические способы повышения чрескожной диффузии лекарственных веществ

Микроиглы

Для обеспечения и усиления транспортировки высокомолекулярных молекул (пептидов, белков, нуклеотидов) применяют физические методы, которые основаны на электрическом (ионофорез и электрофорез, электропорация) и механическом (микроиглы) воздействии на кожу.

Результаты воздействия на кожу микроигл для увеличения чрескожной диффузии показано на примере эмульсионной ТТС инсулина. Разработка конструкции ТТС с полыми микроиглами является трудной и затратной задачей. В связи с этим эксперименты проводили на модельной системе, состоящей из двух частей: ТТС с лекарственным веществом и аппликатор с неполыми микроиглами, который представлен на рисунке 4 слева.

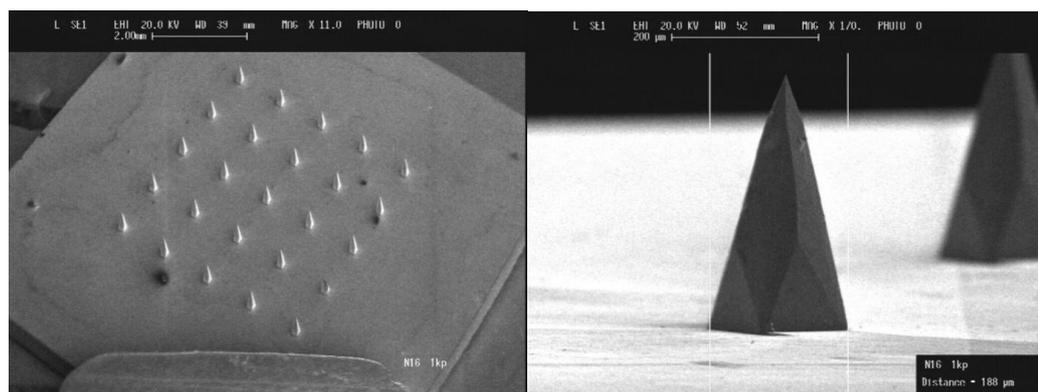


Рисунок 4 - Микрофотография кремневых игл для трансдермальных терапевтических системы: слева аппликатор с микроиглами, справа отдельная микроигла

Аппликаторы, изготовленные в НИИ физических проблем им. Ф.В. Лукина (г. Зеленоград) имели вид кремневых пластин размером 10×10 мм² с кремневыми микроиглами с защитным слоем из нитрида кремния на подложке.

В экспериментах были использованы аппликаторы с иглами длиной 40 мкм и 150 мкм. Расстояние между микроиглами на планшете в первом случае составило 250 мкм, а во втором случае - 500 мкм. Суть эксперимента заключалась в следующем: на лоскут выделенной кожи кролика накладывали планшет с микроиглами, затем всё вместе закрепляли между фланцами донорской и приемной камер диффузионной ячейки. Через определенное время иглы с кожи удаляли, и на кожу накладывали эмульсионную ТТС инсулина. Затем в ячейке Франца измеряли количество диффундировавшего ЛВ через неконсервированную кожу кролика с предварительным воздействием на нее микроигл.

В предварительном эксперименте *in vitro* было оценено влияние времени предварительной аппликации микроигл на диффузию инсулина из ТТС через неконсервированную кожу кролика в течение 24 часов и было выбрано время воздействия, равное 1 часу.

На рисунке 5 представлена динамика выхода инсулина *in vitro* из ТТС через неконсервированную кожу в течение 20 часов после предварительного воздействия на нее аппликатора с микроиглами длиной 40 мкм и 150 мкм. В качестве контроля исследовали диффузию инсулина из ТТС через неконсервированную кожу без предварительной аппликации микроигл.

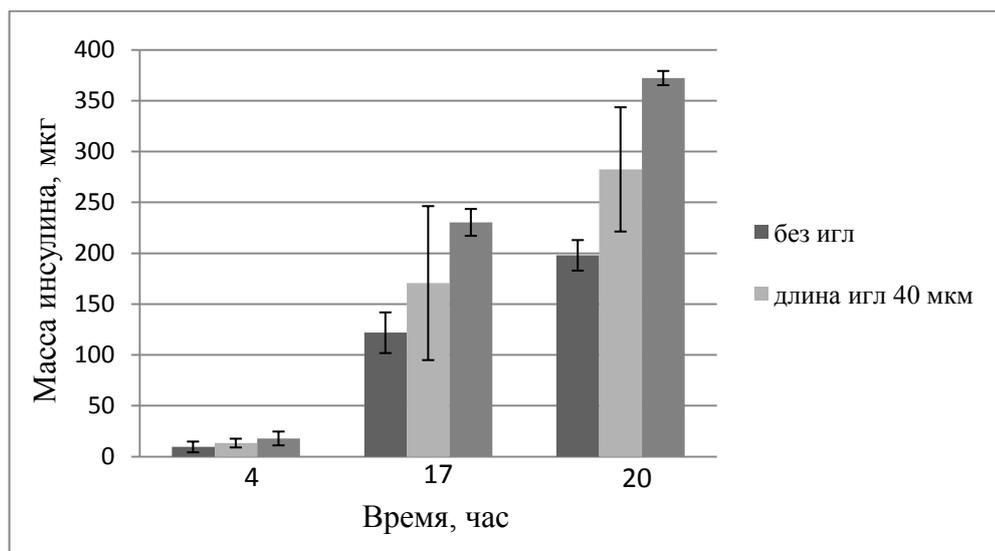


Рисунок 5 - Динамика выхода инсулина из трансдермальной терапевтической системы через неконсервированную кожу кролика *in vitro* после предварительной аппликации микроигл

Из представленной диаграммы следует, что масса прошедшего через кожу *in vitro* инсулина после предварительной аппликации микроигл длиной как 40 мкм, так и 150 мкм больше, чем в контрольных образцах. Таким образом, продемонстрирована принципиальная возможность усиления диффузии ЛВ при формировании в коже микроканалов с помощью кремниевых микроигл. Однако полученные результаты требуют дальнейшего изучения и усовершенствования конструкции микроигл, так как предварительная аппликация планшета с иглами до использования трансдермальной терапевтической системы не удобна в применении.

Исследования систем чрескожной доставки лекарственных веществ *in vivo*

Разработка системы чрескожной доставки – сложный и длительный процесс, включающий в себя не только поиски состава, конструкции, технологических решений, но и проведение различных исследований по безопасности применения разрабатываемого средства и оценки его функциональных свойств. Такие исследования включают в себя (рисунок б):

1. изучение биосовместимости разработанной системы чрескожной доставки в составе ТТС плацебо,
2. изучение содержания ЛВ в крови во время аппликации лабораторных образцов ТТС и в коже после их открепления,
3. изучение функциональной эффективности лабораторных образцов ТТС.



Рисунок 6 – Схема исследования разработанной системы чрескожной доставки лекарственного вещества в составе трансдермальной терапевтической системы

Исследование биологического действия систем чрескожной доставки

Исследования биологического действия разработанных систем чрескожной доставки в составе трансдермальных лекарственных форм проводили на полимерной и эмульсионной ТТС плацебо в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий» Часть 11 - Исследование общетоксического действия и Часть 10 - Исследования раздражающего и сенсибилизирующего действия совместно с сотрудниками испытательного лабораторного центра АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», г. Краснознаменск.

Исследования субхронической токсичности

Токсическое действие вспомогательных веществ лабораторных образцов ТТС на системы организма и внутренние органы животных при их многократном аппликационном применении оценивали на двух видах животных: крысах (самцах) и кроликах (самцах). Для субхронического эксперимента было изготовлено 182 лабораторных образца ТТС плацебо с полимерной СЧД, столько же образцов ТТС плацебо с эмульсионной.

Животные были рандомизированы по группам. В качестве критерия принимали массу тела: индивидуальное значение массы не должно было отклоняться от среднего более чем на 10%. Были сформированы три группы (контрольная и две опытные) крыс по 10 голов в каждой и три аналогичные группы кроликов по 3 головы в каждой. В течение 14 суток ежедневно животным подопытных групп на заранее выбритый участок кожи наклеивали ТТС плацебо площадью 10 см². В качестве контрольных групп были использованы интактные животные (крысы и кролики).

Проведенные исследования лабораторных образцов полимерной и эмульсионной ТТС плацебо в сравнении с группой интактных животных показали, что их непрерывная 14-дневная аппликация не вызывает нарушений функционального состояния основных органов и систем организма как крыс, так и кроликов.

Оценка раздражающего действия

Накожная аппликация трансдермальной терапевтической системы может вызывать местное раздражение кожи. Для оценки раздражающего действия полимерной и эмульсионной ТТС плацебо использовали половозрелых молодых кроликов породы Новозеландские белые весом от 2 до 3,7 кг только со здоровой кожей. Было две группы животных по три кролика в каждой для аппликации полимерной и эмульсионной ТТС плацебо. За сутки до проведения исследований выстригали шерсть на участках площадью примерно 10x10 см² по обеим сторонам спины. Аппликацию двух образцов ТТС плацебо размером 2,5x4,0 см² производили на кожу спины кролика с каждой стороны позвоночника и фиксировали повязкой. Через 24 часа снимали повязку и ТТС плацебо, отмечали положения участков аппликации и протирали их теплой водой. Регистрировали состояние каждого участка кожи, где производили аппликации, через 1, 24, 48 и 72 ч после удаления образцов.

Только у одного из трех кроликов через час после открепления эмульсионной ТТС плацебо была обнаружена слегка заметная эритема на обеих областях аппликации. Однако в последующие сутки эти признаки раздражения исчезли. У всех животных после открепления полимерной ТТС плацебо кожа в месте аппликации оставалась неповрежденной на протяжении всего периода исследования.

Таким образом, в ходе исследования установлено, что аппликация полимерной и эмульсионной ТТС плацебо не вызывает раздражающего действия на кожу кроликов.

Фармакокинетические исследования трансдермальной терапевтической системы аминоксидрофталазиндиона натрия с эмульсионной системой чрескожной доставки

Лекарственное вещество должно не только преодолеть кожный барьер, но и попасть в кровоток (исключение - ТТС с местными анальгетиками). Поэтому изучение *in vivo* содержания ЛВ в крови животного является следующим этапом разработки чрескожных систем доставки.

В качестве примера приведен сравнительный анализ фармакокинетических показателей крови при трансдермальном и внутримышечном введениях иммуномодулятора аминоксидрофталазиндиона натрия (Галавит®) кроликам (40 мг и 80 мг).

Усредненные фармакокинетические кривые аминоксидрофталазиндиона натрия при аппликации ТТС и внутримышечной инъекции в дозе 80 мг представлены на рисунке 7.

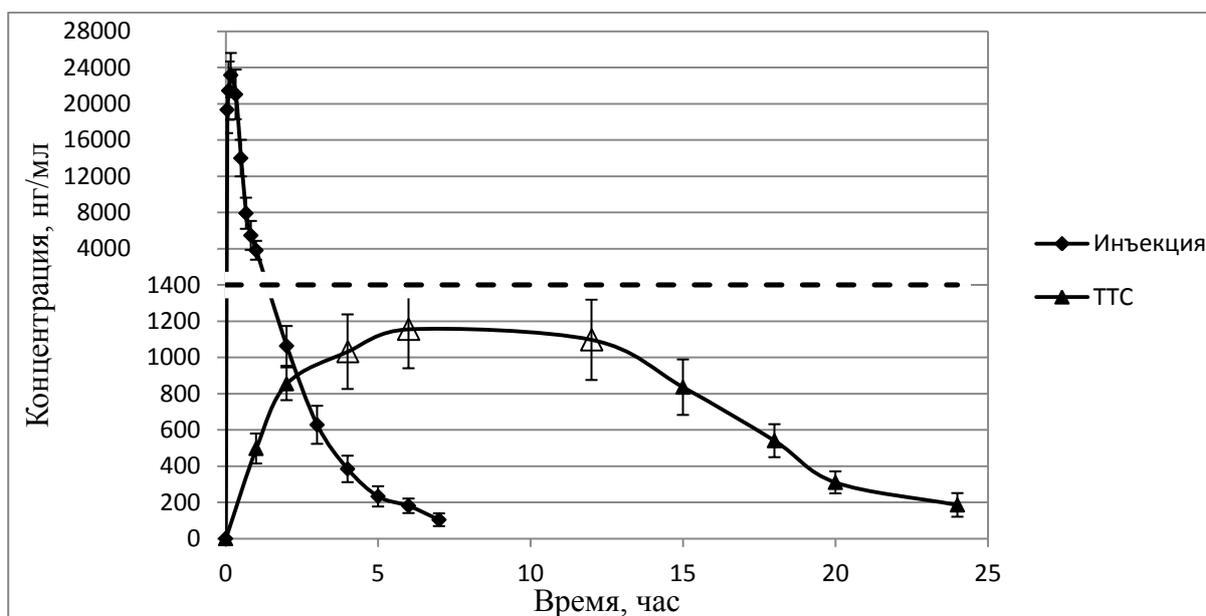


Рисунок 7 - Усредненная динамика концентрации ($\pm\sigma$) аминоксидрофталазиндиона натрия в плазме крови экспериментальных животных при внутримышечном и трансдермальном введениях дозы 80 мг. Различия значений точек (Δ) статистически не достоверны ($p>0,05$)

Как видно на рисунке, при дозе аминоксидрофталазиндиона натрия 80 мг максимальный уровень ЛВ в крови при внутримышечном введении достигался к 10 минуте и составил порядка $23,2\pm 1,0$ мкг/мл. Через 1 час после инъекции произошло резкое падение до $3,82\pm 0,42$ мкг/мл. После 7 часов концентрация иммуномодулятора была ниже уровня определения. При чрескожном поступлении препарата аминоксидрофталазиндиона натрия максимальная концентрация составила $1,16\pm 0,22$ мкг/мл через 6 часов с начала аппликации трансдермальной системы. Отметим, что с 4 по 12 час исследования значения концентрации ЛВ в крови животных

была практически постоянной ($p > 0,05$). Далее наблюдали постепенное снижение уровня ЛВ в крови. К 24 часам аппликации концентрация аминодигидрофталазиндиона натрия в крови животных составила $0,186 \pm 0,065$ мкг/мл.

Таким образом, при чрескожном введении аминодигидрофталазиндиона натрия наблюдалось длительное и равномерное поступление лекарственного вещества в кровь.

Рассчитанные фармакокинетические параметры при однократном трансдермальном и внутримышечном введениях иммуномодулятора двух различных доз (40 мг и 80 мг) экспериментальным животным представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Фармакокинетические параметры трансдермального и внутримышечного введения аминодигидрофталазиндиона натрия у кроликов

Параметры	Способ введения, доза			
	трансдермальный (n=3)		внутримышечный (n=3)	
	40 мг	80 мг	40 мг	80 мг
$C_{\text{макс}}$, мкг/мл	0,172	1,155	11,6	23,2
$T_{\text{макс}}$, ч	6	6	0,17	0,17
β , 1/ч	0,0702	0,1686	2,74	1,81
$T_{1/2}$, ч	9,8	4,6	0,25	0,38
AUC, ч·мкг /мл	4,7	18,6	7,21	17,54
AUMC, ч ² ·мкг /мл	39,4	187,7	3,98	14,71
MRT, ч	8,4	10,1	0,55	0,84

Снижение концентрации аминодигидрофталазиндиона натрия в крови после стационарного периода при аппликации ТТС характеризовалось временем половинного убывания $T_{1/2}$, которое составило примерно 9,8 часа для ТТС с содержанием 40 мг и 4,6 часа для дозы 80 мг. Среднее время удержания препарата в организме MRT было примерно равно 8,4 часа и 10,1 часа для меньшего и большего содержания ЛВ в ТТС соответственно.

При внутримышечном введении иммуномодулятора период полувыведения $T_{1/2}$ был равен 0,25 часа и 0,38 часа, а среднее время присутствия препарата в организме – 0,55 часа и 0,84 часа для дозы 40 мг и 80 мг.

Из анализа полученных результатов следует, что применение трансдермальной терапевтической системы по сравнению с внутримышечным введением увеличивает среднее время удержания препарата в организме более чем в 12–15 раз. Период полувыведения также увеличивается более чем в 10 раз, что способствует пролонгированию лекарственного эффекта.

Рассчитанная относительная биодоступность трансдермальной системы доставки, содержащей 40 мг аминодигидрофталазиндиона натрия составила 0,65, и для ТТС с 80 мг ЛВ - 1,06. Полученные результаты говорят о том, что при увеличении дозы ЛВ биодоступность трансдермальной системы доставки становится равной биодоступности при внутримышечном введении иммуномодулятора.

Остаточное количество лекарственного вещества в коже после применения трансдермальной терапевтической системы

Одним из преимуществ трансдермальных терапевтических систем перед традиционными способами введения лекарственных веществ считается немедленное прекращение действия препарата после удаления ТТС с кожи пациента, которое позволяет предотвратить развитие ряда побочных действий лекарственного вещества и избежать передозировки препарата. Однако по мере развития научных знаний об особенностях структуры и свойств кожи стало понятно, что при чрескожном введении существует вероятность накопления лекарственных веществ в глубоких слоях дермы с последующей их диффузией в кровоток даже после снятия ТТС. Следует заметить, что данные, полученные при изучении остаточного количества лекарственного вещества в коже после окончания его трансдермального введения, могут внести существенные изменения в схему применения ТТС.

Для исследования количества ЛВ в коже после прекращения аппликации трансдермальной терапевтической системы были выбраны ТТС аминодигидрофталазиндиона натрия (20 мг) (иммуномодулятор) и ТТС диацетат бис(1-винилимидазол-N) цинка (100 мг) (антидот угарного газа) на основе эмульсионной системы чрескожной доставки.

Аппликацию лабораторных образцов ТТС производили на предварительно выбритые участки кожи спины кроликов-самцов породы Шиншилла у основания шеи в течение 24 часов. Для каждой лекарственной субстанции были проведены исследования содержания ЛВ в коже сразу после открепления ТТС, через 4 часа, одну, две и три недели после удаления лекарственной формы. После того, как кролики были выведены из эксперимента, для анализа забирали кожный лоскут с того места спины, где была наклеена лекарственная форма.

Подкожно-жировую клетчатку (ПЖК) отделяли от дермы и все измельчали. Растворение кожи и подкожно-жировой клетчатки проводили отдельно при 60⁰С и постоянном перемешивании в растворе 0,2М фосфатного буфера с добавлением этилендиаминтетрауксусной кислоты, ацетилцистеина и папаина.

Количество диацетат бис(1-винилимидазол-N) цинка в растворе определяли методом атомно-адсорбционной спектроскопии. Количество аминодигидрофталазиндиона натрия в растворе определяли методом ВЭЖХ.

В таблице 5 представлено количество иммуномодулятора, содержащееся в коже и подкожно-жировой клетчатке кроликов на разных сроках после удаления ТТС.

Таблица 5 – Количество аминодигидрофталазиндион натрия в коже кроликов на разных сроках после открепления трансдермальной терапевтической системы

Объект исследования	Количество лекарственного вещества после открепления трансдермальной терапевтической системы, мг			
	Сразу (n=3)	Через 4 часа (n=3)	Через 1 неделю (n=3)	Через 2 недели (n=2)
Кожа	0,51±0,02	0,10±0,002	0,013±0,005	0,0021±0,0004
Подкожно-жировая клетчатка	0,006±0,003	0,005±0,002	0,005±0,001	0,0013±0,0005

Как видно из таблицы в кожном лоскуте, контактировавшем с ТТС в течение 24 часов, сразу после её открепления присутствует 0,516 мг аминодигидрофталазиндиона натрия. На протяжении последующих двух недель наблюдается снижение содержания ЛВ в коже, причем существенное уменьшение количества иммуномодулятора происходит уже в первые 4 часа и составляет 0,41 мг. Данная величина может быть терапевтически значимой в случае трансдермального введения, учитывая небольшую суточную дозу препарата Галавит® (25 мг, перорально). Таким образом, активное вещество, которое будет продолжать поступать в кровоток после снятия ТТС с кожи, может компенсировать временную задержку начала действия трансдермальной лекарственной формы иммуномодулятора, что необходимо принимать во внимание при разработке схемы её длительного применения.

Аналогичная серия экспериментов была проведена для лабораторных образцов ТТС с антидотом угарного газа. В кожном лоскуте, контактировавшем с ТТС в течение 24 часов, сразу после её открепления, активное вещество присутствовало в количестве примерно 1 мг (таблица 6).

Таблица 6 – Остаточное количество диацетат бис(1-винилимидазол-N) цинка в коже кроликов на разных сроках после открепления трансдермальной терапевтической системы

Объект исследования	Количество лекарственного вещества после открепления трансдермальной терапевтической системы, мг			
	Сразу (n=3)	Через 4 часа (n=3)	Через 1 неделю (n=3)	Через 2 недели (n=2)
Кожа	0,92±0,01	0,89±0,03	0,63±0,02	0,19±0,05
Подкожно-жировая клетчатка	0,06±0,03	0,06±0,02	0,05±0,08	0,04±0,03

Через 4 часа после удаления ТТС количество лекарственного вещества в коже и подкожно-жировой клетчатке практически не изменилось. Через одну и две недели количество антидота диацетат бис(1-винилимидазол-N) цинка незначительно снижалось и составило ~ 0,7 мг и ~ 0,25 мг соответственно. Таким образом, количество выводимого из кожи активного вещества в неделю, равное 0,3-0,4 мг, является ничтожно малым в

сравнении с необходимой суточной дозой препарата (120 мг перорально) и не может оказывать значимого терапевтического действия.

Через 3 недели после открепления трансдермальной терапевтической системы для обоих ЛВ количество активного вещества в коже было на уровне нижнего предела чувствительности используемых количественных методов.

Исследования трансдермального способа введения аминодигидрофталазиндиона натрия показали, что кожа может являться депо ЛВ и пролонгировать его действие даже после снятия ТТС. В случае с диацетат бис(1-винилимидазол-N) цинка подобного эффекта обнаружено не было, что связано, по-видимому, с разной растворимостью исследуемых лекарственных веществ в биоткани.

Таким образом, при разработке системы чрескожной доставки конкретного лекарственного вещества необходимо исследовать возможное его накопление в слоях кожи в концентрациях, оказывающих терапевтическое действие.

Исследование функциональных свойств трансдермальных терапевтических систем с разработанными системами чрескожной доставки на экспериментальных моделях

В зависимости от того, к какой фармакотерапевтической группе относится активное вещество трансдермальной системы доставки, определяют экспериментальные модели проводимого исследования фармакологической эффективности.

Трансдермальная терапевтическая система аминодигидрофталазиндиона натрия с эмульсионной чрескожной системой доставки: испытания *in vivo* на модели обширной резекции печени

Большой интерес вызывает проблема ускоренного восстановления печени после обширной резекции у онкологических больных, а также у доноров при родственной трансплантации правой доли печени. В экспериментальных исследованиях обычно используют модель обширной резекции печени (ОРП). Этот вид операции относится к критической травме, так как при этом удаляют 60% и более общей массы органа, и часто возникают клинические проявления острой печеночной недостаточности в постоперационном периоде.

Известно, что митотическая (пролиферативная) активность гепатоцитов снижена в первые сутки после операции, однако уже на вторые сутки отмечается её повышение. Максимальная митотическая и функциональная активность гепатоцитов наблюдается между вторыми и пятыми сутками после резекции. В научной литературе описаны исследования положительного влияния однократного введения различных иммуномодуляторов на процесс восстановления тканей печени в эксперименте. Можно предположить, что использование пролонгированной лекарственной формы иммуномодулятора в виде трансдермальной терапевтической системы позволит усилить естественный процесс регенерации ткани печени за счет поддержания постоянной ЛВ в крови в течение необходимого времени.

Эксперименты по изучению влияния чрескожного введения иммуномодулятора аминоксидогидрофталазиндиона натрия на восстановительные процессы в печени после ОРП в экспериментах *in vivo* на ранних сроках была выполнена на 22 крысах-самцах породы Вистар весом 350-380 г на модели обширной резекции печени. Перед моделированием ОРП оперируемых крыс наркотизировали ингаляционно диэтиловым эфиром. С соблюдением правил асептики и антисептики вскрывали брюшную полость, выводили печень в рану и последовательно накладывали лигатуры на основания срединной, левой боковой и правой верхней долей печени, после чего удаляли ~70% общей массы печени. Операцию проводили в утренние часы (в период с 10 до 12 часов), когда суточный ритм митотической активности клеток печени минимален.

Все животные после обширной резекции печени были разделены на две группы. Первую группу (n=10) составили животные с ОРП без лечения. Во второй группе (n=12) сразу после резекции печени проводили аппликацию лабораторных образцов ТТС Галавит® (10 см²) в области спины крыс на участки кожи, с предварительно удаленным волосным покровом. Каждая ТТС содержала 40 мг ЛВ. Продолжительность эксперимента составила 48 часов с однократной заменой ТТС через 24 часа от начала аппликации.

Для оценки динамики восстановления массы печени у каждого оперированного животного сразу после ОРП взвешивали на электронных весах Ohaus Explorer (Switzerland) удаленную часть печени, которую принимали за 70% от общей массы печени. Затем на основании этих данных рассчитывали исходную массу остатка печени для каждого животного. Далее через 48 часов иссекали оставшуюся часть печени, измеряли ее массу и сравнивали полученные значения с рассчитанной исходной массой остатка печени для данного животного. Данный срок исследования был выбран, так как из научных публикаций известно, что отчетливые признаки усиления пролиферативной активности клеток печени после ОРП появляются лишь через 48 часов после выполнения этой операции.

Кроме того, определяли биохимические показатели крови: общий белок, альбумин, мочевины, креатинин и печеночные ферменты цитолиза: аланиновую аминотрансферазу, аспарагиновую аминотрансферазу и щелочную фосфатазу. Для этого у крысы под эфирным наркозом надсекали кончик хвоста, пипеткой забирали кровь (28-32 мкл) и наносили ее на тест-полоски Reflotron™, которые сразу же устанавливали в биохимический анализатор Reflotron™ («Roche», Швейцария). В качестве контроля была использована кровь интактных животных (n=4).

Эффективность стимулирующего воздействия чрескожного введения иммуномодулятора на процессы регенерации печени после ОРП оценивали по митотической активности гепатоцитов в остатке резецированной печени. Для этого были приготовлены гистологические препараты иссеченной печени с последующим подсчетом в них митотического индекса (МИ) - количество митотически делящихся клеток на 1000 проанализированных клеток. Для каждого образца на гистологическом срезе ткани печени, окрашенном гематоксилином и эозином, при увеличении микроскопа x400 (Leica LMLS), определяли количество фигур митоза и среднее (общее)

количество клеток. Использовали формулу: $МИ = (M/N) \cdot 1000$, где M – сумма делящихся клеток, N – общее число проанализированных клеток. Митотический индекс выражали в промилле.

Результаты эксперимента показали, что прирост массы остатка печени у опытных животных через 48 часов после резекции составил $43 \pm 10\%$ в группе с ОРП без лечения; в группе животных с ОРП и аппликацией ТТС Галавит® на таком же сроке - $39 \pm 9\%$. Достоверного различия в массе прироста остатка печени не выявлено.

При сравнении биохимических показателей крови на сроке 48 часов после ОРП нами не было обнаружено положительного влияния чрескожного введения иммуномодулятора Галавит® на процессы восстановления печеночного гомеостаза в организме крыс.

Исследование митотической активности гепатоцитов печени через 48 часов после ОРП, оцениваемой по митотическому индексу, позволило установить достоверное ее увеличение в обеих группах по сравнению с исходным значением (до резекции печени), равным $0,14 \pm 0,07\%$. В первой группе животных (ОРП без лечения) величина МИ после 48 часов ОРП в среднем составила $12,70 \pm 4,90\%$, тогда как во второй группе (с аппликацией ТТС Галавит® сразу после ОРП) значение МИ в среднем достоверно выше - $17,43 \pm 4,90\%$, ($p \leq 0,05$).

Обнаруженное стимулирующее воздействие чрескожного введения иммуномодулятора Галавит® на митотическую активность клеток печени подтверждается результатами сравнительного морфологического анализа гистологических препаратов ткани печени. Наблюдали более высокую митотическую активность гепатоцитов через 2 суток в группе 1 с ОРП (рисунок 8б) по сравнению с исходной тканью (рисунок 8а) и еще более выраженные проявления митотической активности гепатоцитов в группе 2 при аппликации ТТС иммуномодулятора (рисунок 8в).

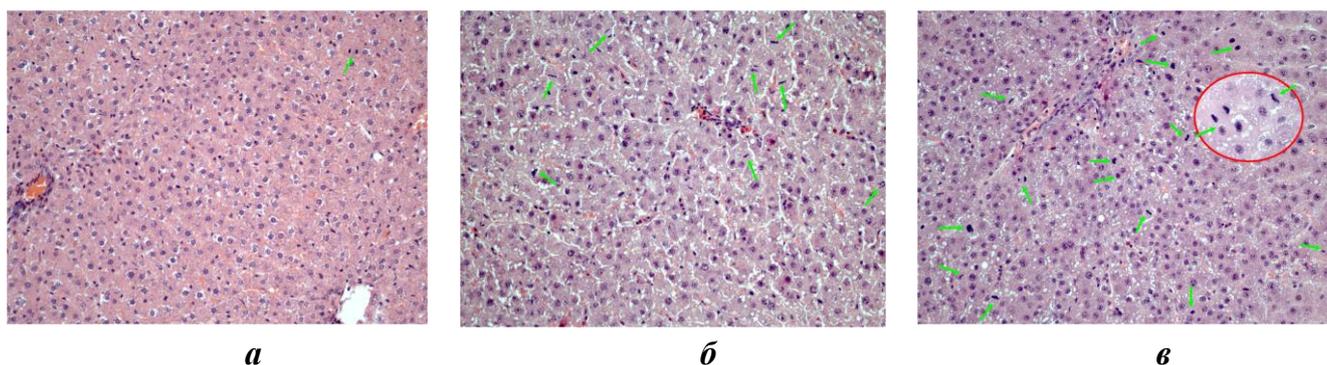


Рисунок 8 – а) Гистологическая картина исходной ткани печени крысы. Одиночные фигуры митозов в паренхиме (указано стрелкой); б) Митотическая активность гепатоцитов через 48 часов после обширной резекции печени. Стрелками указаны гепатоциты в стадии митоза; в) Митотическая активность гепатоцитов через 48 часов после обширной резекции печени и аппликации трансдермальной терапевтической системы иммуномодулятора. Многочисленные фигуры митозов в поле зрения (указано стрелками); (а, б, в – окрашивание гематоксилином и эозином, ув. $\times 200$, в выделенной области ув. $\times 400$)

Отметим, что во всех группах животных летальность отсутствовала в течение всего срока эксперимента.

Таким образом, результаты изучения митотической активности гепатоцитов после обширной резекции печени в исследуемых группах животных показали, что ОРП индуцирует пролиферативную активность гепатоцитов, а чрескожное введение иммуномодулятора Галавит® после ОРП оказывает стимулирующее воздействие на пролиферацию гепатоцитов в остатке резецированной печени. Усиление пролиферативной активности гепатоцитов сопровождается адаптивной перестройкой метаболизма этих клеток, что, по-видимому, и предопределило отсутствие положительного влияния ТТС иммуномодулятора на биохимические показатели печеночного гомеостаза на сроке 48 часов после ОРП.

Трансдермальная терапевтическая система инсулина с эмульсионной чрескожной системой доставки: испытания *in vivo* на модели сахарного диабета

Исследование функциональной активности разработанной эмульсионной системы чрескожной доставки было проведено *in vivo* при аппликации ТТС инсулина у крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Была изготовлена лабораторная партия ТТС с эмульсионной СЧД инсулина площадью 4 см², содержащая 100 Ед гормона. В качестве подопытных животных было использовано 25 крыс-самцов линии Вистар массой тела 230-250 г.

Экспериментальный сахарный диабет вызывали внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (Sigma, США). Стрептозотоцин, обладающий избирательным токсическим действием в отношении β -клеток поджелудочной железы, вводили каждому животному внутрибрюшинно по 12 мг/кг/сут. в течение 5 дней подряд (суммарная доза – 70 мг/кг). Как показали ранее проведенные исследования, дробное введение стрептозотоцина вызывает окончательную гибель β -клеток, обусловленную развитием аутоиммунного процесса, характерного для сахарного диабета 1 типа у людей.

Для исключения случаев спонтанной реверсии у животных с экспериментальным сахарным диабетом в исследованиях использовали только крыс со стабильным диабетическим статусом. У всех животных уровень гипергликемии через 2 недели после последнего введения стрептозотоцина составлял не менее 25 ммоль/л. Подопытные животные со стойким экспериментальным сахарным диабетом были рандомизированы на опытную (n=15) и контрольную (n=10) группы.

На участок кожи спины крысы с удаленным волосяным покровом помещали лабораторные образцы ТТС инсулина и дополнительно фиксировали бинтами для предотвращения ее удаления животными. Исследование функциональной эффективности лабораторных образцов ТТС инсулина проводили на протяжении 4 суток с ежедневной заменой исследуемой лекарственной формы. Всем экспериментальным животным опытной группы до начала аппликации ТТС инсулина, во время аппликации и после снятия образца измеряли уровень глюкозы в крови 1 раз в сутки в одно и то же время. В течение всего эксперимента у крыс контрольной

группы также ежедневно определяли уровень гликемии. Концентрацию глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены крысы, измеряли с помощью глюкометра One Touch Select (Life Scan Johnson & Johnson, США).

Результаты исследования показали, что средняя величина уровня глюкозы в крови у крыс до аппликации ТТС инсулина составила $28,4 \pm 2,3$ ммоль/л. У всех животных опытной группы на фоне аппликации ТТС инсулина наблюдали снижение уровня глюкозы в крови. Средний показатель гликемии составил $21,2 \pm 3,1$ ммоль/л, что достоверно ниже по сравнению с исходным значением ($p < 0,001$). Максимальное снижение зафиксировано на уровне 38%, минимальное - 13%.

Через 1 и 3 суток после снятия ТТС инсулина средний уровень глюкозы в группе опытных животных повысился с $21,2 \pm 3,1$ ммоль/л до $24,6 \pm 6,8$ ммоль/л и $24,2 \pm 7,0$ ммоль/л, соответственно, что является статистически достоверным ($p < 0,05$).

Заметим, что у некоторых крыс после открепления образцов ТТС отмечали более медленный рост гликемии. В качестве примера на рисунке 9 приведен график изменения гликемии для двух животных.

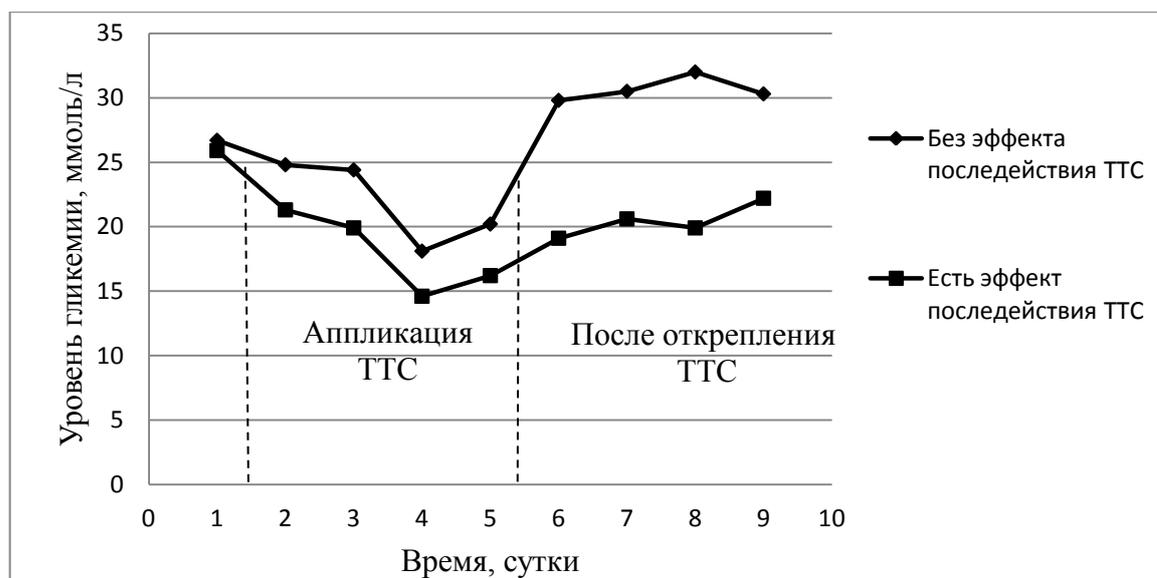


Рисунок 9 - Динамика гликемии у двух крыс во время аппликации трансдермальной терапевтической системы инсулина и после ее открепления

На графике видно, что уже после первых суток аппликации ТТС инсулина у обоих животных происходило снижение концентрации глюкозы в крови. У одной крысы (нижняя кривая) среднее снижение на время аппликации трансдермальной системы по сравнению с уровнем гликемии до аппликации составило 30,5%, а у второй крысы (верхняя кривая) – 18%. В следующие 4 суток после открепления образца среднее увеличение уровня глюкозы в крови у первой крысы составило 12%, у второй – 29% по сравнению с уровнем глюкозы во время аппликации ТТС.

Сравнивая динамику уровня гликемии у данных животных, можно предположить наличие в ряде случаев эффекта последействия ТТС инсулина. Это, вероятно, обусловлено накоплением гормона в коже или подкожной клетчатке животного и

формированием своеобразного депо инсулина, что может быть связано с индивидуальными физиологическими особенностями животного, например, уровнем метаболизма. Такой эффект наблюдали у 8 экспериментальных животных из 15.

Проведенные исследования показали достоверное снижение уровня глюкозы крови у крыс с экспериментальным сахарным диабетом при использовании разработанной эмульсионной системы чрескожной доставки.

Трансдермальная терапевтическая система инсулина с эмульсионной чрескожной системой доставки: исследования с участием добровольцев с сахарным диабетом 1 и 2 типа

Были проведены исследования эмульсионной ТТС инсулина с участием двух пациентов-добровольцев с сахарным диабетом. Разрешение на проведение данных исследований было получено с согласия этического комитета ГУ НИИТиИО МЗ РФ (протокол заседания № 4 от 14 октября 2004 г.) на Ученом совете ГУ НИИТиИО МЗ РФ (протокол заседания № 6 от 5 ноября 2004 г.).

Способ применения заключался в аппликации ТТС инсулина на внутреннюю поверхность плеча пациента. Уровень сахара в крови регистрировался пациентами самостоятельно с помощью глюкометров. Во время испытаний трансдермальной системы пациенты соблюдали рекомендуемую врачом-эндокринологом диету. ТТС, площадью 10 см², содержала 100 Ед гормона. Лабораторные образцы трансдермальной терапевтической системы инсулина наклеивали вечером (на ночь) с учетом 10-часовой задержки выхода гормона после начала аппликации.

У первой пациентки аппликация ТТС скомпенсировала сниженную вдвое дозу утреннего пролонгированного инсулина, вводимого путем подкожных инъекций. Так же следует отметить тенденцию к стабилизации уровня гликемии в течение суток. У второй пациентки введенная доза инсулина при аппликации ТТС скомпенсировала половину дозы препарата, вводимого инъекционно.

Побочных эффектов и аллергических реакций со стороны кожных покровов не наблюдалось за все время аппликации ТТС у обоих пациентов.

Таким образом, полученный эффект снижения дозы пролонгированного инсулина у пациента с сахарным диабетом I типа и у пациента с инсулинпотребным диабетом II типа при аппликации эмульсионной ТТС инсулина, демонстрирует возможность трансдермального переноса биологически активного гормона.

Трансдермальная терапевтическая система кофеина с полимерной чрескожной системой доставки: исследования с участием здоровых добровольцев

Для подтверждения фармакологической эффективности полимерной ТТС кофеина были проведены пилотные клинические исследования. В исследование было включено 14 практически здоровых мужчин-добровольцев в возрасте от 28 до 44 лет. Испытания проводились на базе ФГУ «1-й научно-исследовательский институт МО» (г. Купавна) в установленном порядке. Исследование осуществлялось слепым, рандомизированным, плацебо-контролируемым методом. Каждый испытуемый

участвовал в двух суточных экспериментах, один из которых проводился с использованием ТТС, содержащей 50 мг кофеин-бензоата, а другой - с использованием ТТС плацебо.

На протяжении суток (с 9 часов утра до 10 часов утра следующего дня) проводили комплексное обследование испытуемых.

Исследование динамики психофизиологического состояния операторов при аппликации лабораторных образцов полимерной ТТС плацебо показало, что в ходе суточного эксперимента у испытуемых возникает комплекс психофизиологических изменений, свидетельствующих о развитии утомления, которое было наиболее выражено в ночные и ранние утренние часы: значительно ухудшалось самочувствие, снижалась активность, возрастал уровень тревожности и психического утомления, замедлялась сенсомоторная реактивность, снижалась выносливость к физическим нагрузкам. Наиболее отчетливо психостимулирующее действие лабораторных образцов ТТС кофеина проявлялось при оценке субъективного состояния самочувствия, активности и настроения операторов по тестам САН и уровню реактивной тревожности по тесту Спилбергера-Ханина. В ночное время препарат задерживал и предупреждал появление субъективных признаков утомления. Так, значимое ухудшение самочувствия и активности наступало позже (в 6.00 утра), чем после приема плацебо (в 2.00 ночи) и было менее длительным. ТТС кофеина предотвращал также повышение ситуативной тревожности, наблюдаемое на фоне ТТС плацебо с 2.00 ночи до 10.00 утра.

Через 7 часов после применения ТТС кофеина показатели теста на кратковременную зрительную память имели тенденцию к улучшению по сравнению с исходным уровнем, что не наблюдалось после использования плацебо. Через 19 часов с момента аппликации лекарственная форма в отличие от ТТС плацебо способствовала снижению количества ошибочных ответов в реакции выбора.

Исследование биоэлектрической активности мозга выявило значимый психостимулирующий эффект трансдермальной формы кофеина на центральную нервную систему. По влиянию на узкие частотные диапазоны ЭЭГ ее действие достоверно отличалась от ТТС плацебо. Она имела типичный для психостимулирующих средств фармако-ЭЭГ профиль в виде усиления мощности ритмов бета1- и бета2-диапазонов.

Проведенные пилотные клинические исследования с участием здоровых добровольцев показали, что трансдермальная терапевтическая система, содержащая 50 мг кофеина, вызывает центральные и периферические эффекты, характерные для кофеина. Обнаружено, что эффекты, полученные при применении ТТС, длятся дольше (до 23 часов), чем после приема таблетированной формы кофеина (6-12 часов). При однократном применении ТТС кофеина позволяет ослабить и предотвратить снижение активности, ухудшение самочувствия и повышенную тревожность, возникающих через 15 часов непрерывной деятельности.

На основании результатов собственных исследований в работе предложен и экспериментально обоснован алгоритм для создания безопасных и эффективных полимерной и эмульсионной систем чрескожной доставки лекарственных веществ (рисунок 10).

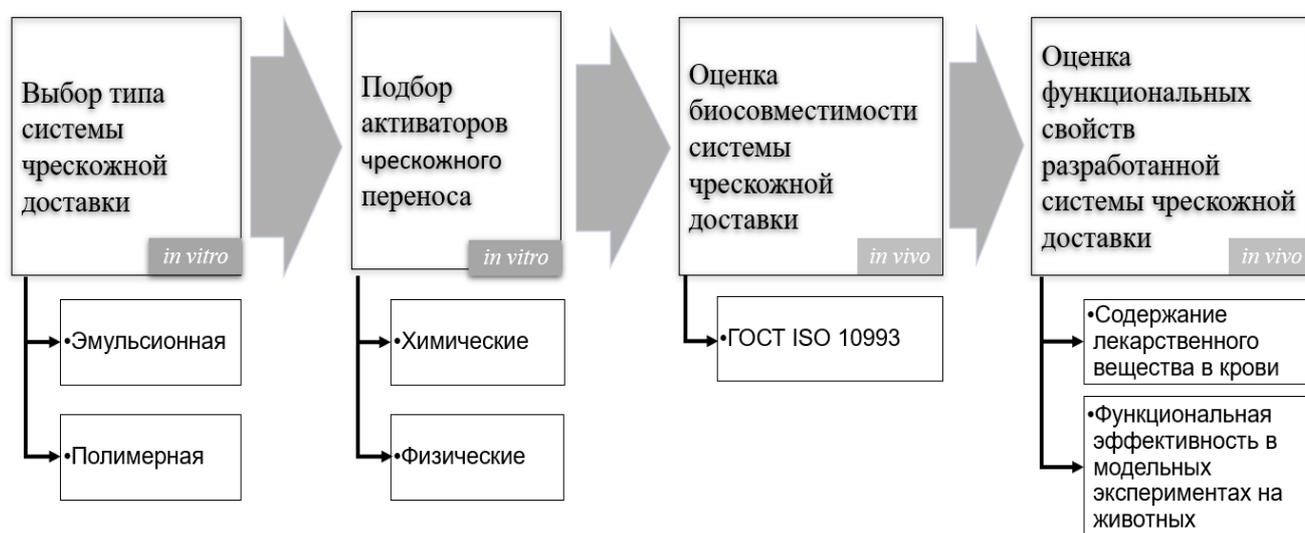


Рисунок 10 – Алгоритм создания систем чрескожной доставки лекарственных веществ

Эффективность предложенного алгоритма была доказана при разработке 6 полимерных и 6 эмульсионных систем чрескожной доставки для следующих лекарственных веществ: пропранолола, хлорпроамида, ацетилсалициловой кислоты, кофеина, лидокаина, феназепам, инсулина, тестостерона, анилокаина, Ацизола®, Галавита® и циклоспорина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С развитием новых биомедицинских технологий – технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины резко возрос интерес к разработкам новых неинвазивных систем доставки биологически активных веществ, в том числе и лекарственных в качестве поддерживающей терапии, обеспечивающей благоприятные условия для сохранения жизнеспособности и функциональной активности имплантированных клеточно- и тканеинженерных конструкций. Такими перспективными системами являются полимерные и эмульсионные системы чрескожной доставки лекарственных веществ. При разработке и исследовании СЧД был решен ряд взаимосвязанных задач: выбор типа и состава системы чрескожной доставки, доказательство биосовместимости СЧД в составе трансдермальной терапевтической системы, подтверждение функциональной эффективности СЧД и др.

Была разработана биосовместимая эмульсионная композиция, обеспечивающая чрескожную диффузию как низко-, так и высокомолекулярных лекарственных веществ, растворимых в водных средах. Экспериментально доказана эффективность найденного чрескожного переносчика докюзата натрия в составе эмульсионных композиций при исследовании диффузии *in vitro* низкомолекулярного вещества бромокаина и высокомолекулярного инсулина через неконсервированную кожу кролика. Показано, что дополнительное введение в состав разработанной эмульсионной композиции таких химических активаторов переноса как водный экстракт коры дуба, масло ядер косточек абрикоса, α -токоферола ацетата увеличивает скорость чрескожной диффузии лекарственных веществ различной молекулярной массы.

Предложены и экспериментально обоснованы алгоритмы выбора типа полимерной и эмульсионной систем чрескожной доставки для лекарственных веществ, обладающих различными физико-химическими свойствами, а также оптимизация их состава. На примере антидота угарного газа диацетат бис (1-винилимидазол-N) цинка (Ацизол®) и психостимулятора кофеина было показано, что терапевтическую концентрацию Ацизола® в крови пациента обеспечивает эмульсионная СЧД. Напротив, для кофеина терапевтический эффект достигается при выборе более простой полимерной СЧД, что было подтверждено в ограниченном клиническом исследовании ТТС кофеина с участием здоровых добровольцев

В работе предложен и экспериментально обоснован двухэтапный *in vitro* скрининг-метод подбора оптимального состава эмульсионных систем чрескожной доставки на примере эмульсионной СЧД иммуномодулятора аминодигидрофталазиндиона натрия. Данный подход основан на последовательном использовании синтетической мембраны и неконсервированной кожи кролика при исследовании диффузии лекарственного вещества в ячейках Франца.

Биологическое действие СЧД оценивали по результатам изучения субхронической токсичности и местно-раздражающего действия полимерной и эмульсионной ТТС плацебо на двух видах животных (кролики и крысы) в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993. Проведенные исследования показали, что 14-дневная аппликация полимерной и эмульсионной ТТС плацебо не вызывает нарушений функционального состояния

основных органов лабораторных животных. Также установлено, что аппликация не вызывает раздражающего действия на кожу.

Для доказательства возможности использования эмульсионной СЧД в качестве поддерживающей терапии при физиологической регенерации поврежденных органов была выбрана модель обширной резекции печени (ОРП), а в качестве ЛВ – синтетический иммуномодулятор. Исследования показали, что чрескожное введение иммуномодулятора аминодигидрофталазиндион натрия оказывает выраженное стимулирующее воздействие на митотическую активность клеток печени. Найденная закономерность подтверждается результатами сравнительного морфологического анализа гистологических препаратов ткани печени. В контрольной группе животных с ОРП без аппликации ТТС через 2 суток наблюдали более высокую митотическую активность гепатоцитов, по сравнению с исходной тканью. Вместе с тем, еще более выраженные (достоверные) проявления митотической активности гепатоцитов были в группе животных с ОРП с аппликацией ТТС иммуномодулятора.

Фармакокинетические исследования дают представление о чрескожном поступлении ЛВ в организм, подтверждая и дополняя ранее проведенные исследования *in vitro*. Показано, что применение эмульсионной трансдермальной терапевтической системы по сравнению с внутримышечным введением увеличивает среднее время удержания препарата в организме более чем в 12 раз, а период полувыведения - более чем в 10 раз, что может способствовать пролонгированию терапевтического эффекта. Рассчитанная относительная биодоступность трансдермальной системы доставки, содержащей 80 мг аминодигидрофталазиндиона натрия, составила 1,06, что соответствует биодоступности при внутримышечном введении иммуномодулятора в той же дозе.

Как известно, одним из преимуществ трансдермальных терапевтических систем перед традиционными способами введения лекарственных веществ считается немедленное прекращение действия препарата при откреплении ТТС с кожи пациента. Было обнаружено, что в течение не менее двух недель после прекращения 24-часовой аппликации ТТС в коже кролика определяется количество лекарственного вещества, потенциально способного оказывать терапевтическое действие.

При исследовании функциональной эффективности эмульсионной системы чрескожной доставки инсулина в модельных экспериментах *in vivo* показано достоверное снижение уровня глюкозы в крови у крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Снижение составило 26 ± 8 % относительно исходных значений, в то время как в контрольной группе крыс гликемия оставалась стабильно высокой на протяжении всего эксперимента и составляла $28,4 \pm 1,4$ ммоль/л.

Проведены предварительные исследования пролонгированного действия эмульсионной ТТС инсулина у добровольцев с сахарным диабетом 1 и 2 типа. Было показано, что однократная аппликация лабораторных образцов ТТС, содержащая 100 Ед гормона, позволила поддерживать нормальный уровень сахара в крови в течение 48 часов на фоне двукратного ежесуточного снижения пациентами дозы инъекционного пролонгированного инсулина.

В ходе выполнения данной работы и последующих исследований предложенный алгоритм или его составляющие были применены на разных стадиях разработки биосовместимых и функционально эффективных систем чрескожной доставки различных лекарственных веществ (таблица 7).

Таблица 7 - Трансдермальные терапевтические системы на основе разработанных систем чрескожной доставки

№	Наименование	Назначение	Тип системы чрескожной доставки
1	ТТС пропранолола	Гипотензивное средство	полимерная
2	ТТС хлорпропамида	Сахарный диабет II типа	полимерная
3	ТТС ацетилсалициловой кислоты*	Противовоспалительное, антитромботическое средство	полимерная
4	ТТС инсулина	Сахарный диабет I типа	эмульсионная
5	ТТС кофеина	Психостимулирующее средство	полимерная
6	ТТС лидокаина	Местное обезболивающее средство	полимерная
7	ТТС анилокаина	Местное обезболивающее средство	эмульсионная
8	ТТС Ацизола®	Антидот угарного газа	эмульсионная
9	ТТС феназепам	Транквилизатор	полимерная
10	ТТС тестостерона*	Гормональное средство	эмульсионная
11	ТТС Галавита®	Иммуномодулятор	эмульсионная
12	ТТС циклоспорина	Иммуносупрессор	эмульсионная

*Трансдермальные терапевтические системы (ТТС), не вошедшие в данную работу

Таким образом, основные результаты работы можно сформулировать следующим образом:

- предложен и экспериментально обоснован алгоритм создания биосовместимых и функционально эффективных полимерных и эмульсионных систем чрескожной доставки лекарственных веществ;

- доказана биосовместимость и функциональная эффективность разработанных полимерных и эмульсионных систем доставки для лекарственных веществ различной растворимости и молекулярной массы;

- показана перспективность применения систем чрескожной доставки ЛВ для поддерживающей терапии в технологиях тканевой инженерии и регенеративной медицины;

- доказано возможность создания систем чрескожной доставки для веществ с молекулярной массой более 500 Да;

- подвергнуто сомнению одно из преимуществ трансдермальной формы ЛВ – прекращение его действия после открепления ТТС.

ВЫВОДЫ

1. Предложен и экспериментально обоснован общий алгоритм создания чрескожных биосовместимых полимерной и эмульсионной систем доставки лекарственных веществ.
2. Разработана биосовместимая эмульсионная композиция, содержащая анионное поверхностно-активное вещество диоктилсульфосукцинат натрия в качестве переносчика для чрескожной доставки как низко-, так и высокомолекулярных лекарственных веществ, растворимых в водных средах.
3. Экспериментально обоснованы алгоритмы выбора типа полимерной и эмульсионной систем чрескожной доставки для лекарственных веществ, обладающих различными физико-химическими свойствами, а также оптимизации их состава.
4. Показано, что дополнительное введение в состав эмульсионной композиции таких химических активаторов переноса как водный экстракт коры дуба, масло косточки ядер абрикоса, α -токоферола ацетата увеличивает скорость чрескожной диффузии лекарственных веществ различной молекулярной массы.
5. Разработан двухэтапный *in vitro* скрининг-метод подбора оптимального состава композиций для эмульсионных системы чрескожной доставки с последовательным использованием синтетической мембраны и неконсервированной кожи в диффузионных ячейках Франца.
6. Биологическое действие разработанных полимерной и эмульсионной систем чрескожной доставки соответствует требованиям стандартов серии ГОСТ Р ИСО 10993 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий», часть 10 и часть 11, что доказано на двух видах животных.
7. Применение разработанной эмульсионной системы чрескожной доставки, по сравнению с внутримышечным введением, позволяет увеличить период полувыведения иммуномодулятора более чем в 10 раз, что обуславливает пролонгированное действие лекарственного вещества.
8. Функциональная эффективность разработанной эмульсионной системы доставки инсулина подтверждена в модельных экспериментах *in vivo* на крысах с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа и результатами пилотного клинического исследования с участием добровольцев с сахарным диабетом 1 и 2 типа.
9. Эффективность полимерной системы чрескожной доставки доказана в ограниченном клиническом исследовании трансдермальной терапевтической системы кофеина с участием здоровых добровольцев. Однократная аппликация лабораторных образцов трансдермальной терапевтической системы кофеина предотвращает снижение активности и повышенную тревожность, возникающих через 15 часов непрерывной суточной деятельности в стрессовых ситуациях.

10. Показана возможность применения чрескожной системы доставки для поддерживающей терапии в технологиях регенеративной медицины. На модели обширной резекции печени крыс обнаружено, что аппликация трансдермальной формы с эмульсионной чрескожной системой доставки иммуномодулятора аминоксидигидрофталазиндиона натрия стимулирует процессы регенерации печени.
11. После прекращения аппликации трансдермальной системы остаточное количество лекарственного вещества в коже может определяться в течение не менее двух недель, что свидетельствует о возможной пролонгации его терапевтического действия.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При предварительном выборе вида системы чрескожной доставки лекарственных веществ конкретного лекарственного вещества следует учитывать его молекулярную массу и растворимость в различных средах.
2. Для стабилизации и уменьшения размера частиц эмульсионных композиций до размеров порядка 1-10 мкм рекомендуется использовать ультразвуковой гомогенизатор (частота колебаний 24 кГц, механическая амплитуда 33 мкм, мощность 11,0 Вт, режим работы: действие 0,5 сек., пауза 0,5 сек.).
3. Для определения предварительного состава системы чрескожной доставки для конкретного лекарственного вещества целесообразно использовать синтетические тест-системы, представленные мембраной Strat-M, затем для окончательного выбора лучшего состава использовать биологические тест-системы, представленные лоскутом неконсервированной кожи кролика.
4. Оптимальный состав полимерной или эмульсионной системы чрескожной доставки определяется по значению скорости диффузии лекарственного вещества через кожу в экспериментах *in vitro*, при которой возможно достижение его терапевтической концентрации в крови.
5. Исследования чрескожной диффузии лекарственных веществ через неконсервированную кожу кролика рекомендуется проводить на кожных лоскутах, выделенных с брюшной области с предварительно удаленным волосяным покровом. Для учета индивидуальных особенностей кожи отдельной особи следует проводить исследование не менее чем на трех кроликах, используя от каждого от 3 до 5 лоскутов кожи.
6. Необходимо определять количество лекарственного вещества в коже после окончания аппликации трансдермальной терапевтической системы для оценки возможной пролонгации терапевтического эффекта. Рекомендуется растворять подкожно-жировую клетчатку и кожный лоскут в растворе фосфатного буфера с добавлением ацетилцистеина, ЭДТА и папаина. Папаин следует использовать в концентрации 2,5 мг/мл для подкожно-жировой клетчатки и 5 мг/мл для кожи.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Севастьянов, В.И. Трансдермальные системы введения инсулина / В.И. Севастьянов, Л.А. Саломатина, Е.Г. Кузнецова, Н.В. Яковлева, В.И. Шумаков // Медицинская техника. – 2003. - № 2. - С. 21-25.
2. Кузнецова, Е.Г. Трансдермальные коллагенсодержащие системы доставки инсулина / Е.Г. Кузнецова, Л.А. Саломатина, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2003. - № 4. - С. 59-63.
3. Севастьянов, В.И. Матричные и резервуарные трансдермальные терапевтические системы инсулина на основе нетканых и полимерных материалов / В.И. Севастьянов, Л.А. Саломатина, Е.Г. Кузнецова, О.М. Собко, В.И. Шумаков // Перспективные материалы. – 2004. - № 4. - С. 44-48.
4. Собко, О.М. Первый опыт клинического применения трансдермальной терапевтической системы инсулина / О.М. Собко, Е.Г. Кузнецова, Л.А. Саломатина, Т.Н. Гончарова, В.И. Севастьянов, В.И. Шумаков // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2004. - № 2. - С. 45-46.
5. Севастьянов, В.И. Трансдермальная лекарственная форма ацизола - антидота угарного газа / В.И. Севастьянов, Л.А. Саломатина, Е.Г. Кузнецова, М.В. Серегина, Ю.Б. Басок // Перспективные материалы. – 2008. - № 6. – С. 55-59.
6. Курылева, О.М. Исследования специфической эффективности трансдермальной терапевтической системы кофеина на здоровых добровольцах / О.М. Курылева, О.Н. Грачева, О.А. Вятлева, Е.Г. Кузнецова, Л.А. Саломатина, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2008. - № 1. - С. 40-44.
7. Саленко, Ю.А. Трансдермальная терапевтическая система кофеина как средство коррекции психофизиологического состояния человека при длительной операторской деятельности без сна / Ю.А. Саленко, О.Н. Грачева, О.А. Вятлева, Е.Г. Кузнецова, Л.А. Саломатина, В.И. Севастьянов // Военно-медицинский журнал. – 2008. - № 3. - С. 89-90.
8. Кузнецова, Е.Г. Матричные трансдермальные системы доставки кофеина на основе полимерной и эмульсионной композиций / Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, Л.А. Саломатина, В.И. Севастьянов // Медицинская техника. – 2008. - № 3. - С. 33-35.
9. Kuznetsova, E.G. Matrix transdermal systems for caffeine delivery based of polymer and emulsion compounds / E.G. Kuznetsova, О.М. Kuryleva, L.A. Salomatina, V.I. Sevastyanov // J. Biomedical Engineering. – 2008. - Vol. 42. - № 3. - P. 141-144.
10. Рыжикова, В.А. Влияние активатора переноса на функциональные свойства матричных трансдермальных терапевтических систем бромакаина / В.А. Рыжикова, А.А. Тихобаева, Л.А. Саломатина, С.В. Курсаков, Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, В.И. Севастьянов // Перспективные материалы. – 2014. - № 2. - С. 26-32.

11. Ryzhikova, V.A. Effect of the transfer activator on functional properties of the bromocain matrix transdermal therapeutic systems / V.A. Ryzhikova, A.A. Tikhobayeva, L.A. Salomatina, S.V. Kursakov, E.G. Kuznetsova, O.M. Kuryleva, V.I. Sevastianov // Inorganic Materials: applied research. – 2014. - Vol. 5. - № 5. - P. 498–503.
12. Рыжикова, В.А. Определение стабильности трансдермальной терапевтической системы местного анестетика бромокаина / В.А. Рыжикова, Е.Г. Кузнецова, В.Ю. Белов, Л.А. Саломатина, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. - № 4. – С. 89-95.
13. Кузнецова, Е.Г. Трансдермальный перенос лекарственных веществ и способ его усиления / Е.Г. Кузнецова, В.А. Рыжикова, Л.А. Саломатина, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. - Т. 17 - № 2. — С. 152-162.
14. Кузнецова, Е.Г. Микроиглы как способ увеличения трансдермальной доставки инсулина / Е.Г. Кузнецова, В.А. Рыжикова, Л.А. Саломатина, В.А. Тукмачев, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. - № 4. - С. 87-92.
15. Кузнецова, Е.Г. Исследование характеристических параметров микроэмульсионной композиции для трансдермальной доставки инсулина / Е.Г. Кузнецова, В.А. Рыжикова, Л.А. Саломатина, В.И. Севастьянов // Разработка и регистрация лекарственных средств – 2017. – № 2(19). – С. 66-72.
16. Кузнецова, Е.Г. Специфическая эффективность микроэмульсионной матричной трансдермальной терапевтической системы инсулина (экспериментальная модель сахарного диабета 1 типа) / Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, Л.А. Саломатина, Г.Н. Скалецкая, Н.Н. Скалецкий, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017 – № 3. – С. 40-45.
17. Курсаков, С.В. Разработка и валидация методики определения витамина Е в микроэмульсионных композициях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / С.В. Курсаков, Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, Л.А. Саломатина, В.И. Севастьянов // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – № 3(24). – С. 88-95.
18. Кузнецова, Е.Г. Исследование возможности трансдермального переноса циклоспорина на модельных системах / Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, Л.А. Саломатина, В.Ю. Белов, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. - № 1 - С. 135-141.
19. Кузнецова, Е.Г. Экспериментальное исследование диффузии иммуномодулятора Галавит® в модельной системе / Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, Л.А. Саломатина, В.И. Севастьянов // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т. 9. - № 1. – С. 92-97.

20. Курсаков, С.В. Разработка и валидация методики определения глюкозаминилмурамилдипептида в водных растворах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / С.В. Курсаков, Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, Л.А. Саломатина, С.В. Гурьянова, О.Ю. Борисова, Г.О. Гудима, В.И. Севастьянов // Иммунология. – 2020. - Т. 41. - № 1. – С. 74–82.
21. Кузнецова, Е.Г. Влияние компонентов микроэмульсионной системы на трансдермальный перенос иммуномодулятора глюкозаминилмурамилдипептида / Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, Л.А. Саломатина, С.В. Курсаков, С.В. Гурьянова, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. - № 3. – С. 149-155.
22. Кузнецова, Е.Г. Применение синтетической и биологической тест-системы при разработке трансдермальных терапевтических систем / Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, Л.А. Саломатина, В.И. Севастьянов // Перспективные материалы. – 2020. - № 8.- С. 49-59.
23. Kuznetsova, E.G. The combined use of synthetic and biological test systems in the development of transdermal therapeutic systems / E.G. Kuznetsova, O.M. Kuryleva, L.A. Salomatina, V.I. Sevastianov // Inorganic Materials: applied research. – 2021. - № 12. – P. 386–392.
24. Кузнецова, Е.Г. Сравнительный анализ фармакокинетических параметров трансдермального и внутримышечного введений препарата Галавит® / Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, Л.А. Саломатина, С.В. Курсаков, З.З. Гоникова, А.О. Никольская, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2021. – Т. 23. - № 2. – С. 114-121.
25. Кузнецова, Е.Г. Влияние трансдермальной терапевтической системы иммуномодулятора на регенерационную активность печени / Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, Л.А. Саломатина, Л.А. Кирсанова, З.З. Гоникова, А.О. Никольская, Н.П. Шмерко, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2022. – Т. 24. - № 1. – С. 89-95.
26. Кузнецова, Е.Г. О возможности терапевтического действия после окончания аппликации трансдермальной системы доставки лекарственных веществ / Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, Л.А. Саломатина, С.В. Курсаков, В.Ю. Белов, З.З. Гоникова, Ю.Б. Басок, В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2022. – Т. 24. - № 2. – С. 119-124.

ГЛАВА В КНИГЕ

1. Севастьянов В.И., Саломатина Л.А., Тихобаева А.А., Басок Ю.Б., Курылева О.М., Алексеева О.С., Кузнецова Е.Г. Трансдермальные терапевтические системы. В книге: Биосовместимые материалы (учебное пособие) / под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. – Москва : МИА, 2011. - Часть III. - Глава 2. – С. 309-345.

ПАТЕНТ

1. **Севастьянов В.И., Саломатина Л.А., Кузнецова Е.Г., Тихобаева А.А.** Микроэмульсионные композиции для создания трансдермальных и трансмукозальных форм фармацевтических средств и косметических препаратов, и способ их получения. Патент на изобретение RU 2481822 С1, 20.05.2013 (заявка № 2012106092/15 от 21.02.2012). Дата регистрации 20.05.2013, опубликовано 20.05.2013, Бюл. №14.

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

1. **Kuznetsova E.G.**, Salomatina L.A., Skaletskiy N.N., Sevastianov V.I. Transdermal insulin delivery systems with collagen matrix. 1st EUFEPS Conference on Optimising Drug Delivery and Formulation: New Challenges in drug Delivery, 2003, Versailles, France, P. 177-178.
2. **Кузнецова Е.Г.**, Саломатина Л.А., Курылева О.М., Севастьянов В.И. Трансдермальная терапевтическая система как альтернативный способ введения пролонгированного инсулина. Материалы XII Российского национального конгресса «Человек и лекарство», 18-22 апреля 2005, Москва, С. 674.
3. **Kuznetsova E.G.**, Kuryleva O.M., Salomatina L.A., Sevastianov V.I. Transdermal delivery of insulin from synthetic matrix: experimental investigation and clinical studies. Abstracts: XXXII Annual ESAO Congress, 5-8 October 2005, Bologna – Italy. The International Journal of Artificial Organs. - 2005- Vol. 28. - № 9. - P. 896.
4. **Kuznetsova E.G.**, Kuryleva O.M., Salomatina L.A., Sevastianov V.I. Comparative analysis of different types of transdermal insulin delivery systems. 5th World Meeting on Pharmaceutical, Biopharmaceutical and Pharmaceutical Technology. 27-30 March 2006, Geneva.
5. Рыжикова В.А., Саломатина Л.А., Тихобаева А.А., **Кузнецова Е.Г.**, Севастьянов В.И. Влияние активатора переноса на диффузию бромокаина из матричных трансдермальных терапевтических систем. Материалы VII всероссийского съезда трансплантологов, 28-30 мая 2014 года, Москва. Вестник трансплантологии и искусственных органов. - 2014. – Т. 16. – № S. - С. 280.
6. Белов В.Ю., **Кузнецова Е.Г.**, Курылева О.М., Саломатина Л.А., Севастьянов В.И. Применение метода ВЭЖХ для количественного определения циклоспорина при разработке трансдермальной терапевтической системы. Материалы IX всероссийского съезда трансплантологов, 17-19 сентября 2018 года, Москва. Вестник трансплантологии и искусственных органов. - 2018. – Т. 20. – № S. - С. 139.
7. **Кузнецова Е.Г.**, Курылева О.М., Саломатина Л.А., Севастьянов В.И. Экспериментальное исследование чрескожного переноса иммуномодулятора галавит. Материалы IV Российского национального конгресса «Трансплантация и донорство органов», 7-9 октября 2019 года, Москва. Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21 – № S. - С. 154.

8. **Кузнецова Е.Г.**, Курылева О.М., Саломатина Л.А., Курсаков С.В., Севастьянов В.И. Влияние компонентов микроэмульсионной композиции на чрескожную диффузию иммуномодулятора синтетической природы. Материалы X Всероссийского съезда трансплантологов, 5-7 октября 2020 года, Москва. Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. - № S. – С. 146.
9. **Кузнецова Е.Г.**, Курылева О.М., Саломатина Л.А., Курсаков С.В., Гоникова З.З., Севастьянов В.И. Исследования *in vivo* содержания иммуномодулятора аминодигидрофталазиндиона натрия в коже животного при трансдермальном способе введения. Материалы V Российского национального конгресса трансплантологов, 27-29 сентября 2021 года, Москва. Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2021. – Т. 23. - № S. – С. 158.
10. **Kuznetsova E.G.**, Kuryleva O.M., Salomatina L.A., Sevastianov V.I. The role of synthetic and biological test systems in the development of transdermal drug delivery systems. International Conference and Exhibition on the Future of Pharmaceuticals and Novel Drug Delivery Systems. 28-29 March, 2022, Paris, France, p. 33-34.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВВ – вспомогательное вещество

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ЛВ – лекарственное вещество

МИ – митотический индекс

МНН – международное непатентованное название

ОРП – обширная резекция печени

ПЛГА – полилактид-ко-гликолид

СЧД – система чрескожной доставки

ТТС – трансдермальная терапевтическая система

ФИТЦ – флуоресцеинизотиоцианат

ЭЭГ – электроэнцефалография

Выражаю огромную благодарность своему учителю и наставнику д.б.н., профессору В.И. Севастьянову, а также сотрудникам отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России: Л.А. Саломатиной, к.м.н. О.М. Курылевой, к.б.н. А.О. Никольской, к.б.н. З.З. Гониковой, к.б.н. В.А. Рыжиковой, к.б.н. Л.А. Кирсановой, а также д.м.н. М.Ю. Шагидулину за их неоценимую помощь и участие в проведении экспериментальных исследований.