

Міністерство охорони здоров'я України

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Кваліфікаційна наукова

праця на правах рукопису

Пелех-Бондарук Ірина Романівна

УДК: 615.014.2:(615.451.3+615.454.1):615.262:613.495:543.395

**РОЗРОБКА СКЛАДУ, ТЕХНОЛОГІЇ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ
ЕМУЛЬСІЙНИХ ЗАСОБІВ З ДОПОМІЖНИМИ РЕЧОВИНАМИ
МІКРОБНОГО ПОХОДЖЕННЯ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ У
ДЕРМАТОЛОГІЇ**

226 – фармація, промислова фармація

22 – охорона здоров'я

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ **І.Р. Пелех-Бондарук**

Науковий керівник: **Білоус Світлана Богданівна**, доктор фармацевтичних наук,
професор

Львів-2023

АНОТАЦІЯ

Пелех-Бондарук І.Р. Розробка складу, технології та дослідження емульсійних засобів з допоміжними речовинами мікробного походження для застосування у дерматології. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 “Фармація, промислова фармація” (22 “Охорона здоров’я”). – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, МОЗ України, Львів, 2023.

Дисертаційна робота присвячена вивченню можливості застосування поверхнево-активних речовин мікробного походження як перспективних допоміжних речовин у складі емульсійних лікарських та косметичних засобів.

На сьогоднішній день спостерігається стійка тенденція до створення лікарських засобів для нашкірного застосування та косметичної продукції з високим вмістом водної фази. Саме такі засоби вимагають включення значної кількості допоміжних речовин, номенклатура яких на даний час в медицині та косметології є достатньо широкою. Більшість допоміжних компонентів за структурою є поверхнево-активними речовинами, які можуть викликати побічні реакції. Практично всі поверхнево-активні речовини здатні видаляти з поверхні тіла жироподібні речовини, а саме тонку захисну плівку, яку утворюють сальні та потові залози. Крім того, вони змінюють проникність мембран клітин шкіри для певних речовин.

У зв’язку з вищевказаним актуальним є пошук нових ефективних допоміжних речовин для застосування у складі емульсійних лікарських та косметичних засобів, які були б безпечними для людини, не володіли токсичними та алергенними властивостями.

Одними із найбільш важливих допоміжних речовин, які застосовуються в емульсійних засобах для нашкірного застосування є консерванти та емульгатори, концентрацію яких слід застосовувати відповідно до вимог нормативних документів та підтверджувати експериментально.

Проаналізовано склад лікарських засобів для нашкірного застосування, зареєстрованих в Державному реєстрі лікарських засобів України станом на травень 2018 року, які належать до групи D за АТС класифікацією, та проведено вивчення даних наукової літератури щодо розробки нових лікарських засобів емульсійного типу.

Аналіз складу допоміжних речовин даних засобів показав, що в якості емульгаторів 1-го роду для створення емульсійних лікарських засобів, в основному, використовуються полісорбати, як емульгатори 2-го роду найчастіше зустрічаються цетостеариловий спирт та ланолін. Як консерванти до складу емульсійних лікарських засобів для нашкірного застосування найчастіше входять парабени або їх суміші, а також спирт бензиловий.

Для створення стійкої емульсійної системи м/в необхідно застосовувати значну кількість емульгатора одного типу, що може викликати місцеве подразнення та руйнування шкірно-епідермального бар'єру. Саме тому застосовують поєднання емульгаторів 1-го та 2-го роду, а також до складу емульсійних засобів вводять високомолекулярні сполуки.

Останнім часом активно досліджується новий клас продуктів мікробного синтезу – біогенні поверхнево-активні речовини, біоПАР або біосурфактанти. У складі лікарських та косметичних засобів біогенні ПАР можуть виконувати функції антимікробних консервантів, емульгаторів, антиоксидантів, солюбілізаторів та інших допоміжних речовин, і можуть у майбутньому замінити синтетичні ПАР.

БіоПАР належать до типових амфіфільних сполук, які володіють такими ж фізико-хімічними властивостями, як і синтетичні сурфактанти.

Дуже велика кількість мікроорганізмів продукують біоПАР, які відрізняються за своєю структурою і властивостями. Однак виробництво біоПАР є молодого галуззю біотехнологій, і не достатньо розвинуте. Проте позитивні результати, отримані у різних лабораторіях світу, дають підстави розглядати їх як заміну синтетичним ПАР.

Нормативно-правова база щодо біотехнологічних речовин в Україні та світі розробляється активно протягом останні 10-15 років. Нормативні документи щодо біотехнологічних лікарських засобів, які розроблені та затверджені в Україні, уніфіковані з європейськими документами.

Розроблено загальний план досліджень з вивчення консервуючої та емульгуючої активності поверхнево-активних речовин мікробного походження на основі рамноліпідів *Pseudomonas* sp. PS-17 під умовною назвою біокомплекс PS та обґрунтовано послідовність етапів дослідження.

Для дослідження поверхнево-активних речовин мікробного походження вибрано емульсійні основи типу “масло у воді” та “вода у маслі”, оскільки емульсійні форми становлять близько 90% всіх косметичних засобів та значну частину лікарських засобів для нашкірного застосування. Саме такі дослідження є найбільш показовими.

При проведенні контролю якості досліджуваних зразків емульсійних засобів дотримувались методик та рекомендацій, наведених у ДФУ 2.0., зокрема вимог загальної статті «М'які лікарські засоби для нашкірного застосування». У процесі виконання роботи використовували органолептичні, фізико-хімічні, технологічні, мікробіологічні та фармакологічні методи досліджень, що дозволяють об'єктивно оцінити зразки емульсійних засобів.

З метою вивчення консервуючої активності біокомплексу PS розроблено 10 складів емульсійних кремів кожного типу емульсії з різною концентрацією біокомплексу PS від 0,025% до 0,1%, а також з сумісним застосуванням біокомплексу PS з іншими відомими консервантами - парабенами (ніпагін та ніпазол), натрію бензоатом, бензалконію хлоридом та композицією наночастинок срібла у матриці натрію хлориду. Встановлено, що у мінімальній концентрації 0,025 % біокомплекс PS може бути використаний як консервант лише у емульсіях типу в/м з незначним вмістом водної фази (до 30%). Використання біокомплексу PS у концентраціях 0,05 та 0,1 % відповідає фармакопейним критеріям прийнятності ефективності антимікробних консервантів для емульсійних засобів двох типів, а сумісне використання

біокомплексу PS з натрію бензоатом та бензалконію хлоридом підсилює консервуючу активність останніх, що дозволяє зменшити концентрацію консервантів у складі емульсійних засобів.

На першому етапі дослідження емульгуючої активності біокомплексу PS було застосовано емпіричний підхід до вибору концентрації біокомплексу PS, зокрема було досліджено декілька складів емульсій типу м/в з вмістом масляної фази 30%, у яких біокомплекс PS використано як самостійний емульгатор, а також емульсії, у яких біокомплекс PS використано як співемульгатор у поєднанні з емульгаторами другого роду – ланоліном та гліцерину моностеаратом. Встановлено, що створення стабільних емульсій м/в вимагає застосування високих концентрацій біокомплексу PS як самостійного емульгатора, більше 10%, що є недоцільним та економічно необґрунтованим. Поєднання емульгаторів другого роду з біокомплексом PS у співвідношенні 70:30 дозволяє одержувати стабільні емульсії при використанні порівняно невисокої кількості комплексного емульгатора, 7-10%.

Вибір концентрації емульгаторів на основі експериментальних досліджень є досить вартісним і вимагає тривалого часу на проведення досліджень. Для зменшення кількості технологічних експериментів при розробці емульсійних засобів, стабілізованих біокомплексом PS, розроблено та використано метод комп'ютерного моделювання складу емульсій у програмі MO Excel, який базується на застосуванні системи гідрофільно-ліпофільного балансу. Комп'ютерне моделювання дає можливість обґрунтувати склад олійної фази емульсії при використанні біокомплексу PS як самостійного емульгатора або встановити співвідношення між біокомплексом PS та емульгатором II роду при використанні комплексного емульгатора.

Узагальнено інформацію щодо особливостей дослідження стабільності та встановлення терміну придатності м'яких лікарських та косметичних засобів, визначено перелік необхідних досліджуваних характеристик, умов та частоти випробування та розроблено алгоритм дослідження стабільності, який буде доцільно застосувати на етапі розробки емульсійних засобів з біокомплексом PS.

Дослідження стабільності емульсійних засобів включає визначення органолептичних і фізико-хімічних показників, активності антимікробних консервантів та мікробіологічної чистоти.

Алергенні властивості біокомплексу PS досліджено методом внутрішньошкірної сенсibiliзації морських свинок. Встановлено, що біокомплекс PS не викликає достовірних змін у периферичній крові тварин та змін алерготестів, що свідчить про відсутність алергізації організму.

Подразнювальну дію біокомплексу PS досліджено шляхом внесення біопрепарату в розведенні 1:10 в кон'юнктивальний мішок ока кроля. Встановлено, що при нанесенні на слизові оболонки біокомплекс PS чинить слабку подразнювальну дію. Відновлення офтальмо статусу спостерігалось на 2-гу добу без проведення лікувальних заходів.

Технологія емульсійних засобів типу м/в, стабілізованих біокомплексом PS апробована в умовах промислового виробництва натуральної доглядової косметики марки ED Cosmetics, Львів, Україна.

Результати дисертаційних досліджень впроваджено у навчальний процес закладів вищої освіти фармацевтичного профілю України.

Ключові слова: біокомплекс PS, рамноліпіди, поверхнево-активні речовини, біоПАР, емульсійні засоби, креми, емульгатори, консерванти, допоміжні речовини, технологія, фармацевтична розробка, дерматологія.

SUMMARY

Pelekh-Bondaruk I.R. Development of the composition, technology and study of emulsion products with excipients of microbial origin for use in dermatology. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for obtaining the degree of Doctor of Philosophy in specialty 226 "Pharmacy, industrial pharmacy" (22 "Health care"). – Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Lviv, 2023.

The dissertation is dedicated to the study of the possibility of using surface-active substances of microbial origin as promising auxiliary substances in the composition of emulsion medicinal and cosmetic products.

To date, there is a steady trend towards the creation of medicinal products for skin application and cosmetic products with a high content of the aqueous phase. Such products require the inclusion of a significant number of auxiliary substances, the nomenclature of which is currently quite wide in medicine and cosmetology. Most of the auxiliary components are surface-active substances by structure, which can cause side reactions. Almost all surfactants are able to remove fatty substances from the surface of the body, namely the thin protective film formed by the sebaceous and sweat glands. In addition, they change the permeability of skin cell membranes for certain substances.

In connection with the above, the search for new effective auxiliary substances for use in the composition of emulsion medicinal and cosmetic products, which would be safe for humans, and do not possess toxic and allergenic properties, is urgent.

The most important auxiliary substances used in emulsion products for skin application are preservatives and emulsifiers, the concentration of which should be used in accordance with the requirements of regulatory documents and confirmed experimentally.

The composition of medicinal products for cutaneous use, registered in the State Register of Medicinal Products of Ukraine on May 2018, which belong to group D according to the ATC classification, was analyzed, and the study of scientific literature data on the development of new emulsion-type medicinal products was conducted.

The analysis of the composition of excipients of these products showed that polysorbates are mainly used as emulsifiers of the 1st type to create emulsion medicines, and cetostearyl alcohol and lanolin are most often used as emulsifiers of the 2nd type. Parabens or their mixtures, as well as benzyl alcohol, are often included as preservatives in the composition of emulsion medicines for skin application.

To create a stable emulsion system o/w, it is necessary to use a significant amount of emulsifiers of the 1st type, which can cause local irritation and destruction of the skin-epidermal barrier. That is why a combination of emulsifiers of the 1st and 2nd types is used, as well as high molecular weight compounds are introduced into the composition of emulsifiers.

A new class of products of microbial synthesis - biogenic surfactants or biosurfactants has been actively researched recently. In the composition of medicinal and cosmetic products, biogenic surfactants can perform the functions of antimicrobial preservatives, emulsifiers, antioxidants, solubilizers and other auxiliary substances, and may replace synthetic surfactants in the future.

Biosurfactants belong to typical amphiphilic compounds that have the same physicochemical properties as synthetic surfactants.

A very large number of microorganisms produce biosurfactants, which differ in their structure and properties. The production of biosurfactants is a young branch of biotechnology and is not sufficiently developed. However, the positive results obtained in various laboratories around the world give reason to consider them as a substitute for synthetic surfactants.

The regulatory framework for biotechnological substances in Ukraine and the world has been actively developed over the past 10-15 years. Normative documents regarding biotechnological medicinal products that are developed and approved in Ukraine are unified with European documents.

A general research plan to study the preservative and emulsifying activity of surface-active substances of microbial origin based on the rhamnolipids of *Pseudomonas* sp. PS-17 under the conventional name biocomplex PS has been developed and the sequence of research stages is substantiated.

For the study of surface-active substances of microbial origin, emulsion bases of the type "oil in water" and "water in oil" were chosen, since emulsion forms make up about 90% of all cosmetics and a significant part of medicines for topical use. Such studies are the most revealing.

During quality control of the studied samples of emulsion products, the methods and recommendations given in SPhU 2.0 were followed, in particular the requirements of the general article "Semi-solid medicinal preparations for topical use". Organoleptic, physico-chemical, technological, microbiological and pharmacological research methods were used in the process of work, allowing for objective evaluation of samples of emulsion products.

In order to study the preservative activity of the biocomplex PS, 10 formulations of emulsion creams of each type of emulsion were developed with different concentrations of the biocomplex PS from 0.025% to 0.1%, as well as with the combined use of the biocomplex PS with other known preservatives - parabens (Nipagin and Nipazole), sodium benzoate, benzalkonium chloride and the composition of silver nanoparticles in the sodium chloride matrix. It was established that at a minimum concentration 0.025% the biocomplex PS can be used as a preservative only in emulsions of the w/o type with a small content of the aqueous phase (up to 30%). The use of the biocomplex PS in concentrations 0.05 and 0.1% meets the pharmacopoeial criteria for the acceptance of the effectiveness of antimicrobial preservatives for emulsion products of two types. The combined use of the biocomplex PS with sodium benzoate and benzalkonium chloride enhances the preservative activity of the latter, which allows reducing the concentration of preservatives in the composition of emulsions products.

At the first stage of the study of the emulsifying activity of the biocomplex PS, an empirical approach was applied to the selection of the concentration of the biocomplex PS. Several compositions of o/w emulsions with 30% of oil phase were studied, in which the biocomplex PS was used as an independent emulsifier, as well as emulsions in which biocomplex PS was used as a co-emulsifier in combination with emulsifiers of the second type - lanolin and glycerol monostearate. It was established

that the creation of stable o/w emulsions requires the use of high concentrations of biocomplex PS as an independent emulsifier, more than 10%, which is impractical and economically unjustified. The combination of emulsifiers of the second type with biocomplex PS in a ratio 70:30 allows obtaining stable emulsions when using a relatively low amount of complex emulsifier, 7-10%.

Choosing the concentration of emulsifiers based on experimental studies is quite expensive and requires a long time to conduct studies. In order to reduce the number of technological experiments in the development of emulsion products stabilized by biocomplex PS, a method of computer simulation of the composition of emulsions in the MO Excel program was developed and used, which is based on the application of the hydrophilic-lipophilic balance system. Computer modeling makes it possible to substantiate the composition of the oil phase of the emulsion when using the biocomplex PS as an independent emulsifier or to establish the relationship between the biocomplex PS and the 2nd type emulsifier when using a complex emulsifier.

The information on the peculiarities of the stability study and establishing the shelf life of semi-solid medicinal and cosmetic products is summarized. The list of the necessary research characteristics, conditions and test frequency is determined, and the algorithm of the stability study is developed, which will be expediently applied at the stage of the development of emulsion products with the biocomplex PS. The study of the stability of emulsion products includes the determination of organoleptic and physicochemical indicators, the activity of antimicrobial preservatives and microbiological purity.

The allergenic properties of the biocomplex PS were investigated by the method of intradermal sensitization of guinea pigs. It has been established that the biocomplex PS does not cause reliable changes in the peripheral blood of animals and changes in allergy tests, which indicates the absence of sensitization of the body.

The irritant effect of the biocomplex PS was investigated by introducing the biological preparation in a 1:10 dilution into the conjunctival sac of the rabbit eye. It was established that when applied to the mucous membranes, the biocomplex PS has a

weak irritating effect. Restoration of the ophthalmic status was observed on the 2nd day without treatment.

The technology of o/w emulsion products stabilized by biocomplex PS has been tested in the conditions of industrial production of natural care cosmetics of the brand ED Cosmetics, Lviv, Ukraine.

The results of the dissertation research are implemented in the educational process of higher education institutions of the pharmaceutical profile of Ukraine.

Key words: biocomplex PS, rhamnolipids, surface-active substances, biosurfactants, emulsion products, creams, emulsifiers, preservatives, auxiliary substances, technology, pharmaceutical development, dermatology.

Список публікацій здобувача:*Статті (Scopus/web of science)*

1. Pelekh-Bondaruk I.R., Vildanova R.I., Kobylinska L.I., Bila Y.Y., Bilous S.B. Study of emulsion products stabilized with surfactants based on rhamnolipids *Pseudomonas* sp. PS-17. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2022. № 14(2). P.315-318. (Особистий внесок: участь у плануванні експерименту та проведенні дослідження, узагальнення результатів, підготовка статті до друку).

Статті у вітчизняних фахових наукових виданнях:

2. Пелех І.Р., Білоус С.Б., Вільданова Р.І., Шульга О.М. Перспективи застосування поверхнево-активних речовин мікробного походження у складі лікарських та косметичних засобів. *Фармацевтичний часопис*. 2016. №1(37). С.108-112. (Особистий внесок: пошук інформації, обробка та узагальнення одержаних даних, підготовка статті до друку).
3. Пелех І.Р., Ділай Н.В., Білоус С.Б., Вільданова Р.І., Шульга О.М. Дослідження біокомплексу PS як перспективного консерванта у складі лікарських та косметичних засобів. “*ScienceRise: Pharmaceutical science*”. 2017. №3(7). С.814. (Особистий внесок: планування експерименту, приготування зразків, узагальнення результатів, підготовка статті до друку).
4. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Сучасні підходи до застосування емульгаторів та консервантів у складі дерматологічних лікарських засобів. *Фармацевтичний часопис*. 2018. №3. С.52-57. (Особистий внесок: пошук інформації, обробка та узагальнення одержаних даних, підготовка статті до друку).

Статті в інших іноземних виданнях за напрямком дисертації

5. Pelekh I.R., Bilous S.B. Development of the algorithm of stability study of semi-solid preparations and cosmetics with biocomplex PS. *Danish scientific journal*. 2020. №36(2). С.62-65. (Особистий внесок: пошук інформації, узагальнення результатів, підготовка статті до друку).
6. Revyatskyu I.U., Pelekh-Bondaruk I.R., Bilous S.B. Modeling of the process of emulsifiers selecting in emulsion medicines and cosmetics. *PharmacologyOnLine Newsletter*. 2021. Vol. 3. P. 139-150. (Особистий внесок: участь і плануванні та проведенні дослідження, узагальнення результатів, підготовка статті до друку).

Тези доповідей:

7. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Розробка косметичних засобів з консервантами мікробного походження. “Довкілля і здоров’я” присвяченої 30-річчю Чорнобильської катастрофи: зб. матеріалів наук.-практ. Конференції, Тернопіль, 2016, с.89. (Особистий внесок: проведення дослідження, написання тез).
8. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Розробка емульсій для дослідження консервуючої активності біокомплексу PS. “Фармацевтична наука та практика: проблеми, досягнення, перспективи розвитку”: зб. матеріалів І наук.-практ. інтернет-конференції з міжнародною участю, Харків, 2016, с.76. (Особистий внесок: проведення дослідження, написання тез).
9. Пелех І.Р., Білоус С.Б., Ділай Н.В. Дослідження консервуючої активності біокомплексу PS. “Сучасні досягнення фармацевтичної біотехнології”: зб. матеріалів V наук.-практ. інтернет-конференції з міжнародною участю, Харків, 2016, с.457. (Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез).
10. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Дослідження емульгуючих властивостей біокомплексу PS у дерматологічних засобах. “Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів”: зб. матеріалів VII наук.-практ. інтернет-конференції з міжнародною участю, Тернопіль, 2018,

- с.117. *(Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез).*
- 11.Пелех І.Р., Білоус С.Б. Біокомплекс PS як перспективний емульгатор у складі лікарських та косметичних засобів. *“Інновації в медицині”*: зб. матеріалів 88-ої наук.-практ. конференції студентів та молодих вчених із міжнародною участю, Івано-Франківськ, 2019, с.106. *(Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез).*
 - 12.Pelekh I.R., Bilous S.B. Study of auxiliary substance of microbial origin in dermatology products. *“Medicine under the modern conditions of integration development of European countries”*: international scientific conference, Lublin, Republic of Poland, 2019, p.267. *(Особистий внесок: проведення дослідження, написання тез).*
 - 13.Пелех І.Р., Білоус С.Б. Дослідження нових допоміжних речовин мікробного походження. *“Управління якістю в фармації”*: зб. матеріалів XIV наук.-практ. конференції, Харків, 2020, с.119. *(Особистий внесок: проведення дослідження, написання тез).*
 - 14.Пелех-Бондарук І.Р., Білоус С.Б., Шостак Т.А. Перспективи розвитку фармацевтичної біотехнології. *“Проблеми та досягнення сучасної біотехнології”*: зб. матер. I міжнар. наук.-практ. інтернет-конференції, Харків, 2021, с.266. *(Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез).*
 - 15.Білоус С.Б., Шостак Т.А., Пелех-Бондарук І.Р. Перший досвід викладання “Фармацевтична біотехнологія” для здобувачів вищої освіти спеціальності “Фармація, промислова фармація”. *“Проблеми та досягнення сучасної біотехнології”*: зб. матер. I міжнар. наук.-практ. інтернет-конференції, Харків, 2021, с.90. *(Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез).*
 - 16.Пелех-Бондарук І.Р., Білоус С.Б. Дослідження стійкості емульсій, стабілізованих біокомплексом PS. *“Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи”*: зб. матеріалів наук.-практ. конференції з міжнародною участю

присвячена 100-річчю Національного фармацевтичного університету, Харків, 2021, с.99-100. *(Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез).*

17. Pelekh-Bondaruk I.R., Hrushka O.I., Bilous S.B. Study of allergenic action of biosurfactant on the basis of rhamnolipids *Pseudomonas* sp. PS-17. *“Modern scientific research: achievements, innovations and development prospects”*: proceedings of XIII international scientific and practical conference, Berlin, Germany, 2022, p.139-140. *(Особистий внесок: формулювання мети, обговорення результатів дослідження, написання тез).*
18. Пелех-Бондарук І.Р., Грушка О.І., Білоус С.Б. Дослідження подразнювальної дії біосурфактанту на основі рамноліпідів *Pseudomonas* sp. PS-17. *“Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії”*: зб. матеріалів VII міжнародної наук.-практ. інтернет-конференції, Харків, 2022, с.346. *(Особистий внесок: формулювання мети, обговорення результатів дослідження, написання тез).*

ЗМІСТ	16
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	19
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ЗАСТОСУВАННЯ ДОПОМІЖНИХ РЕЧОВИН У СКЛАДІ ЛІКАРСЬКИХ І КОСМЕТИЧНИХ ЗАСОБІВ, ЯКІ ЗАСТОСОВУЮТЬСЯ У ДЕРМАТОЛОГІЇ	28
1.1 Характеристика складу сучасних засобів для застосування у дерматології	28
1.2 Основні групи допоміжних речовин у складі емульсійних лікарських і косметичних засобів та принципи їх застосування	31
1.2.1 Загальні підходи до введення консервантів до складу емульсійних лікарських та косметичних засобів	34
1.2.2 Дослідження асортименту консервантів у складі сучасних лікарських та косметичних засобів	39
1.2.3 Загальні підходи до застосування емульгаторів у складі лікарських та косметичних засобів	42
1.2.4 Дослідження асортименту консервантів у складі сучасних лікарських та косметичних засобів	45
1.3 Найпоширеніші побічні ефекти поверхнево-активних речовин, які застосовуються як емульгатори та консерванти у дерматологічних засобах	47
1.4 Поверхнево-активні речовини мікробного походження як перспективні допоміжні речовини у складі лікарських та косметичних засобів	51

1.5 Сучасний стан мікробного синтезу фармацевтичних субстанцій в Україні та нормативна база для розвитку фармацевтичної біотехнології	59
Висновки до розділу 1	64
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	66
2.1 Загальна концепція дослідження	66
2.2 Характеристика основного об'єкту дослідження	68
2.3 Характеристика допоміжних речовин, які використовуються при розробці емульсійних засобів для нашкірного застосування	70
2.4 Методи дослідження	75
2.4.1 Органолептичні методи дослідження	76
2.4.2 Фізико-хімічні методи дослідження, методи ідентифікації та кількісного визначення рамноліпідів	76
2.4.3 Технологічні методи дослідження	79
2.4.4 Методи комп'ютерного моделювання	79
2.4.5 Мікробіологічні методи досліджень	79
2.4.6 Токсикологічні методи досліджень	81
Висновки до розділу 2	82
РОЗДІЛ 3 ВИВЧЕННЯ КОНСЕРВУЮЧОЇ АКТИВНОСТІ БІОКОМПЛЕКСУ PS	84
3.1 Обґрунтування складу емульсій для дослідження консервуючої здатності біокомплексу PS	84
3.2 Обґрунтування технології емульсій для дослідження консервуючої здатності біокомплексу PS	86
3.3 Вибір консервантів для порівняльних досліджень	88
3.4 Дослідження ефективності антимікробних консервантів	91

	18
Висновки до розділу 3	97
РОЗДІЛ 4 ВИВЧЕННЯ ЕМУЛЬГУЮЧОЇ АКТИВНОСТІ БІОКОМПЛЕКСУ PS	99
4.1 Дослідження емульсійних засобів, стабілізованих біокомплексом PS	99
4.2 Моделювання складу емульсійних лікарських та косметичних засобів, стабілізованих біокомплексом PS	104
4.2.1 Моделювання складу емульсій стабілізованих біокомплексом PS у складі комплексного емульгатора	110
4.2.2 Моделювання складу емульсій стабілізованих біокомплексом PS	113
Висновки до розділу 4	114
РОЗДІЛ 5 РОЗРОБКА АЛГОРИТМУ ДОСЛІДЖЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ ЕМУЛЬСІЙНИХ ЗАСОБІВ ТА ТОКСИКОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОКОМПЛЕКСУ PS	117
5.1 Розробка алгоритму дослідження стабільності м'яких лікарських та косметичних засобів з біокомплексом PS	117
5.2 Токсикологічні дослідження біокомплексу PS	122
5.2.1 Дослідження алергенних властивостей біокомплексу PS	122
5.2.2 Дослідження подразнювальної дії біокомплексу PS	127
Висновки до розділу 5	128
ВИСНОВКИ	130
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	133
ДОДАТКИ	154

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АМВ	- Амфотерицину В
АФІ	- Активний фармацевтичний інгредієнт
БАР	- Біологічно активні речовини
біоПАР	- Біогенні поверхнево-активні речовини
в/м	- Емульсія вода в маслі
ГЛБ	- Гідрофільно-ліпофільний баланс
ДФУ	- Державна Фармакопея України
ЕДТА	- Етилендіамінтетраоцтова кислота
ЄС	- Європейський Союз
ЗТД	- Загальний технічний документ
ІСЛМ	- Індекс співвідношення лімфоцитів та моноцитів
ІСНЕ	- Індекс співвідношення нейтрофілів та еозинофілів
ІСНМ	- індекс співвідношення нейтрофілів та моноцитів
КЗ	- Косметичний засіб
ККМ	- Критична концентрація міцелоутворення
КМУ	- Кабінет міністрів України
КУО	- Колонієутворюючі одиниці
ЛД ₅₀	- Середньосмертельна доза
ЛЗ	- Лікарський засіб
м/в	- Емульсія масло у воді
МЕЛ	- Манозилеритритолліпіди
МКС	- Масовий коефіцієнт сольобілізації
МО	- Мікроорганізми
МОЗ	- Міністерство охорони здоров'я
ПАР	- Поверхнево-активні речовини

ПЕО	- Поліетиленоксид
РЛ	- Рамноліпіди
РСАЛ	- Реакція специфічної агрегації лейкоцитів
РСЛЛ	- Реакція специфічного лізису лейкоцитів
$T_{пл}$	- Температура плавлення
ТШХ	- Тонкошарова хроматографія
HSV	- Вірус звичайного герпесу
Ig	- Immunoglobulin, Імуноглобуліни
SDS	- Sodium dodecyl sulfate, Натрій додецил сульфат
ТАМС	- Загальне число аеробних мікроорганізмів
ТУМС	- Загальне число дріжджових та плісневих грибів

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Важливою проблемою сучасної медицини та фармації є лікування дерматологічних захворювань. Близько 90% всіх лікарських та косметичних засобів, які на сьогодні застосовуються у дерматології, є емульсійними формами з високим вмістом водної фази. Саме такі засоби вимагають застосування великої кількості допоміжних речовин, які б дозволили одержати якісний, ефективний та, основне, безпечний для застосування засіб.

При розробці лікарських та косметичних засобів у вигляді емульсійної форми особливої уваги вимагає вибір таких допоміжних речовин, як емульгатори та консерванти, оскільки вони забезпечують стабільність засобу як дисперсної системи та захист від мікробіологічного ураження в процесі зберігання та застосування засобу, водна фаза якого є сприятливим середовищем для розвитку бактерій та пліснявих грибів.

Оскільки емульгатори та консерванти, переважно, є поверхнево-активними речовинами (ПАР), молекули яких мають дифільну будову, побічну дію дерматологічних засобів найчастіше пов'язують саме з ними. При взаємодії зі шкірою і слизовими оболонками, ПАР суттєво впливають на їх стан і лікувальний ефект лікарських та косметичних засобів. Практично всі поверхнево-активні речовини здатні видаляти з поверхні тіла жироподібні речовини, зокрема тонку захисну плівку, яку утворюють сальні та потові залози шкіри. Синтетичні ПАР можуть проникати в організм людини навіть крізь непошкоджену шкіру, взаємодіяти із цитоплазматичною мембраною клітини, деполаризуючи її.

При виборі емульгаторів та консервантів для стабілізації емульсійних систем важливо враховувати механізм їх стабілізаційної дії, токсичність, величину рН, хімічну сумісність з іншими компонентами емульсії тощо.

У сучасних рецептурах емульсійних лікарських і косметичних засобів широко використовуються як емульгатори ПАР неіоногенного характеру – похідні жирних кислот, полімерних спиртів, жирні спирти, спирти ланоліну. Як

консерванти до складу емульсійних засобів для нашкірного застосування найчастіше входять парабени або їх суміші, спирт бензиловий, солі бензойної кислоти та інші.

В останні роки у фармацевтичній та косметичній технології спостерігається все більший інтерес до речовин одержаних біотехнологічними методами, зокрема мікробним синтезом. Дуже велика кількість мікроорганізмів здатні продукувати біоПАР, які відрізняються за своєю структурою і властивостями від синтетичних ПАР.

БіоПАР у медицині та косметиці на сьогоднішній день ще рідко застосовуються, але вже є певні позитивні результати, отримані у різних лабораторіях світу, що дають підстави розглядати їх як заміну синтетичним ПАР. Завдяки широкому спектру біологічних властивостей, а саме антимікробним, антифунгіцидним, антивірусним, протипухлинним, антиадгезивним, емульгуючим та іншим властивостям, біоПАР мають перспективи для одержання нових ефективних лікарських та косметичних засобів.

Серед біоПАР найбільш ефективними є рамноліпіди, які синтезуються представниками роду *Pseudomonas*, які широко поширені в природі, що пов'язано з їх здатністю засвоювати найрізноманітніші за природою субстрати і рости в різних екологічних умовах. Для їх росту придатні дуже різні середовища, починаючи з води очищеної з мінімальним вмістом солей до складних середовищ, що включають речовини тваринного і рослинного походження та похідні нафти.

Враховуючи важливість пошуку нових допоміжних речовин для застосування у складі лікарських та косметичних засобів, які були б не токсичними, не алергенними та безпечними для людини, розробка складу, технології та дослідження емульсійних засобів для застосування у дерматології з допоміжними речовинами мікробного походження є актуальним завданням сучасної медицини і фармації.

У даній роботі як допоміжний компонент в складі емульсійними засобів з високим вмістом водної фази нами використано поверхнево-активний комплекс,

синтезований бактеріями роду *Pseudomonas* (біокомплекс PS), до складу якого входять рамноліпіди, альгінат та вода.

У складі досліджуваних засобів біокомплекс PS використовується як консервант та емульгатор у емульсіях типу м/в, а також як співемульгатор даного типу емульсій у поєднанні з емульгаторами II роду.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи ЛНМУ імені Данила Галицького (номери державної реєстрації 0116U004500, 0121U107504). Тема дисертаційної роботи затверджена на засіданні Вченої ради фармацевтичного факультету ЛНМУ імені Данила Галицького (протокол № 3–ВР від 23 листопада 2017 року).

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи є теоретичне та експериментальне обґрунтування підходів до розробки складу та технології емульсійних засобів з біокомплексом PS, використаним у якості консерванта та емульгатора, для застосування у дерматології.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити такі завдання:

- провести аналіз даних літератури щодо складу сучасних засобів для застосування у дерматології та вимог до використання допоміжних речовин у складі лікарських засобів для нашкірного застосування та косметичних засобах;
- вивчити сучасну номенклатуру консервантів та емульгаторів, які застосовуються у складі емульсійних засобів;
- вивчити нормативні документи, що регламентують застосування консервантів та емульгаторів;
- розробити емульсійні основи для дослідження біокомплексу PS як консерванта та емульгатора;
- розробити технологію досліджуваних зразків емульсійних засобів;
- провести дослідження мікробіологічної чистоти емульсійних засобів;

- встановити активну концентрацію біокомплексу PS як консерванта і емульгатора;
- дослідити можливість сумісного застосування біокомплексу PS з іншими консервантами та емульгаторами;
- проаналізувати та узагальнити дані результатів біологічних досліджень.

Об'єкти дослідження. Біогенний поверхнево-активний комплекс під умовною назвою біокомплекс PS, синтезований бактеріями роду *Pseudomonas*, одержаний у Відділенні фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії та вуглехімії імені Л.М. Литвиненка НАН України, а також гідрофільні та гідрофобні компоненти емульсійних основ, консерванти, емульгатори та зразки емульсійних засобів.

Предмет дослідження. Експериментальне обґрунтування складу, технології, методик контролю якості емульсійних засобів з біокомплексом PS для застосування у дерматології, дослідження їх фізико-хімічних, мікробіологічних властивостей та безпечності застосування.

Методи дослідження. При вирішенні поставлених у роботі завдань були використані наступні методи досліджень: органолептичні (опис, однорідність), фізико-хімічні (мікроскопічні дослідження емульсійних засобів, колоїдна стабільність, термостабільність, визначення рН), технологічні, комп'ютерного моделювання (вибір кількісного складу олійної фази емульсійних засобів та суміші емульгаторів I і II роду для стабілізації емульсій типу м/в), біологічні (вивчення мікробіологічної чистоти, ефективності антимікробних консервантів та безпечності (алергенної і подразнювальної дії) та проведено статистичну обробку результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше науково обґрунтовано та експериментально опрацьовано склади та технологію емульсійних засобів з біокомплексом PS, використаним в якості консерванта та емульгатора.

Уперше встановлено ефективну концентрацію біокомплексу PS як консерванта у емульсійних засобах різних типів та доведено можливість

сумісного використання біокомплексу PS з іншими консервантами з метою зменшення концентрації консервантів у складі емульсійних засобів.

Уперше встановлено активну концентрацію біокомплексу PS як емульгатора та співемульгатора у емульсійних засобах типу м/в. Для раціонального проведення експериментальних досліджень на етапі розробки емульсійних лікарських або косметичних засобів, стабілізованих біокомплексом PS, використано метод комп'ютерного моделювання складу емульсій у програмі MO Excel, який базується на застосуванні системи ГЛБ.

Практичне значення отриманих результатів. В результаті проведених досліджень запропоновано використання у складі емульсійних засобів для застосування у дерматології нового допоміжного компонента мікробного походження під умовною назвою біокомплекс PS на основі рамноліпідів *Pseudomonas* sp. PS-17, який може бути використаний як консервант та емульгатора.

Для зменшення кількості технологічних експериментів на етапі розробки емульсійних засобів, стабілізованих біокомплексом PS, розроблено та апробовано метод комп'ютерного моделювання складу емульсій у програмі MO Excel, який базується на застосуванні системи гідрофільно-ліпофільного балансу.

Технологія емульсійних засобів типу м/в, стабілізованих біокомплексом PS апробована в умовах промислового виробництва натуральної доглядової косметики марки ED Cosmetics, Львів, Україна; застосування нового допоміжного інгредієнта біокомплексу PS у складі засобів натуральної косметики включено у перспективний план розвитку виробництва (акт апробації від 16 грудня 2022 р.).

Результати дисертаційної роботи впроваджено в освітній процес на кафедрах: технології ліків і біофармації Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (акт впровадження від 14.12.2022 р.), управління та економіки фармації з технологією ліків Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського (акт

впровадження від 08.12.2022 р.), кафедри фармації Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова (акт впровадження від 12.12.2022 р.), аптечної та промислової технології ліків Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (акт впровадження від 14.11.2022 р.) та кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка» (акт впровадження від 11.11.2022 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. Особисто автором здійснено патентно-інформаційний пошук, проаналізовано та узагальнено дані джерел наукової літератури з питань створення лікарських та косметичних засобів для застосування у дерматології.

Здобувачем разом з науковим керівником визначено мету та загальну методологію досліджень.

Проведено розробку та дослідження експериментальних зразків емульсійних засобів. Узагальнено, систематизовано і статистично оброблено отримані результати експериментальних досліджень.

У всіх наукових працях, що були опубліковані у фахових наукових виданнях у співавторстві з науковцями: Білоус С.Б., Біла Є.Є., Вільданова Р.І., Грушка О.І., Ділай Н.В., Кобилінська Л.І., Рев'яцький І.Ю., Шостак Т.А., Шульга О.М., здобувачем виконано проведення експериментальних технологічних досліджень, аналіз, систематизацію та узагальнення одержаних результатів, підготовлено матеріали до публікації.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення та висновки дисертаційної роботи оприлюднені та обговорені на науково-практичних конференціях різного рівня: науково-практичній конференції “Довкілля і здоров'я”, присвяченій 30-річчю Чорнобильської катастрофи (Тернопіль, 2016); І науково-практичній конференції з міжнародною участю “Фармацевтична наука та практика: проблеми, досягнення, перспективи розвитку” (Харків, 2016); V науково-практичній інтернет конференції з міжнародною участю “Сучасні

досягнення фармацевтичної технології та біотехнології” (Харків, 2016); VII науково-практичній інтернет конференції з міжнародною участю “Науково-технічний процес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів” (Тернопіль, 2018); 88-ій науково-практичній конференції студентів та молодих вчених із міжнародною участю “Інновації в медицині” (Івано-Франківськ, 2019); International scientific conference “Medicine under the modern conditions of integration development of European countries” (Lublin, 2019); XIV науково-практичній конференції “Управління якістю в фармацевтиці” (Харків, 2020); I міжнародній науково-практичній інтернет-конференції “Проблеми та досягнення сучасної біотехнології” (Харків, 2021); науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 100-річчю Національного фармацевтичного університету “Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи” (Харків, 2021); XIII international scientific and practical conference “Modern scientific research: achievements, innovations and development prospects” (Berlin, 2022); VII міжнародній науково-практичній інтернет-конференції “Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії” (Харків, 2022).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 18 наукових праць, у тому числі 6 статей, з яких 1 стаття у виданні, що входить до бази даних Scopus, 3 статті у вітчизняних фахових виданнях, 2 статті в інших іноземних виданнях за напрямком дисертації, та 12 тез доповідей.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 170 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 5 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та додатків. Робота ілюстрована 21 таблицею, 17 рисунками. Список використаних джерел містить 200 найменувань, з них 110 кирилицею та 90 латиницею.

РОЗДІЛ I

СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ЗАСТОСУВАННЯ ДОПОМІЖНИХ РЕЧОВИН У СКЛАДІ ЛІКАРСЬКИХ І КОСМЕТИЧНИХ ЗАСОБІВ, ЯКІ ЗАСТОСОВУЮТЬСЯ У ДЕРМАТОЛОГІЇ

1.1 Характеристика складу сучасних засобів для застосування у дерматології.

Шкіра є найбільшим з органів тіла, який виконує велику кількість різноманітних функцій, зокрема захисну, імунну, меланіноутворюючу, терморегуляторну, секреторну, екскреторну, обмінну, рецепторну, сорбційну, дихальну, депонуючу, та інші. Захворювання, які безпосередньо впливають на шкіру займають четверте місце серед усіх людських хвороб та уражають третину світового населення [35, 142].

Шкірні захворювання дуже різноманітні за своїми клінічними проявами і, як відомо, часто є відображенням захворювань внутрішніх органів, зокрема шлунково-кишкового тракту, центральної нервової системи або тяжких системних захворювань [41, 105]. Виникнення дерматологічних захворювань також може бути пов'язано з віком людини і впливом несприятливих чинників зовнішнього середовища [146].

Для лікування дерматологічних захворювань або усунення косметичних недоліків шкіри найчастіше застосовують лікарські засоби для нашкірного застосування та косметичні засоби різного напрямку дії [29]. За формами випуску косметичні засоби мало відрізняються від лікарських засобів для нашкірного застосування, проте за своїм складом косметичні засоби, переважно, є набагато складнішими, ніж лікарські засоби [34]. До складу лікарських та косметичних засобів, які застосовуються у дерматології, найчастіше входять такі біологічно активні компоненти як вітаміни, ферменти, фруктові кислоти, антимікробні речовини, стимулятори обмінних процесів та інші [176].

Щодо ступеня проникнення, засоби, які застосовуються у дерматології, можуть бути різними – лікарські засоби, переважно, повинні проявляти трансепідермальний рівень дії, а косметичні засоби, за виключенням засобів регенерації шкіри, повинні діяти поверхнево і їх глибоке проникнення не є бажаним. Ефекти від застосування лікарських і косметичних засобів різні, вони не можуть замінювати один одного [29].

Основною вимогою до засобів, які застосовуються у дерматології, є їх безпечність навіть при необхідності довготривалого застосування [58].

Лікарські та косметичні засоби, які застосовуються у дерматології, повинні максимально враховувати потреби шкіри, зокрема підтримувати необхідну жирність шкіри, значення рН та захищати від дії зовнішнього середовища – холоду, сухості, ультрафіолетового випромінювання [38]. Основними і найбільш різноманітними ефективними компонентами дерматологічних засобів є жири, які захищають шкіру від висихання, забруднення, переохолодження та сприяють проникненню інших речовин у глибщі шари шкіри, та вода, яка розглядається у сучасній дерматології як ефективний компонент, який забезпечує зволоження та надає шкірі тону та необхідної пружності [58].

На сьогодні значну кількість дерматологічних лікарських засобів становлять лікарські засоби емульсійного типу з високим вмістом водної фази. Такі засоби для нашкірного застосування найчастіше зустрічаються у формі емульсій типу м/в [197, 198]. Саме такі засоби вимагають застосування великої кількості допоміжних речовин, зокрема емульгаторів, консервантів, солубілізаторів [75, 84]. При розробці м'яких лікарських засобів для нашкірного застосування у формі емульсій надзвичайно важливим є вибір поверхнево-активних речовин (ПАР), які можуть проникати в організм людини навіть через неушкоджену шкіру, а також викликати алергічні реакції [101].

Емульсії – це гетерогенні дисперсні системи, які складаються з крапель однієї рідини (яка являє собою дисперсну фазу), які рівномірно розподілені в іншій рідині (дисперсійному середовищі) [160]. Однією з таких рідин є вода, а іншою будь-яка рідина, яка є водонерозчинною, і називається маслом [84].

Стабільність емульсійних систем поділяється на фізичну, хімічну та мікробіологічну [98, 104, 172].

Фізична нестійкість може бути трьох видів:

- коалесценція (у зв'язку з надлишком вільної поверхневої енергії, усім емульсіям властива термодинамічна стійкість. Проявляється тим, що краплі дисперсної фази утворюють агрегати, а потім агреговані краплі з'єднуються в одну велику).
- кінетична нестійкість (виникає через осадження чи спливання частинок дисперсної фази під силою тяжіння).
- обертання фаз (відбувається через зміну типу емульсії від в/м до м/в та навпаки) [98].

Фізичної нестійкості емульсій можна уникнути стабілізацією систем за допомогою ПАР різної природи і концентрації.

Значної стабілізації, що запобігає флокуляції, коалесценції і кінетичній нестійкості, можна також досягти, якщо в об'ємі дисперсійного середовища і на межі розділення фаз виникне структурно-механічний бар'єр, який характеризується високими значеннями структурної в'язкості. Практично створити такий бар'єр можна за рахунок використання високомолекулярних речовин, які сильно підвищують в'язкість дисперсійного середовища [99].

У лікарських і косметичних емульсіях олійна фаза найчастіше складається з рослинних олій (маслинової, мигдальної), мінерального масла (парфумерного, вазелінового, парафінів, силіконів), або тваринних жирів [98, 99].

Крім водної та олійної фаз обов'язковим компонентом емульсій є емульгатор.

За правилом Банкрофта (фаза, в якій емульгатор розчинний, завжди буде дисперсійним середовищем) впливає, що гідрофільні емульгатори, розчинні або дисперговані у воді, утворюють емульсію типу м/в, емульгатори, розчинні в олії, - емульсії типу в/м [84, 99].

Емульсії типу м/в – це ті емульсії, в яких дисперсійним середовищем є водна фаза, в якій дисперговані краплі олії, і саме вони є в основі більшості

гідрофільних кремів. Активні речовини, які розчинені у зовнішній водній фазі, легко вивільнюються. Але недоліком таких емульсій є ймовірність випаровування водної дисперсної фази. При виготовленні емульсій типу м/в необхідно звертати значну увагу на консервацію, оскільки вода є сприятливим середовищем для розвитку МО. У косметичних емульсіях типу м/в є високий вміст водної фази, який становить 70-90%, а олійної - 10-30%. [84, 98].

В емульсіях типу в/м дисперсійним середовищем є масляна фаза, в якій дисперговані краплі води. Емульсію такого типу утворює піт і шкірне сало, які є на поверхні нашої шкіри. Така емульсія має кращі захисні властивості, так як має здатність утворювати на шкірі захисний шар, що утримує вологу. У зв'язку з цим такі засоби потребують меншої кількості консервантів у своєму складі. Емульсійні засоби типу в/м мають високий вміст жирових компонентів – від 30 до 70%, а кількість водної фази складає до 30-50%.

1.2 Основні групи допоміжних речовин у складі емульсійних лікарських і косметичних засобів та принципи їх застосування

Складові дисперсної системи лікарського або косметичного засобу, залежно від їх фармакологічної дії та впливу на загальну терапевтичну ефективність, умовно поділяють на активні та допоміжні речовини. Іноді між ними не можна провести чіткої межі [164, 165]. Численні клінічні й експериментальні дослідження останніх років підтверджують, що фармакологічну дію ліків слід оцінювати в сукупності властивостей усіх складових, а не тільки діючої речовини. За певних умов і при різних комбінаціях допоміжні речовини можуть різко змінювати прояв терапевтичної ефективності дисперсної системи (збільшувати або зменшувати), впливати на дію біологічно активного компонента, спотворювати її та зумовлювати розвиток ефектів, протилежних очікуванім [145].

Аналіз результатів фізико-хімічних досліджень системи «активна речовина – допоміжна речовина» зумовив необхідність переглянути встановлене століттями поняття про допоміжні речовини як про індіферентні

формоутворювачі [196]. Ефективність будь-якої лікарської або косметичної системи залежить від природи та концентрації усіх її складових. Експериментально встановлено здатність допоміжних речовин змінювати характер і ефективність біологічно активних компонентів, впливати на (швидкість і повноту вивільнення та всмоктування діючих речовин, швидкість розвитку та тривалість дії тощо). Спрямоване введення в лікарські і косметичні форми певних допоміжних компонентів, їх оптимальний якісний і кількісний склад дозволяє технологам моделювати лікарські і косметичні системи із заданими параметрами дії [25, 135].

Допоміжні речовини мають визначальне не лише медико-біологічне, але й економічне значення. Саме тому створення та виробництво лікарських і косметичних форм потребує ретельного добору допоміжних складових серед різноманітних природних, хімічних або біотехнологічних речовин на підставі фармакологічних і біофармацевтичних експериментальних досліджень [26].

До складу лікарських та косметичних засобів у вигляді емульсій, крім біологічно активної речовини – основного носія лікувального або косметичного ефекту, входить велика кількість допоміжних речовин, які в комбінації з активною речовиною створюють ефективний та безпечний лікарський або косметичний засіб [53, 74, 84].

Коротка характеристика та приклади допоміжних речовин, які найчастіше застосовуються в складі емульсійних лікарських засобів для нашкірного застосування та косметичних засобах, наведені у табл 1.1.

Відповідно до настанови 42-3.1:2004 “Настанова з якості. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка”, ключовими допоміжними компонентами у лікарських засобах для нашкірного застосування є: антимікробні консерванти, антиоксиданти та інші речовини, включаючи поверхнево-активні речовини (ПАР), розчинники, комплексоутворювачі, речовини, що підвищують проникність, модифікатори вивільнення тощо [50].

Таблиця 1.1.

**Допоміжні речовини, які найчастіше застосовуються в складі
дерматологічних емульсійних засобів**

Група допоміжних речовин	Функція	Допоміжні Речовини
Основи	Основна група допоміжних речовин, яка виконує формоутворюючу функцію	Гідрофібні, гідрофільні, емульсійні
Антиоксиданти	Запобігають або знижують окислення інших компонентів	Токoferол, аскорбінова кислота
Антимікробні консерванти	Запобігають або уповільнюють ріст мікроорганізмів у лікарській формі	Кислота бензойна, четвертинні амонієві сполуки, тімеросал
Емульгуючі агенти	Знижують поверхневий натяг двох фаз у емульсії, запобігаючи злипанню окремих фаз	Емульсійний віск, цетостерилловий спирт, полісорбати
Буферні агенти	Забезпечують певне значення рН, контролюють стан іонізації препарату і відповідно додають стійкість	Цитрати, форфати, тартрати
Комплексоутворювачі	Зв'язують іони металів, запобігають процесам окислення, які каталізуються іонами металів і підсилюють дію консервантів шляхом зв'язування іонів заліза і міді, необхідних для росту мікроорганізмів	ЕДТА, кислота лимонна
Гюмектанти	Сприяють утриманню води у лікарській формі (запобігають висушуванню гелів)	Гліцерин, пропіленгліколь, полі етиленгліколь
Речовини, які підвищують проникність	Забезпечують процес дифузії активного інгредієнта через роговий шар шляхом його хімічної модифікації	Етанол, олеїнова кислота, пропіленгліколь, ПЕО-400

Загущувачі (регулятори в'язкості)	Збільшують в'язкість лікарської форми, може бути природними, напівсинтетичними або синтетичними	Целюлоза, пектин, метилцелюлоза, карбоксиметилцелюлоза, карбопол
---	---	--

Вибір інгредієнтів у косметичних засобах, їх концентрації, рекомендується обґрунтовувати з урахуванням відповідної функції кожного інгредієнта [84].

Такими допоміжними речовинами, які при створенні емульсійних лікарських та косметичних форм вимагають особливої уваги, є консерванти та емульгатори [75]. Їх фізико-хімічні, токсикологічні властивості та вплив на активність лікарської або косметичної форми мають бути враховані на етапі розробки дерматологічного засобу, оскільки фармацевтична або косметична розробка є тим етапом на якому закладаються основи якості, ефективності та безпеки.

1.2.1. Загальні підходи до введення консервантів до складу емульсійних лікарських та косметичних засобів

Консерванти – це важливі допоміжні компоненти лікарських та косметичних засобів, які необхідні для їх тривалого зберігання. Основна мета введення консервантів у лікарські та косметичні засоби – захист від мікробіологічного ураження в процесі зберігання та застосування засобу [75, 84].

Відповідно до вимог ДФУ II вид., якщо готовий лікарський засіб сам по собі немає достатньої антимікробної активності, до його складу можуть бути введені антимікробні консерванти. Оскільки мікробне забруднення може викликати інфікування пацієнта або псування засобу, антимікробні консерванти призначені для запобігання розмноження мікроорганізмів або обмеження мікробної забрудненості в процесі зберігання та застосування, особливо у випадку м'яких лікарських засобів, які є багатодозовими. Вміст консервантів у лікарських засобах не нормується ДФУ, однак використана їх концентрація має

бути обґрунтованою. Антимікробні консерванти не мають використовуватись як альтернатива належній виробничій практиці [21].

Для запобігання несприятливої дії на організм людини консервантів у складі косметичних засобів Технічним регламентом ЄС та Технічним регламентом України на косметичну продукцію встановлені обмеження їх концентрацій у косметичних засобах [87, 175].

Більшість консервантів у концентраціях, які рекомендовані для їх застосування, не мають шкірно-подразнювальних, шкірнорезорбтивних та сенсibiliзуючих властивостей. Тобто ці концентрації характеризуються достатньою безпекою для споживача у складі косметичних засобів [63].

Більшість консервантів за своєю структурою є поверхнево-активними речовинами, здатними викликати побічні ефекти, зокрема і алергічні реакції. Взаємодіючи зі шкірою і слизовими оболонками, ПАР суттєво впливають на їх стан і виявлення лікувального ефекту лікарських та косметичних засобів [101]. Поверхнево-активні речовини взаємодіють з цитоплазматичною мембраною клітини, деполаризуючи її. Синтетичні ПАР можуть проникати в організм людини навіть через неушкоджену шкіру. Швидкість надходження ПАР у організм людини залежить від їх фізико-хімічних властивостей, концентрації та тривалості контакту шкіри з ними. Практично всі поверхнево-активні речовини здатні видаляти з поверхні тіла жироподібні продукти, зокрема тонку захисну плівку, яку утворюють сальні та потові залози шкіри [101].

Асортимент консервантів, які застосовуються у косметичних засобах, достатньо широкий [101, 175]. Постанова КМУ від 20.02.2021 року № 65 “Про затвердження технічного регламенту на косметичну продукцію” затвердила технічний регламент на косметичну продукцію, який набере чинності з 3.08.2024 року [87]. Регламент на косметичну продукцію розроблений на основі вимог Регламенту ЄС 1223/2009. Додаток 5 Технічного регламенту на косметичну продукцію подає перелік консервантів, які дозволені для використання у косметичній продукції, зокрема це 60 основних консервантів різних класів хімічних сполук. Не всі з них отримали широке застосування у косметичній

промисловості [63]. Наприклад, у США для консервації понад 85% косметичної продукції використовують 11 основних консервуючих засобів. Аналогічна ситуація застосування консервантів склалася і в країнах ЄС. В Україні для консервації косметичних засобів широко використовують ніпагін, ніпазол, формальдегід, димол II (суміш 1,3 – диметілол-5,5-диметилгідантоїну, 5,5-диметилгідантоїну та біс-четвертинної амонієвої сполуки), бронопол, катон CG, іргасан DP 300 (2,4,4-трихлор-2-оксидифеніловий естер), гермель II, триклозан, бензойну кислоту та її солі [101, 175].

Характеристика найбільш вживаних консервантів, які застосовуються у косметичній продукції наведена у додатку В.1.

Механізми дії консервантів на МО доволі різноманітні, оскільки визначаються їх хімічною будовою. Основним результатом при цьому є порушення життєвих функцій клітин, зокрема, інактивація білкової частини ферментів клітин. В залежності від ступеня інактивації настає або загибель клітини, або гальмування її життєвих функцій. Швидкість і глибина перетворень, які відбуваються при цьому, залежить як від фізичних, так і хімічних чинників [75, 98].

З фізичних чинників найбільше значення має температура, а саме при підвищенні температури, переважно, антимікробна дія консервантів різко підвищується.

Активність консервантів також залежить від концентрації. Оцінка даного показника відбувається за мікробіологічними критеріями. Цей показник показує який час необхідний для загибелі певної кількості МО. Його значення є мірою ефективності дії консерванта [21].

Ефективність консервантів пов'язана зі значенням рН середовища. Бензойна і саліцилова кислоти виявляють активність лише у незв'язаному виді, їх активність знижується при підвищенні рН. Феноли та ефіри п-оксибензойної кислоти (ніпагін, ніпазол) у меншій мірі чутливі до зміни значення рН [75].

Активність консервантів залежить від фазового стану системи. В системі м/в консервант в силу різної розчинності може нерівномірно розподілятися між

фазами, в результаті чого одна фаза майже повністю втрачає консервант і в ній можливий розвиток МО. Саме тому необхідно враховувати ліпофільність або гідрофільність консерванта, значення коефіцієнта міжфазного розподілу [75].

За механізмом антимікробної дії консерванти поділяють на мембраноактивні і електрофільні [101].

Мембраноактивні (парабени, спирти, феноли, кислоти) діють на мікроорганізми шляхом порушення клітинних мембран.

Електрофільні (альдегіди, катіонні і амфолітні ПАР, сполуки, що містять активний галоген) хімічно реагують з іонізованими і полярними групами захисних і біологічно активних сполук клітин.

За хімічною природою консерванти поділяють на 7 груп:

- I. Спирти – етиловий, бензиловий, 2-феноксietанол, 4-хлорбутанол.
- II. Кислоти та їх солі – бензойна, сорбінова, саліцилова, ундециленова.
- III. Складні ефіри – парабени, гліцерилмонолаурат.
- IV. Галогенвмісні речовини – хлоргексидин, дихлофен, триклокарбан, дибромгексамідин, хлороформ.
- V. Феноли – 2-фенілфенол, триклозан, п-трихлорметилкрезол, 4-ізо-пропіл-м-крезол.
- VI. Альдегіди і речовини, що їх виділяють – формальдегід, параформ, глутаровий альдегід, брнопол, глідант, довіцил-200, гермаль-115.
- VII. Інші – цинку піртіонат, бронідокс-L, катон-SG, оксадіг-A.

Аналіз даних літератури дозволяє сформулювати основні вимоги, яким повинні відповідати консерванти при використанні їх в складі лікарських засобів для нашкірного застосування та косметичних засобах [24, 75, 81, 98]:

- ефективність проти широкого спектру МО;
- бактеріостатичний ефект;
- розчинність, розподіл у воді або на поверхні поділу фаз (ефективнішим буде лише той консервант, у якого низький коефіцієнт розподілу м/в, і саме тому концентрація консерванта повинна бути активною у водній фазі)

- сумісність з сировиною та пакувальними матеріалами;
- стабільність у широкому діапазоні значень рН (адже саме значення рН впливає на ефективність великої кількості консервантів);
- температурна стабільність (як під час виготовлення засобу, так і під час його зберігання);
- низька токсичність (для людини і навколишнього середовища) ;
- консервант не повинен змінювати колір і запах засобу;
- концентрація консерванту або системи консервантів повинна забезпечувати функцію захисту і бути безпечною при використанні косметичних засобів, тобто відповідати вимогам нормативних документів щодо встановлених обмежень їх концентрацій у складі засобу;
- консервант повинен легко визначатися доступними методами аналізу.

В багатокomпонентних засобах може знижуватись активність або інактивуватись дія консерванта. Деякі ПАР, зокрема неіоногенні можуть утворювати з консервантами міцели [95, 100]. До такої взаємодії схильні парабени та заміщені феноли, четвертинні амонієві сполуки. Більш стійкими є бензойна, сорбінова та дегідроацетатна кислоти. Деякі пігменти (ультрамарин, тальк, діоксин титану, оксид заліза) здатні знижувати активність парабенів шляхом абсорбції [81].

При виборі консервантів слід враховувати і матеріали упаковки. В процесі виробництва, а також при зберіганні може відбуватись адсорбція консервантів елементами упакування. Тому при визначенні ефективних концентрацій консервантів повинні враховуватись втрати їх ефективності в часі. Консервант вважається ефективним, якщо забезпечує загибель 99% бактерій за 3 тижні, а кількість грибів не збільшується протягом 6 тижнів [63].

Необхідність включення консервантів до складу лікарських і косметичних засобів у кожному конкретному випадку оцінюється експериментально [84, 98].

Деякі засоби стійкі до МО, тобто мають властивість "самозахисту", яка пояснюється такими особливостями:

- дуже низьке значення рН (кисле);
- мінімальний вміст води;
- наявність у рецептурі достатньої кількості компонентів з протимікробною дією;
- засоби в одноразовому пакуванні і приготовлені в умовах мікробної чистоти;
- засоби з високим вмістом ефірних олій;
- засоби із застосуванням компонентів, що зменшують кількість незв'язаної води (синтетичні гелеутворювачі).

На сьогоднішній день не існує консерванта, який би відповідав відразу всім вимогам, тому застосовують комбінації двох, а іноді трьох-чотирьох консервантів, створюючи мультикомпонентні системи [84, 98].

Перевагами таких систем є:

- розширення антимікробного спектру дії;
- синергічний антимікробний ефект;
- зниження токсичності;
- зменшення ризику виникнення резистентності МО.

Саме тому з метою розширення спектра антимікробної активності і запобігання формуванню резистентних до консервантів мікроорганізмів застосовують, наприклад: бронопол з парабенами або формальдегідом; димол з парабенами і бронополом.

1.2.2. Дослідження асортименту консервантів у складі сучасних лікарських та косметичних засобів

З метою вивчення асортименту консервантів, які застосовуються у складі сучасних м'яких лікарських засобів емульсійного типу, нами проаналізовано склад лікарських засобів для нашкірного застосування, зареєстрованих в Державному реєстрі лікарських засобів України станом на травень 2018 року, які

належать до групи D за АТС класифікацією [22], та проведено вивчення даних наукової літератури щодо розробки нових лікарських засобів емульсійного типу.

Встановлено, що у групі D зареєстровано 147 гелів, з них 2 емульгелі для зовнішнього застосування (29%), 12 емульсій для наскірного застосування (2%), 137 кремів (27%) та 217 мазей (рис. 1.1) [69].

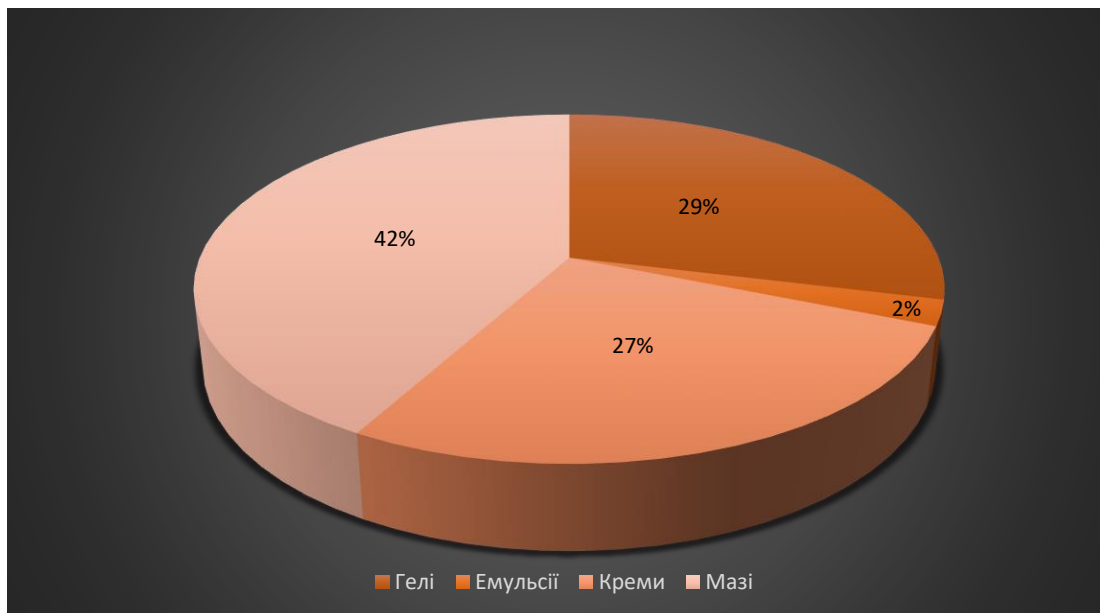


Рис. 1.1 Розподіл м'яких лікарських засобів за лікарськими формами

Аналіз складу допоміжних речовин у досліджуваних засобах показав, що як консерванти до складу емульсійних лікарських засобів для наскірного застосування найчастіше входять парабени або їх суміші, а також спирт бензиловий [22]. Результати наведені у табл. 1.2

При розробці нових м'яких лікарських засобів емульсійного типу в останні роки досліджуються такі консерванти як суміш калію сорбату та саліцилової кислоти, які були використані для приготування емульгелю для лікування андрогенної алопеції [96, 108]. Також досліджуються амфифільні поверхнево-активні речовини на основі промелітового діангідриду, які здатні солюбілізувати речовини гідрофільної та ліпофільної природи, а також можуть використовуватись як стабілізатори емульсійних систем [1]. Було також встановлено, що як консерванти застосовують гексиленгліколь, кислоту

сорбінову, бензалконію хлори, однак вони входять до складу незначної кількості засобів [22, 69].

Таблиця 1.2.

Консерванти, які використовують у складі емульсійних лікарських засобів

Назва консерванта	Торгова назва засобу	Форма випуску
Метилпарагідроксибензоат + парагідроксибензоат	Бетлібен, Халоват, Повекорт, Момат крем, Делор, Розамет, Дермазин, Залаїн, Зіклара, Алдара, Кераворт, Дермокас, Кандід-Б, Пімафукорт, Белакне, Солантра, Аргосульфан, Фузідерм, Пімафуцин, Вратизолін	Крем, мазь
Метилпарагідроксибензоат	Мезодерм, Елозон, Скін-кап, Карізон, Аргедин босналек, Триакутан, Бетаметазон, Флуцар, Псорікап, Содерм	Крем, емульсія
Пропілпарагідроксибензоат	Локоїд ліпокрем	Крем, емульсія
Хлоркрезол	Клобескін, Дермовейт, Екодакс	Крем
Спирт бензиловий	Адвантан, Преднітоп, Ламіфаст, Екзодерил, Канеспор, Тербізил, Канестен, Ламізил, Бактробан, Онабет, Зіклара, Алдара, Кераворт, Елідел, Бетазон, Кандід-Б, Локоїд ліпокрем, Екзодерм, Ламідерм, Нафтифін, Приора, Адвантан, Феністил емульсія	Крем, емульсія, емульгель

1.2.3. Загальні підходи до застосування емульгаторів у складі лікарських та косметичних засобів

Емульгатори, переважно, є поверхнево-активними речовинами, молекули яких мають дифільну будову, формують пограничний шар на поверхні рідин, що не змішуються, знижують поверхневий натяг, завдяки чому з'являється можливість утворення емульсії [75, 84]. Емульгатори відповідають за взаємний розподіл двох фаз, консистенцію емульсійної системи, її пластичні властивості, в'язкість, пористість структури, плинність, розмір частинок дисперсної фази, рівномірність їх розподілу в дисперсійному середовищі [75, 84]. При виборі емульгаторів для стабілізації емульсійних систем необхідно враховувати механізм їх стабілізаційної дії, токсичність, величину рН, хімічну сумісність з іншими компонентами емульсії тощо [91].

Використання двох типів ПАР (суміші гідрофільних і гідрофобних) дає змогу зменшити сумарний ГЛБ суміші емульгаторів і підвищує в'язкість системи на кілька порядків при досить невисокому вмісті суміші ПАР (до 10%).

Велику роль для вибору необхідного емульгатора відіграє хімічна природа ПАР. За хімічною природою ПАР поділяють на: іоногенні та неіоногенні відповідно до їх здатності дисоціювати на іони у водному середовищі [60]. Іоногенні ПАР, у свою чергу, розділяються на катіоно- та аніоноактивні, а також амфотерні, які діють залежно від рН середовища [63]. Катіонні та аніонні ПАР рідко використовують як емульгатори у лікарських і косметичних засобах, оскільки вони можуть бути причиною виникнення контактних дерматитів. До найбільш м'яких і безпечних належать неіоногенні ПАР [84, 99].

У сучасних рецептурах емульсійних лікарських і косметичних засобів широко використовуються як емульгатори ПАР неіоногенного характеру – похідні жирних кислот, полімерних спиртів, жирні спирти, спирти ланоліну [69].

Для стабілізації емульсії найбільше значення має *гідрофільно-ліпофільний баланс* (ГЛБ) ПАР [84, 99]. На гідрофільно-ліпофільному балансі ґрунтується класифікація ПАР, запропонована Гріффіном. Між числами ГЛБ ПАР та їх розчинністю у воді існує певна кореляція. Чим більше баланс зміщений у бік

гідрофільності, тим вище число ГЛБ. Для неіоногенних ПАР складено шкалу величин ГЛБ від 0 до 20, яка відповідає сфері їх застосування. Іоноактивні ПАР характеризуються числами ГЛБ від 18 до 40 [99]. Чим більше значення ГЛБ, тим більше виявляється здатність ПАР утворювати та стабілізувати емульсії типу м/в, і навпаки, чим менше значення ГЛБ, тим яскравіше виявляється здатність до створення і стабілізації емульсій типу в/м [106].

Система чисел ГЛБ дає можливість оцінити сферу застосування ПАР і потенційні її властивості [106]. При цьому сумарний ГЛБ суміші ПАР можна розрахувати за формулою

$$\text{ГЛБ}_{\text{суміші ПАР}} = (X_1 \times \text{ГЛБ}_1 + X_2 \times \text{ГЛБ}_2) / 100,$$

де X_1 та X_2 – вміст першого і другого ПАР у суміші, %; ГЛБ_1 та ГЛБ_2 – гідрофільно-ліпофільний баланс першого і другого емульгатора [99].

Раціональне поєднання ПАР з гідрофільними та гідрофобними властивостями покладене в основу створення так званих емульгувальних сумішей, стабілізаційний ефект яких щодо гетерогенних систем перевищує емульгувальну здатність ПАР одного виду [63, 69]. Це пов'язано, насамперед, з тим, що поєднання ПАР різних типів дає можливість отримувати сумарне значення ГЛБ суміші ПАР, близьке до значення критичного ГЛБ олійної фази емульсії, що, у свою чергу, підвищує товщину адсорбційного шару і відповідно підвищує стійкість емульсій. У табл. 1.3 наведено значення ГЛБ, при якому відбувається емульгування компонентів олійної фази [193].

Система ГЛБ дозволяє кількісно оцінити і виразити у вигляді умовних групових чисел ступінь взаємодії із водою окремих груп, з яких складається молекула ПАР [84, 99].

Таблиця 1.3.

Значення ГЛБ, необхідні для емульгування олійної фази

Назва речовини	Значення ГЛБ при якому відбувається емульгування
Кислота лаурилова	16
Кислота лінолева	16
Кислота олеїнова	17
Кислота стеаринова	15-16
Спирт цетиловий	15-16
Спирт лауриловий	14
Касторова олія	14
Кукурудзяна олія	10
Олія жожоба	6-7
Парафінова олія	10
Легка парафінова олія	10-11
Пальмова олія	10
Карнаубський віск	15
Ланолін безводний	9

Так як емульсійні засоби належать до мікрогетерогенних систем, які є досить нестійкими при зберіганні, їх стабільність має велике значення, оскільки розшарування порушує точність дозування діючої речовини [63, 69]. Для отримання стійких емульсійних засобів перевагу віддають таким ПАР, які є малочутливими до рН середовища та безпечними для людини і оточуючого середовища.

1.2.4. Дослідження асортименту емульгаторів у складі сучасних лікарських та косметичних засобів

До лікарських засобів емульсійного типу належать, а відповідно обов'язково містять у своєму складі емульгатори, - креми, рідкі емульсії для нашкірного застосування та деякі гелі і мазі. Аналіз складу допоміжних речовин даних засобів відповідно до Державного реєстру лікарських засобів, станом на травень 2018 року показав, що в якості емульгаторів 1-го роду для створення емульсійних лікарських засобів, в основному, використовуються полісорбати, а як емульгатори 2-го роду найчастіше зустрічаються цетостеариловий спирт та ланолін (табл. 1.4) [22].

При розробці м'яких лікарських засобів емульсійного типу в останні роки активно досліджується цетиловий спирт. Як емульгатори застосовують також інші речовини, зокрема віск бджолиний, спирт поліокситилен-2-стеариловий, спирт міристиловий [22].

Для створення стійкої емульсійної системи 1-го роду необхідно застосовувати значну кількість емульгаторів, що може викликати місцеве подразнення та руйнування шкірно-епідермального бар'єру [63, 183]. Саме тому застосовують поєднання емульгаторів 1-го та 2-го роду, а також до складу емульсійних засобів вводять високомолекулярні сполуки.

Такий підхід застосовано при розробці лікарського косметичного засобу для застосування при андрогенній алопеції - використано твін-20 в комбінації з ПАР олії солодкої мигдалю як емульгатор 1-го роду, а також ланолін еркалан з цетиловим спиртом як емульгатор 2-го роду [47].

Таблиця 1.4

Емульгатори, які використовуються у складі емульсійних лікарських засобів

Назва емульгатора	Торгова назва засобу	Форма випуску
Полісорбати	Преднітоп, Карізон, Ламіфаст, Екзодерил, Канеспор, Тербізил, Естецифін, Канестен, Травоген, Пенцикловір, Дермазин, Ламізил, Фузікутан, Зіклара, Алдара, Кераворт, Дермокас, Травокорт, Кловейт, Екзодерм, Дермазол, Кетодін, Нізорал, Пімафукорт, Солантра	Крем
Ланолін	Ломексин, Пантекрем, Бепантен, Хепідерм, Судокрем	Крем, мазь
Спирт цетостеариловий емульгований	Ліпстер, Белодерм, Бетазон, Елідел, Кетоконазол, Ацикловір, Бетазон плюс, Рятівник, Тридерм, Белогент, Вратизолін, Содерм, Локоїд крело	Крем, емульсія

При розробці мазі хондропротекторної дії використано як емульгатор 1-го роду гліцеролу моностеарат та полісорбат 80, як емульгатор 2-го роду - цетостеариловий спирт та макроголу стеарат [107].

1.3. Найпоширеніші побічні ефекти поверхнево-активних речовин, які застосовуються як емульгатори та консерванти у дерматологічних засобах

Поверхнево-активні речовини впливають на структурно-функціональний стан крові (гемоглобін, вміст еритроцитів, лейкоцитів, зміни в лейкоцитарній формулі) [28]. Доведено, що найбільша гемолітична активність по відношенню до еритроцитів притаманна ПАР, які мають один поліоксиетиленгліколевий ланцюг з 16-18 атомами вуглецю [101]. Поверхнево-активні речовини також впливають на обмінні процеси та активність ряду ферментів в організмі. Аніонні фосфоровмісні ПАР пригнічують синтез деяких гормонів та підсилюють процеси пероксидного окиснення ліпідів біологічних мембран [101].

Серед негативних ефектів, пов'язаних з дією саме допоміжних речовин, є токсичні реакції при використанні діетиленгліколю як консерванта. Фенітоїн, за даними літератури, здатен змінювати біодоступність лікарського засобу.

Щодо побічних ефектів, спричинених допоміжними речовинами, особливу увагу слід приділяти найбільш сприятливій до побічних реакції групі людей. До такої групи належать новонароджені діти з дуже низькою вагою при народженні, пацієнти з опіками великої площі поверхні, пацієнти з астмою або контактним дерматитом в анамнезі. Немовлята з низькою вагою при народженні мають чітко виражену непереносимість багатьох допоміжних речовин, особливо протягом перших 2 тижнів життя. Препарати з допоміжними речовинами, які раніше були доведені як безпечні (наприклад, доксапрам), повинні бути ретельно вивчені в цій віковій групі, перш ніж рекомендуватись до застосування [115, 127, 128].

Нормативні документи, які регулюють фармацевтичну розробку лікарських засобів, значною мірою запобігають введенню нових токсичних допоміжних речовин. Однак нове використання раніше дозволених (але недостатньо

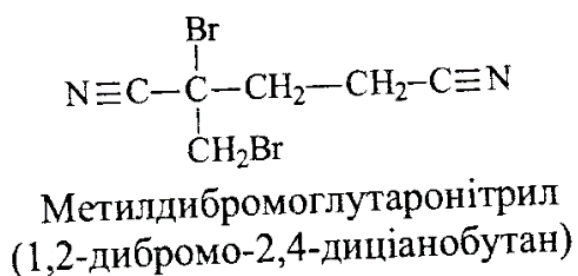
вивчених) допоміжних речовин продовжує призводити до сумних трагедій (наприклад, інцидент з Е-феролом) [12, 31].

Нормативними документами рекомендується, щоб усі фармацевтичні виробники перерахували всі допоміжні речовини, які були використані при створенні лікарського засобу. Листок-вкладиш повинен містити перелік цих допоміжних речовин відповідно до належних виробничих процедур. Ця інформація допоможе уникнути появи негативних побічних ефектів [151, 169].

Токсична дія консерванту на організм людини, переважно, зумовлена його хімічною структурою [101].

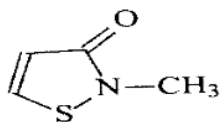
Консерванти на основі метилдибромоглутаронітрилу.

Метилдибромоглутаронітрил часто використовують у косметичних засобах. Було встановлено, що саме цей консервант здатен викликати алергічні реакції, зокрема і у здорових людей [101].

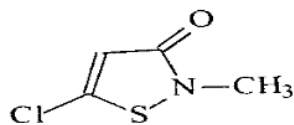


Згідно з нормативною базою з косметичних засобів, а саме Регламентом ЄС, а тепер і Технічним регламентом України, який вступить в дію у 2024 р., забороняється використання метилдибромоглутаронітрилу у косметичних продуктах, які не змиваються, так як можуть викликати подразнення шкірних покривів [175].

Консерванти на основі метилхлороізотіазолону (5-хлоро-2-метил-4-ізотіазолін-3-ону) та метилізотіазолону (2-метил-4-ізотіазолін-3-ону). Саме ці консерванти найчастіше можна зустріти у складі таких косметичних засобів як креми для рук та шампуні. Дані сполуки є потужними контактними алергенами, які викликають подразнення шкіри. Особливістю є ще той факт, що ці консерванти пригнічують ріст аксонів [101].

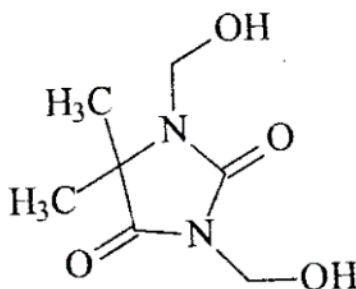


2-Метил-4-ізотіазолін-3-он



5-хлоро-2-метил-4-ізотіазолін-3-он

Консерванти – донори формальдегіду. До цієї групи входять диметилолдиметилгідантоїн, гідроксиметилгліцинат натрію, діазолідиніл сечовини, імідазолідиніл сечовини. Особливістю є те, що у косметичних продуктах вони розпадаються з утворенням формальдегіду, а саме він здатен викликати рак легенів [75].



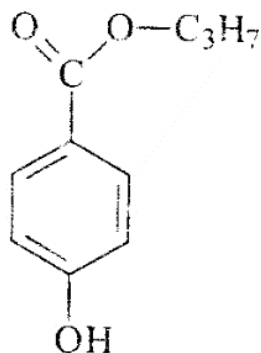
Диметилолдиметилгідантоїн

Формальдегід пошкоджує ДНК, здатний подразнювати очі, верхні дихальні шляхи і слизову оболонку, може викликати астму та головні болі. Використовувати консерванти – донори формальдегіду заборонено у Японії та Швеції.

Перевагою цієї групи є те, що цей консервант сумісний з більшістю косметичних інгредієнтів, і спостерігається ефект синергізму [101].

Консерванти на основі парабенів. Парабени (естери 4 – гідроксибензойної кислоти) використовують найчастіше у ролі консервантів у лікарських та косметичних засобах.

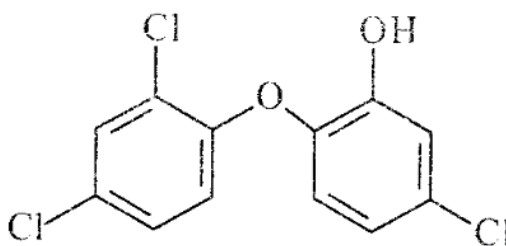
Аналіз літератури свідчить, що парабени здатні накопичуватись в онкологічних пухлинах людей, а отже вони мають здатність індукувати їх утворення [101].



Пропілпарабен

Ці консерванти також впливають на жіночу репродуктивну систему, бо здатні зв'язуватись з естрогенними рецепторами. А пропілпарабен негативно діє на репродуктивну функцію організму чоловіків [101].

Триклозан. Антибактеріальний засіб широкого спектра дії, який також має протизапальні властивості [75].



Триклозан

Пряме сонячне проміння перетворює триклозан на одну з форм діоксину, яка здатна накопичуватись в організмі [101].

Щодо емульгаторів, то аналіз наукової літератури показав, що побічну дію дерматологічних засобів найчастіше пов'язують з наступними емульгаторами, наведеними у табл. 1.5.

У сучасних лікарських засобах широко використовуються синтетичні поверхневоактивні речовини (ПАР), які, на жаль, можуть викликати алергічні реакції та підвищувати токсичність препаратів. Саме тому у світі є тенденція до відмови від використання високотоксичних ПАР. Натомість постійно зростає комерційний інтерес до ефективних продуктів природного походження, до яких належать біогенні поверхнево-активні речовини – біоПАР.

Таблиця 1.5.

Побічна дія емульгаторів

Назва	Побічна дія
Емульгатори	
Віск неіонний емульгований	Може викликати подразнення очей.
Естери сорбітану	При місцевому застосуванні можуть викликати подразнення шкіри.
Ланолін	Ланолін не має токсичних ефектів, але він практично завжди містить домішки пестицидів у своєму складі. Саме домішки пестицидів у ланоліні можуть викликати алергію.
Спирти цетиловий та стеариловий	У пацієнтів з дерматозами можуть викликати алергічні реакції гіперчутливості

У зв'язку з екологічною безпечністю і високою ефективністю, здатністю до емульгування, солюбілізації та міцелоутворення біоПАР мають великий потенціал до застосування у дерматології [184, 199, 200].

1.4. Поверхнево-активні речовини мікробного походження як перспективні допоміжні речовини у складі лікарських та косметичних засобів

З активним розвитком біотехнологій в останні роки все більше досліджується новий клас біотехнологічних продуктів – біогенні поверхнево-активні речовини, так звані біоПАР або біосурфактанти [163].

БіоПАР – поверхнево-активні речовини, які отримують мікробним синтезом. Вони належать до типових амфіфільних сполук, які знижують поверхневий та міжфазний натяг рідин. Біосурфактанти володіють такими ж фізико-хімічними властивостями, як і синтетичні сурфактанти: для них відомі

значення критичної концентрації міцелоутворення (ККМ), гідрофільно-ліпофільного балансу (ГЛБ), поверхневого і міжфазного натягу та інші. Біосурфактанти, для яких величина ГЛБ менше 6, утворюють стабільні емульсії типу «вода в маслі», а при значенні ГЛБ 10-18, - емульсії типу «масло у воді». БіоПАР можуть стабілізувати (емульгатори) і дестабілізувати (деемульгатори) емульсії, а їх здатність до солюбілізації і утворення міцел, обумовлюють активність цих сполук по відношенню до різних біологічних об'єктів [76, 77].

Мікробні ПАР мають ряд переваг над синтетичними, зокрема вони є менш чутливі до температур, рН і солоності середовища, нетоксичні, а також різняться за біологічною активністю [192, 195]. БіоПАР за своєю ефективністю можуть перевершувати хімічні ПАР [6]. Найбільш цінними їх властивостями є:

1. Значне зниження поверхневого і міжфазного натягу рідин.
2. Низькі значення ККМ.
3. Емульгування.
4. Піноутворення.
5. Змочувальна здатність.
6. Зниження в'язкості .

БіоПАР здатні до утворення ліпосом, які можна використовувати в кремах, мазях та гелях. Ліпосоми легко зливаються з клітиною і віддають свій вміст. Саме цей принцип лежить в основі застосування ліпосом як транспортної форми для активних речовин [2].

Дуже велика кількість мікроорганізмів продукують біоПАР, які відрізняються за своєю структурою і властивостями, що визначає придатність мікробних ПАР для різних використань. Та виробництво біоПАР є молодого галуззю біотехнологій, і не досить добре розвинутою [15, 16].

Серед біоПАР найбільш ефективними є рамноліпіди, які синтезуються представниками роду *Pseudomonas* і широко поширені в природі, що пов'язано з їх здатністю засвоювати найрізноманітніші за природою субстрати і рости в різних екологічних умовах [159]. Для їх росту придатні дуже різні середовища, починаючи з води очищеної з мінімальним вмістом солей до складних

середовищ, що включають речовини тваринного і рослинного походження та похідні нафти [44]. Серед представників роду *Pseudomonas* знайдені види, які витримують високий тиск та солоність середовища [94, 189].

У сучасній літературі описана дія рамноліпідів на клітини про- та еукаріотів, їх роль у русі клітин та механізми утворення біоплівок [113]. Описано 28 гомологів рамноліпідів, серед них найчастіше можна зустріти РЛ1, РЛ2, РЛ3, РЛ4. [187, 191]. Всі вони складаються із гідрофільної «голови», яка представлена однією або двома молекулами рамнози, і гідрофобного «хвоста» з одного або двох ланцюгів жирних кислот (моно-RL і di-RL) [194]. Така дифільна будова молекули визначає її поверхнево-активні властивості, тензіоактивні та емульгувальні: змочування різних поверхонь, емульгування жирів та вуглеводнів, зниження поверхневого і міжфазного натягу, вплив на капілярні процеси, підвищення проникності клітинних мембран [117, 143, 170].

Завдяки своїй будові молекули і, відповідно, фізико-хімічним властивостям, рамноліпіди мають широке застосування [126, 130]: можуть використовуватися як для отримання нових, так і для вдосконалення існуючих препаратів для сільського господарства [17, 30, 33, 43], косметики та медицини. БіоПАР можуть бути використані як самостійні активні та допоміжні інгредієнти, а також для створення комплексних препаратів із покращеними функціональними характеристиками [173, 178, 182]. Із літературних даних можна виділити кілька основних напрямів застосування цих речовин: підвищення нафтовидобутку пластів; поліпшення горючих властивостей високоасфальтенових нафт [10, 14, 18]; стабілізація і дестабілізація емульсій; очистка від нафтових забруднень води і ґрунтів; створення нових мийних засобів; у сільському господарстві в різних препаратах для захисту рослин від хвороб і шкідників; у медицині та косметичі (створення ліпосом) [7, 80, 161].

Рамноліпід, синтезований *P. aeruginosa* AT10 володіє антимікробною активністю, знищує грамнегативні бактерії, окрім *E. coli* і *Serratia marcescens* [3, 9, 170, 180]. Штам *P. putida* PCL1445 синтезує речовину ліпопептидної природи (путисолвін), що пригнічує утворення біоплівки і призводить до деградації вже

існуючих біоплівки як власних, так й інших псевдомонад, у тому числі й умовно патогенних для людини [134].

Також відомо, що рамноліпід штаму *P. aeruginosa* AT10 проявляє антифунгіцидну дію – активно пригнічує ріст *Aerobacidium pullulants*, *A. niger*, *Chaetoniium globusum*, *Gliocadium virens*, *Penicillium crysogenum*, *Penicillium funiculosum*, *B. cinerea*, *Colletotrichum gloesporioides*, *R. solani* [32].

Інший гліколіпід флокулозин [117] штаму *P. flocculosa* у концентрації 50 мкг/мл діяв на *C. albicans*, *Candida glabatra*, *Candida lusitaniae*, *S. cerevisiae*, *Trichosporon asahii* за рН 5,0. При сумісному використанні флокулозину і антибіотика амфотерицину В (АМВ) антимікробна дія посилювалась за рН 7. Підсилення дії за сумісного додавання біоПАР і антибіотика спостерігалось навіть при низьких концентраціях АМВ - 0,005 мкг/мл, що дає можливість створити ефективні ЛЗ із меншою кількістю антибіотика, який є досить токсичним. Невеликої кількості флокулозину є достатньою для порушення структури мембрани дріжджів і полегшення проникнення АМВ у клітини, де він зв'язується з ергостеролом і спричиняє загибель клітин. Разом з тим слід зазначити, що рамноліпід, який належить до гліколіпідів, не діяв на *C. albicans*, *S. cerevisiae* і *Rhodotorula rubra* [170].

БіоПАР у медицині та косметиці на сьогодні ще дуже мало застосовуються, але вже є певні позитивні результати, які отримані у різних лабораторіях світу, що дають підстави їх розглядати як заміну синтетичним ПАР [120, 156, 157]. Завдяки широкому спектру біологічних властивостей, а саме антимікробних [170, 131, 144, 152, 190], антифунгіцидних [117, 162, 155], антивірусних [123], протипухлинних [123, 185], антиадгезивних [150], емульгуючих [153], біоПАР мають перспективи для одержання нових ефективних лікарських та косметичних засобів.

БіоПАР із антимікробними властивостями синтезуються мікроорганізмами-продуцентами для створення більш сприятливих умов для самого продуцента і пригнічення росту інших бактерій. Наприклад, рамноліпиди, манозилеритритолліпиди (МЕЛ) і сурфактини завдяки антибіотичній активності

забезпечують перевагу продуцентам у процесі колонізації нового середовища і конкуренції за субстрат з іншими видами [158, 150]. Дослідження процесів синтезу біоПАР дозволяє детальніше зрозуміти таке явище у природі, як активний антагонізм. Прикладом цього явища є високий антимікробний потенціал виділеного ліпопептиду *Brevibacillus brevis* НОВ1 проти штаму *Bacillus licheniformis*, ізольованого разом із продуцентом ПАР з відпрацьованої води нафтового поля [144].

На сьогодні ліпопептидам притаманна найбільш ефективна антимікробна дія (поліпептидні антибіотики). Серед них привертають увагу сурфактин (продуцент *Bacillus subtilis*) [152] і ліхенізін (продуцент *Bacillus licheniformis* BAS50) [124]. Є також дані про антибактеріальну активність ще однієї ПАР N1, продуцентом якої є *Bacillus subtilis* [124]. N1 виявився ефективним проти грампозитивних бактерій, але не виявляв дії щодо грамнегативних бактерій, які мають зовнішню непроникну для даних біоПАР мембрану [190].

Ліпопептид *Brevibacillus brevis* НОВ1 виявляв антимікробну дію, як щодо грампозитивних (*B. licheniformis*), так і грамнегативних (*E. coli*) бактерій, однак був неефективним проти *S. aureus* [144], який володіє резистентністю до багатьох антибіотиків. Але ліпопептид, який синтезує *Bacillus circulans*, у концентрації 500 мкг/мл повністю знищував клітини *S. aureus* [131]. Даний ліпопептид характеризувався широким діапазоном антибактеріальної дії як на грампозитивні, так і на грамнегативні мікроорганізми, і навіть повністю пригнічував ріст таких стійких мікроорганізмів як *Klebsiella sp.* і *E. coli*.

Мікробні ПАР здатні синергічно посилювати дію антибіотиків на патогенні мікроорганізми [117]. Спільне використання ефірних олій, яким притаманна антимікробна дія, а також біоПАР дозволяє зменшити концентрацію консервантів у косметичних засобах [122, 149]. У літературі розглядають наступні механізми синергічного впливу: порушення функції клітинної стінки мікроорганізмів внаслідок зв'язування пептидоглікану; вплив на мембрани бактерій (порушення цілісності, зміна співвідношення насичених і ненасичених жирних кислот, порушення функції ферментних систем); дія на синтез

екзогенних протеїнів, які відіграють важливу роль у резистентності патогенних мікроорганізмів [125, 149].

Біогенні ПАР проявляють також антивірусну активність. Відомо, що сурфактин діє на широкий діапазон вірусів: вірус лісу Семліки (збудник лихоманки), вірус звичайного герпесу (HSV), віруси герпесу свиней, везикулярного стоматиту, вірус імунодефіциту мавп, вірус кальцивірозу кишок та енцефаломіокардиту мишей [118, 123]. Аналог сурфактину – пумілацидин - виявляє антивірусну дію щодо звичайного вірусу герпесу 1 (HSV-1) [170]. Механізм противірусної дії вивчений лише для сурфактину. Показано, що цей ліпопептид є ефективнішим проти вірусів, що мають оболонку (ретровіруси, віруси герпесу), ніж проти безоболонкових вірусів. Таке явище зумовлено тим, що саме механізм дії біоПАР пов'язаний із взаємодією його молекул із зовнішньою оболонкою вірусів і утворенням у ній каналів з подальшою дезінтеграцією [123].

Також встановлено, що рамноліпіди штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 та трегалозоліпіди штаму *G. rubripertincta* УКМ Ас-122 виявляють активність проти штаму "Дніпровський-34" тешовірусу свиней [2].

Проте, фізіологічна роль більшості мікробних ПАР залишається незрозумілою, але її пов'язують із ростом мікроорганізмів на водонерозчинних субстратах і впливом на клітинну стінку. Вони сприяють солюбілізації вуглеводнів, утворенню дрібнодисперсної емульсії, в результаті чого полегшується контакт мікробних клітин із гідрофобними субстратами і їх надходження всередину клітини. На даний час біоПАР є об'єктами пильного вивчення. Їхні перевага над синтетичними ПАР полягає в тому, що вони високоефективні, біодеградабельні та мають низьку токсичність. Мікробні ПАР є ідеальними молекулами для збільшення взаємодії клітини з різними гідрофобними поверхнями. У харчовій промисловості біоПАР використовують як емульгатори під час обробки сировини для формування необхідної консистенції та густини продукту. Добре відомо, що рамноліпіди, як й інші ПАР, переводять гідрофобні субстрати у доступну для клітин форму. Їм притаманні

антимікробна й антивірусна дія, здатність до лізису зооспор і участь у формуванні біоплівки [37, 59, 78].

Аналіз наукової літератури показав, що деякі види *Pseudomonas* здатні продукувати та виділяти гетерогенну суміш біосурфактантів із гліколіпідною структурою, які відомі як рамноліпіди. У процесі біосинтезу виробництво рамноліпідів регулюється як генетичною регуляторною системою, так і центральними метаболічними шляхами, що включають синтез жирних кислот, активованих цукрів і ферментів. Ці поверхнево-активні сполуки можна виробляти з різних типів недорогих субстратів, таких як вуглеводи, рослинні олії та навіть промислові відходи, що створює хороший потенціал для комерційного використання. Контролюючи фактори навколишнього середовища та умови росту, можна досягти високого виходу виробництва рамноліпідів. Через зростання занепокоєння щодо захисту навколишнього середовища, рамноліпіди відповідають критеріям для промислових і екологічних застосувань, таких як відновлення навколишнього середовища та біологічний контроль. Рамноліпіди вже були комерційно вироблені, що робить їх більш економічно конкурентоспроможними з синтетичними поверхнево-активними речовинами. У найближчому майбутньому рамноліпіди можуть стати комерційно успішними біосурфактантами [171].

Рамноліпідні біоповерхнево-активні речовини є багатофункціональними сполуками, які можуть відігравати незамінну роль у біотехнологічних, біомедичних та біоремедіаційних галузях, які привернули значну увагу в останні роки. Саме новий штам *Pseudomonas* sp. S1WB було виділено із зразка води, забрудненої нафтою. Біоповерхнево-активні речовини, вироблені цим штамом, мають здатність зменшувати поверхневий натяг при $32,75 \pm 1,63$ мН/м і емульговані на $50,2 \pm 1,13$ % у рідкому середовищі, що містить 1 % відпрацьованого моторного масла як єдиного джерела вуглецю. Проте найнижче зниження ($28,25 \pm 0,21$), найвищий індекс емульгування ($60,15 \pm 0,07$) і максимальний вихід (900 мг/л) були досягнуті за оптимізованих умов; де було виявлено, що комбінації глюкоза/сечовина та гліцерин/сечовина є ефективними

вуглецевими та азотними субстратами для покращеного виробництва біоповерхнево-активних речовин. Біоповерхнево-активний продукт був охарактеризований за допомогою рідинної хромато-мас-спектрометрії надвисокої ефективності і виявлено різні конгенери дирамноліпідів. Крім того, дирамноліпіди, отримані штамом S1WB, виявилися високостабільними з точки зору поверхневої активності та показників EI при різних факторах навколишнього середовища, тобто температурі, рН і різних концентраціях NaCl, де емульгуюча властивість була високо стабільною до 30 днів інкубації. Крім того, біопродукт був здатний розщеплювати вуглеводень на $42,2 \pm 0,04$ %, а профіль газової хромато-мас-спектрометрії показав, що більшість піків інтенсивності вуглеводнів були повністю розкладені порівняно з контролем [138].

Рамноліпіди мають відмінну емульгуючу здатність з різними вуглеводнями, ароматичними сполуками та рослинними оліями. У ряді досліджень оцінюється вплив рН в діапазоні від 3 до 9 на емульгуючу активність і стабільність рамноліпідів і гідрофобних субстратів (бензолу, соєвої олії та гасу). Додецилсульфат натрію використовують як еталон для порівняння рівня хімічної та біологічної активності ПАР через 24 години (E(24)). Результати показують, що рН впливає на утворення та стабільність емульсії. Для рамноліпідів пік емульгуючої активності спостерігався в базових умовах для всіх субстратів, при цьому найвище значення було досягнуто з гасом при рН 8. Результати даних дослідження демонструють, що рамноліпіди можуть замінити хімічні поверхнево-активні речовини, такі як SDS, у різних галузях промисловості [181].

Таким чином, у світі спостерігається зростання інтересу до вивчення впливу біоПАР на клітини людини і тварин. Біологічна активність біоПАР створює перспективи розробки як нових ліків із високою ефективністю і меншою токсичністю, так і отримання нових косметичних засобів з безпечною дією. Завдяки тому, що біогенні ПАР можуть виконувати функції різних допоміжних речовин: антимікробних консервантів, антиоксидантів та інших, які

забезпечують диспергування, суспендування, загущення, емульгування, змочування і розчинність діючих речовин та стабілізацію рН, вони можуть у майбутньому замінити синтетичні ПАР, які досить часто є алергенними та токсичними [2, 6].

1.5. Сучасний стан мікробного синтезу фармацевтичних субстанцій в Україні та нормативна база для розвитку фармацевтичної біотехнології

Фармацевтична біотехнологія – нова галузь фармацевтичної технології, найвагомішими впровадженнями якої у медицину є біосинтез антибіотиків, отримання гормональних препаратів, використання для діагностики різних захворювань моноклональних антитіл, створення рекомбінантних вакцин, ферментних препаратів та інших біологічно активних речовин [72, 109].

До складу сучасних лікарських засобів входить велика кількість допоміжних речовин, які в комбінації створюють ефективний лікарський засіб, однак допоміжні речовини, які використовуються при створенні лікарських засобів, переважно, одержуються методами хімічного синтезу [111]. Проте на сьогодні спостерігається все більший інтерес до речовин одержаних біотехнологічним методом, тобто перспективним напрямком розвитку біотехнології є також одержання допоміжних речовин [112, 140].

Біотехнологічні речовини отримують шляхом використання біологічних об'єктів (мікроорганізмів, клітин і тканин людей, рослин, тварин, клітин комах і ссавців, гібридомних клітин, дріжджів, генно-інженерних штамів мікроорганізмів, моноклональних антитіл, ДНК, РНК) та спеціальних технологічних процесів (культивування, ферментації, біотрансформації, екстракції тощо), та належать до складних речовин з великою молекулярною масою [121].

Ступінь відмінності біотехнологічних продуктів та хімічних лікарських засобів не полягає тільки у різниці кількості атомів. Високомолекулярні протеїни, мають як первинну структуру, так і вторинну, третинну та четвертинну (просторова організація) структури [4]. Первинна структура

високомолекулярних протеїнів є послідовністю амінокислот, що визначає їх молекулярну масу. В процесі синтезу протеїнових молекул одні й ті ж самі амінокислотні послідовності можуть трансформуватися [154]. Будь які мінімальні зміни як у первинній послідовності протеїну, так і у його просторовій організації важко передбачувати. Процеси деградації (ферментативної, вільнорадикальної тощо), що відбуваються паралельно з синтезом, також призводять до утворення продуктів із практично ідентичною цільовому продукту масою та навіть просторовою будовою, але з іншою біологічною активністю [147].

Біотехнологічні продукти відрізняються від хімічно синтезованих лікарських засобів за виробничим процесом та його впливом на їх якість та безпеку [72]. Якість біотехнологічних/біологічних продуктів визначається вибраною технологією та процесом виробництва. Незначні зміни у виробничому процесі можуть мати значний вплив на якість лікарського препарату, тому розробка виробничого процесу має першочергове значення для біологічних продуктів [8].

Параметри виробничого процесу, які можуть впливати на якість та стабільність активної речовини у створеному препараті, наприклад, рН, нагрівання, фрагментування, необхідно уважно вивчити у рамках розробки препарату для забезпечення постійності процесу.

Аналіз наукової літератури свідчать про те, що точно повторити будь-який із зазначених етапів виробництва біотехнологічного продукту, не знаючи протоколу, практично неможливо. Важливим аспектом є те, що, навіть при наявності протоколу центральну роль у виробництві біотехнологічних продуктів відіграють живі системи (клітини мікроорганізмів або ссавців), а вже їх «капризність» залишається суттєвою проблемою у біотехнологічному виробництві. При мінімальних відхиленнях у технології виробництва некерованість продуцентів може стати причиною змін характеристик біологічних/біотехнологічних лікарських препаратів [72].

Дані наукової літератури показують, що сучасні загальноприйняті методи аналізу структури речовин є непридатними для інтерпретації відмінностей біотехнологічних препаратів (тобто речовини ідентичні, а їх ефекти відрізняються). Це вимагає впровадження більш чутливих аналітичних процедур з урахуванням особливостей кожного біотехнологічного продукту [72].

Нормативно-правова база щодо біотехнологічних продуктів в Україні та світі розробляється активно протягом останніх 10-15 років і включає декілька документів. Практично всі нормативні документи стосуються лікарських засобів, а не допоміжних речовин. Дані нормативні документи відносять лікарські засоби, одержані методами біотехнології, до високотехнологічних лікарських засобів та застосовують термін «високотехнологічні лікарські засоби», «біологічні» або «біотехнологічні продукти» [72].

На сьогодні у країнах ЄС одним із нормативних документів, що стосується лікарських препаратів, відповідно до регуляторних вимог Європейського агентства з лікарських засобів (EMA), є Директива 2001/83/ЄС від 6 листопада 2001 року про Кодекс спільноти щодо лікарських препаратів, призначених для споживання людьми. Ця директива застосовується до всіх лікарських засобів, які приготовані промисловим способом [133]. Враховуючи особливості окремих видів лікарських засобів, зокрема високотехнологічних, які стосуються нових технологій та методів лікування, затверджено Регламент ЄС № 1394/2007 Європейського Парламенту та Ради від 13 листопада 2007 щодо високотехнологічних лікарських засобів і внесено зміни до Директиви 2001/83/ЄС [90].

Відповідно до Регламенту ЄС № 1394/2007 високотехнологічні лікарські засоби можуть бути розділені на три основних типи:

- *препарати для генної терапії*; такі засоби містять рекомбінантні гени, які вводять в організм з метою профілактики чи діагностики. Такі гени є ділянками ДНК, які створено в лабораторіях, і можуть використовуватись з метою лікування генетичних розладів, раку або хронічних захворювань.

- *соматично-клітинні терапевтичні лікарські засоби*; вони містять клітини або тканини, які мають змінені біологічні характеристики, та не призначені для використання тих самих основних функцій в організмі. Вони можуть бути використані для лікування, діагностики або профілактики захворювань;

- *тканинні лікарські засоби*; вони містять клітини або тканини, які були модифіковані та можуть використовуватись для відновлення, регенерації або заміни людської тканини [90].

Крім того, деякі високотехнологічні лікарські засоби можуть містити один або більше медичних пристроїв як невід'ємну частину лікарського засобу, їх називаються комбінованими засобами. Прикладом цього є клітини, вбудовані в біорозкладану матрицю або каркас.

Вказані нормативні документи визначають структуру документів (досьє у формі STD (Загального Технічного Документу (ЗТД)), які подаються із заявою про дозвіл для допуску препарату на ринок, і які включають два основних блоки інформації: про активну речовину і готовий лікарський препарат.

Щодо активної речовини біотехнологічного препарату, то вимагається докладний опис виробничого процесу, інформація про контроль за якістю під час виготовлення та валідацію процесу, які подаються в окремому документі у вигляді Майстер-файла на активну речовину. Відповідно до Директиви 2001/83/ЄС інформація про активну речовину, яка подається у модулі 3 досьє, повинна мати наступний план:

- загальна інформація (назва, структура, загальні властивості);
- процес виробництва АФІ (виробник(и), опис виробничого процесу та його контролю, контроль матеріалів, контроль критичних стадій та проміжних продуктів, валідація процесу та/або його оцінка, розробка виробничого процесу);
- опис характеристик (доказ структури та інші характеристики, домішки);
- контроль АФІ (специфікація, аналітичні методики, валідація аналітичних методик, аналізи серій, обґрунтування специфікації);

– стандартні зразки або препарати, система контейнер/закупорювальний засіб, стабільність (резюме щодо стабільності та висновки, протокол післяреєстраційного вивчення стабільності та зобов'язання щодо стабільності, дані про стабільність).

В Україні нормативно-правові документи, які стосуються біотехнологічних лікарських засобів також є розроблені та затверджені в установленому порядку. Нормативні документи щодо біотехнологічних лікарських засобів уніфіковані з європейськими документами.

На сьогодні Наказ МОЗ України № 426 від 26.08.2005 р. «Про затвердження Порядку проведення експертизи реєстраційних матеріалів на лікарські засоби, що подаються на державну реєстрацію (перереєстрацію), а також експертизи матеріалів про внесення змін до реєстраційних матеріалів протягом дії реєстраційного посвідчення», зі змінами і доповненнями, гармонізований з вимогами Директиви 2001/83/ЄС від 6 листопада 2001 року про Кодекс спільноти відносно лікарських препаратів, призначених для споживання людьми [85].

Вимоги до організації та проведення досліджень з фармацевтичної розробки лікарських засобів в Україні регулюються настановами 42-3.1:2004 «Настанови з якості. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка» [50] та 42-3.0:2011 «Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8)» [52]. Однак з огляду на велику різноманітність діючих речовин та лікарських форм ці настанови надають рекомендації щодо загальних принципів проведення досліджень та підготовки модуля 3 «Якість» реєстраційного дос'є на лікарський засіб у форматі CTD та стосуються, в основному, лікарських засобів, які містять як активні і допоміжні речовини, одержані шляхом хімічного синтезу.

Щодо специфічних видів лікарських засобів, зокрема з діючими речовинами, одержаними методами біотехнології, то важливим аспектом їх фармацевтичної розробки є розуміння розробником особливостей біотехнологічних активних речовин. В Україні затверджено ряд документів, які стосуються біотехнологічних лікарських засобів, основними з яких є:

Особливості біологічних/біотехнологічних продуктів та біосимілярів (методичні рекомендації); Фармацевтична розробка біотехнологічних та біологічних продуктів. СТ-Н МОЗУ 42-8.1:2013; Доклінічне вивчення безпеки лікарських засобів біотехнологічного походження (методичні рекомендації); Подібні біологічні препарати, що містять як активні речовини протеїни, отримані біотехнологічним шляхом. СТ-Н МОЗУ 42-8.0:2013 та інші [57, 56].

Таким чином, в Україні як і в цілому у світі спостерігається все більший інтерес до речовин одержаних біотехнологічним методом, в тому числі і допоміжних речовин. В Україні затверджено ряд нормативних документів, які стосуються біотехнологічних продуктів, проте практично всі нормативні документи стосуються розробки біотехнологічних продуктів як лікарських засобів, а не допоміжних речовин.

Висновки до розділу 1:

1. В сучасній дерматології спостерігається тенденція до застосування емульсійних лікарських та косметичних засобів з високим вмістом води, які мають ряд переваг в порівнянні з іншими засобами.
2. При розробці лікарського або косметичного засобу у вигляді емульсійної форми важливим етапом є вибір допоміжних речовин, які б дозволили одержати якісний, ефективний та, основне, безпечний для застосування засіб. Такими допоміжними речовинами, які вимагають особливої уваги, є емульгатори та консерванти.
3. Найчастіше в складі сучасних лікарських та дерматологічних засобів як консерванти застосовують парабени, а як емульгатори використовують полісорбати, цетиловий спирт, а також ланолін.
4. Останнім часом спостерігається зростання інтересу до біоПАР як нових перспективних допоміжних компонентів з високою ефективністю і меншою токсичністю. У складі лікарських та косметичних засобів біогенні ПАР можуть виконувати функції антимікробних консервантів, емульгаторів, антиоксидантів, солюбілізаторів та інших допоміжних

речовин, і можуть у майбутньому замінити синтетичні ПАР, які досить часто є алергенними та токсичними.

5. В Україні затверджено ряд нормативних документів, які стосуються біотехнологічних продуктів, проте практично всі нормативні документи стосуються розробки біотехнологічних продуктів як лікарських засобів, а не допоміжних речовин.

Результати досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Пелех І.Р., Білоус С.Б., Вільданова Р.І., Шульга О.М. Перспективи застосування поверхнево-активних речовин мікробного походження у складі лікарських та косметичних засобів. *Фармацевтичний часопис*. 2016. №1(37). С.108-112. *(Особистий внесок: пошук інформації, обробка та узагальнення одержаних даних, підготовка статті до друку)*.
2. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Сучасні підходи до застосування емульгаторів та консервантів у складі дерматологічних лікарських засобів. *Фармацевтичний часопис*. 2018. №3. С.52-57. *(Особистий внесок: пошук інформації, обробка та узагальнення одержаних даних, підготовка статті до друку)*.
3. Пелех-Бондарук І.Р., Білоус С.Б., Шостак Т.А. Перспективи розвитку фармацевтичної біотехнології. “Проблеми та досягнення сучасної біотехнології”: зб. матер. І міжнар. наук.-практ. інтернет-конференції, Харків, 2021, с.266. *(Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез)*.

РОЗДІЛ II

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Загальна концепція дослідження

Для досягнення поставленої мети нами був розроблений план проведення досліджень з вивчення консервуючої та емульгуючої активності поверхнево-активних речовин мікробного походження на основі рамноліпідів *Pseudomonas* sp. PS-17 під умовною назвою біокомплекс PS, який складався з таких послідовних етапів [66]:

- вивчення сучасної номенклатури консервантів та емульгаторів, які застосовуються у складі емульсійних ЛЗ та КЗ;
- вивчення нормативних документів, що регламентують застосування консервантів та емульгаторів;
- розробка емульсійних основ для дослідження біокомплексу PS як консерванта та емульгатора;
- розробка технології досліджуваних зразків;
- розробка методів комп'ютерного моделювання;
- дослідження мікробіологічної чистоти емульсійних засобів;
- встановлення активної концентрації біокомплексу PS як консерванта і емульгатора;
- дослідження можливості сумісного застосування біокомплексу PS з іншими відомими консервантами та емульгаторами;
- обговорення результатів біологічних дослідження.

Для дослідження консервуючої та емульгуючої здатності біокомплексу PS та порівняння активності з відомими консервантами та емульгаторами вибрано емульсійні основи, оскільки емульсійні форми становлять близько 90% всіх косметичних засобів та значну частину лікарських засобів для нашкірного застосування, тому дослідження є показовими [75, 84, 98].

Виробництво емульсійних засобів складається з таких технологічних стадій [11, 93]:

- приготування водної фази;
- приготування масляної фази;
- емульгування;
- охолодження;
- фасування та упакування.

Беручи до уваги, що у складі сучасних лікарських та косметичних засобів як консерванти найчастіше використовують: парабени (ніпагін та ніпазол), солі бензойної кислоти (натрію бензоат) та бензалконію хлорид, для порівняння консервуючої здатності біокомплексу PS нами були вибрані саме ці консерванти, а також наночастинки срібла.

У дослідженнях емульгуючої активності біокомплексу PS як емульгатори 1-го роду використовували полісорбати, а як емульгатори 2-го роду - цетостеариловий спирт, ланолін та гліцеролу моностеарат, які за результатами маркетингових досліджень, в основному, використовуються як стабілізатори емульсійних систем [66].

На стадії розробки лікарського або косметичного засобу необхідно довести, що антимікробна активність консерванта забезпечує належний захист від небажаних ефектів, які можуть бути результатом мікробного забруднення, а емульгуюча здатність використаного стабілізатора емульсійної системи забезпечує стабільність засобу протягом терміну зберігання [70].

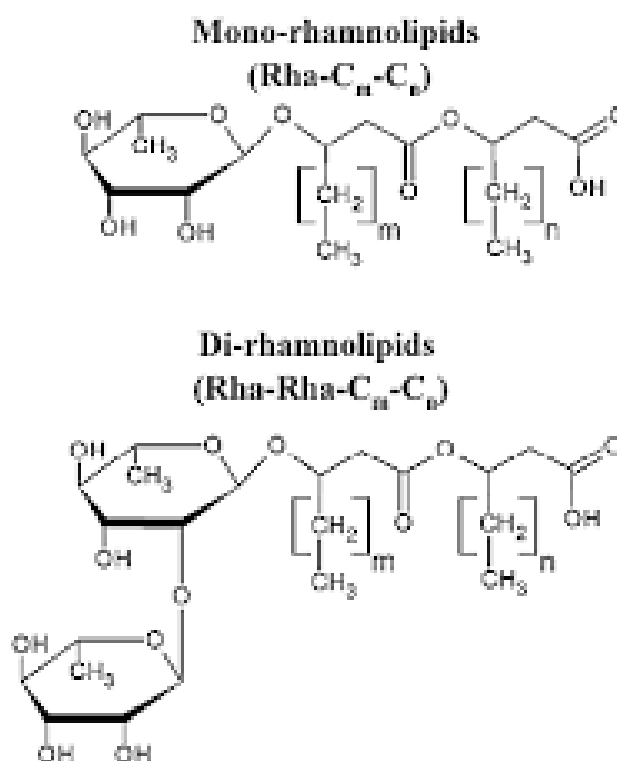
Ефективність антимікробного консерванта може посилюватися або послаблюватися в результаті взаємодії з діючою речовиною або іншими компонентами, пакувальними матеріалами. Тому протягом терміну придатності треба контролювати антимікробну активність, з метою доказу того, що вона не знижується в процесі зберігання.

Для дослідження використовували зразки емульсійних засобів, добуті з контейнера безпосередньо перед випробуванням.

2.2 Характеристика основного об'єкту дослідження

Біокомплекс PS умовна назва біогенного поверхнево-активного комплексу, синтезованого бактеріями роду *Pseudomonas*, що являє собою в'язку масу до складу якої входять рамноліпіди, які становлять до 80% біокомплексу, а також альгінат та вода. Перевагами такої форми продукту є його концентрована форма, можливість тривалого зберігання, зручність у транспортуванні та застосуванні. Субстанція розроблена у Відділенні фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії та вуглехімії імені Л.М. Литвиненка НАН України [61].

Біокомплекс PS містить суміш рамноліпідів різної будови, серед яких основну частину складають моно- і дирамноліпіди, які складаються із гідрофільної «голови», що представлена однією або двома молекулами рамнози, і гідрофобного «хвоста» з одного або двох ланцюгів жирних кислот. До складу біокомплексу PS моно- і дирамноліпіди входять у співвідношенні 90:10 [62].



На сьогодні великий практичний інтерес рамноліпіди представляють з точки зору біоочищення ґрунтів, забруднених розливами нафтопродуктів, проте,

рамноліпиди, що синтезуються *Pseudomonas aeruginosa*, володіють також широким спектром біологічної активності, зокрема, мають антимікробну та протипухлинну дію. ГЛБ монорамноліпиду становить 13, а дирамноліпиду – 21. Це вказує на те, що вони можуть утворювати стабільні емульсії типу м/в, а отже використовуватись як емульгатори [66, 70].

Бактерії роду *Pseudomonas* є активними продуцентами поверхнево-активних продуктів. У роботі використовували поверхнево-активні продукти біосинтезу культури *Pseudomonas* sp. PS-17. Даний продуцент є добре вивченим, дуже легко і швидко культивується, що дозволяє отримувати значну кількість вихідного продукту за досить короткий термін інкубації. Культивування штаму-продуцента проводиться в колбах Ерленмейєра (750 мл), з робочим об'ємом 150 мл на ротаційній качалці (220 об/хв) за температури 30 °С на рідкому поживному середовищі (г/л): NaNO_3 – 4,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 2,0; KH_2PO_4 – 1,2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; цитрат Na – 2,0. Джерело Карбону – гліцерин - 30 г/л. Термін культивування – 5 діб. Поверхнево-активний біокомплекс PS виділяють зі супернатанту культуральної рідини штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 способом кислотного осадження (10% HCl) за рН 3,0. Отриманий осад витримують за 4 °С протягом ночі, відділяють центрифугуванням (8 000 об/хв, 20 хв), сушать у вакуумі до постійної маси [79].

За результатами токсикологічних досліджень середньосмертельна доза (ЛД₅₀) біокомплексу PS за умови внутрішньошлункового введення культуральної рідини для білих щурів і мишей становить більше 10 г/кг, отже, цей біокомплекс належить до речовин 4 класу небезпеки.

Поверхнево-активні речовини на основі рамноліпідів *Pseudomonas* sp. PS-17 характеризуються такими властивостями: низький поверхневий та міжфазний натяг, емульгувальна, піноутворювальна та мийна здатність. Дана біоПАР має низькі значення поверхневого (27,9-29,8 мН/м) і міжфазного натягу (0,01-0,5 мН/м), високі емульгуючу та суспендууючу активності (індекс емульгування – 65-85%) [66, 70]. Критична концентрація міцелоутворення для даного комплексу при 25°С та рН 7 становить 131,8 мг/л. Коефіцієнт стійкості піни культуральної

рідини штаму *Pseudomonas* дорівнює 88%, кратність піни – 6,5 – 7,0. Масовий коефіцієнт солюбілізації (МКС) для біокомплексу PS становить 0,0855 (в перерахунку на суху речовину). [5]

2.3 Характеристика допоміжних речовин, які використовуються при розробці емульсійних засобів для нашкірного застосування.

При розробці складу та технології емульсійних засобів використовували наступні допоміжні речовини.

Олія виноградних кісточок

Являє собою олію, що отримана методом гарячої екстракції з насіння винограду. Олію виноградних кісточок часто використовують в косметології для зволоження шкіри, в аромотерапії, та в якості лубриканта перед голінням [129].

Містить високу концентрацію вітамінів групи В, Е, А, С, органічних кислот і мінеральних речовин. Володіє профілактичними властивостями проти пухлинних та запальних процесів, має регенеративний ефект. Виноградна олія містить фолієву кислоту, тому сприяє регенерації кровоносної системи, шкіри так клітин організму [40]. Ця олія балансує виділення жиру на шкірі, активізує вироблення колагену [175].

Олія оливкова (маслинова) (ДФУ 2.0, Т.2, с. 435)

Жирна олія, одержана рафінуванням неочищеної маслинової олії, одержаної зі стиглих плодів *Olea europaea L.* методом холодного пресування або іншим підходящим механічним способом. Може бути доданий підходящий антиоксидант. Прозора, безбарвна або зеленувато-жовтого кольору рідина. Практично не розчинна в 96 % спирті Р, змішується з петролейним ефіром Р, температура кипіння: від 50 °С до 70 °С. При охолодженні починає каламутніти при температурі 10 °С і перетворюється на олієподібну масу при температурі близько 0 °С. Відносна густина: близько 0.913. Кислотне число не більше 0.3. Зберігають у максимально наповненому контейнері, у захищеному від світла місці, при температурі не вище 25 °С.

За складом є сумішшю тригліцеридів жирних кислот з високим вмістом ефірів олеїнової кислоти. Належить до нелетких олій.

Якщо субстанція призначена для виробництва лікарських засобів для парентерального застосування, її зберігають в атмосфері інертного газу.

Використовується в косметичній промисловості як розчинник [21].

Ланолін безводний

В'язка, густа, жирна на дотик маса зі слабким специфічним запахом. Ланолін отримують із вовняного воску, який є продуктом діяльності залоз шкіри овець. Виділення вовняного воску проводять кислотним, флотаційним, екстракційним, сепараторним, флотаційно-кислотним методами. Хімічний склад ланоліну є досить різноманітним: жирні кислоти (міристинова, пальмітинова, церитинова), складні етери, вільні спирти (n-алкоголі, ізо-алкоголі), вуглеводні (n-алкани), холестерин, ізохолестерин.

Ланолін погано розчинний у воді, 95% етиловому спирті, добре — в етері, бензолі, хлороформі, частково — в ацетоні; $T_{пл}$ знаходиться в межах 36–40 °С, щільність при 20 °С становить 1,07 г/см³, рН 6–8, показник заломлення $n_D^{40} = 1,478–1,482$, густина 0,930–0,945 г/см³ при 15 °С, число омилення 94–106, йодне число 18–32, кислотне число не більше 1, водне — 150%, зола >0,15%, сухий залишок після сушіння не більше 1. Характерною особливістю є його здатність абсорбувати значну кількість води (180–200%), гліцерину (140%) і 40% етанолу (70%) за рахунок наявності оксихолестерину. За своїми властивостями ланолін схожий на шкірний жир людини.

Ланолін застосовують як пластифікатор, емульгатор типу вода/олія (при виготовленні емульсій), а також для виготовлення гідрофобних мазевих основ, супозиторіїв, гелів, кремів, пластирів. У косметологічній практиці використовують як пом'якшувач шкіри після гоління, у барвниках для вій і помад (для послаблення й зняття подразливої дії), у засобах для догляду за волоссям (шампуні); як буфер при нанесенні барвних засобів на поверхню нігтів; у милах як пережирювальна консистентна добавка. Недоліком ланоліну є його здатність викликати алергічні реакції, окиснюватися й утворювати перекиси, а

також специфічний запах, жовтий колір, погана розчинність в оліях. Ланолін зберігають у герметично закритих банках у прохолодному, захищеному від світла місці. Забороняється зберігати у поліетиленових плівках і відкритих ємкостях [175].

Гліцеролу моностеарат

Емульгатор, який одержують на основі пальмітинової та стеаринової кислот. Це воскоподібний порошок з температурою плавлення – 55-60 °С, температурою займання – 240 °С. Переважно використовується для утворення емульсій типу м/в або в/м. Величина ГЛБ дорівнює 3,8. Гліцеролу моностеарат розчинний у гарячому етанолі, етері, хлороформі, гарячому ацетоні, мінеральних та нелетких оліях. Практично нерозчинний у воді, але може бути диспергований з невеликою кількістю мила або ПАР.

Гліцеролу моностеарат може використовуватись як неіоногенний емульгатор, стабілізатор, пластифікатор і пом'якшувач при виготовленні фармацевтичних та косметичних засобів. Гліцеролу моностеарат діє як ефективний розчинник і стабілізатор для полярних і неполярних сполук, які утворюють емульсії типу м/в та в/м.

Гліцеролу моностеарат є корисною пом'якшувальною речовиною, яка легко емульгується за допомогою звичайних емульгаторів. Додавання гліцерилу моностеарату робить КЗ однорідними, стабільними, з добрими показниками текстури [175].

Цетиловий спирт

Одноатомний жирний спирт. З вигляду це тверді, білі гранули, без запаху. Температура плавлення 46-52°C. Легко розчиняється в етанолі (95%) та етері (розчинність підвищується з підвищенням температури), практично не розчиняється у воді. Змішується з розтопленими жирами та парафіном. Використовується як емульгатор, загусник в косметології та при виробництві фармацевтичних препаратів. Пом'якшувальні властивості обумовлені абсорбцією і затриманням спирту етилового в епідермісі, де він змашує та пом'якшує шкіру.

Спирт цетиловий має водоабсорбувальні властивості, завдяки яким використовується в емульсіях в/м, підвищуючи їх стабільність. Він є слабким самостійним емульгатором, але дозволяє зменшити кількість іншого емульгувального агента, що використовується у складі комплексного емульгатора [175].

Пропіленгліколь (ДФУ 2.0, Т. 2, с. 563)

(RS)-пропан-1,2-діол. В'язка, прозора, безбарвна рідина. Густина–1,035–1,037 г/см³. Добре змішується з водою, етиловим, бензиловим спиртами, змішується з більшістю органічних розчинників (ацетоном, хлороформом та ін.), погано розчиняється в етері (1:6), петролейному етері, бензолі, не змішується з жирними оліями. Має показник заломлення 1,431–1,433, густина – 1,035–1,037 г/см³, температура кипіння не менше 95,0 °С та перегоняється між 185–189 °С. Гігроскопічний [21].

Ніпагін (метилпарагідроксибензоат) (ДФУ 2.0, Т. 2, с. 444)

Метиловий ефір 4-гідроксибензойної кислоти. Білий кристалічний порошок, без запаху, має легкий пекучий смак. Розчинний у рослинних оліях (мигдалевій, касторовій, кукурудзяній, арахісовій 1:200), ланоліні, етанолі (1:2), ефірі (1:10), гліцерині (1:60), пропіленгліколі (1:5), воді (1:400), практично нерозчинний у мінеральних оліях.

Метилпарабен ефективний у широкому діапазоні рН, але найбільшу антимікробну активність має при рН 4,0-8,0. Активний проти дріжджових і пліснявих грибів, а також грампозитивних і грамнегативних МО.

Використовується як консервант у фармацевтичній та косметичній галузях [21].

Ніпазол (пропілпарагідроксибензоат) (ДФУ 2.0, Т. 2, с. 565)

Пропіловий ефір п-гідроксибензойної кислоти. Це білий порошок, без запаху та смаку. Максимально стабільним пропілпарабен є при рН 4-5. Ніпазол є несумісним з лугами та солями заліза, сильними окисниками та кислотами. Пропілпарабен є розчинний у рослинних та мінеральних оліях, добре

розчиняється в ацетоні та етері, малорозчинний у воді, розчиняється в етанолі (1:1,1), пропіленгліколі (1:3,9).

Використовується як консервант у лікарських та косметичних засобах. Може використовуватись у поєднанні з метилпарабеном.

Максимальна концентрація парабенів є 0,4 (за кислотою) для однієї сполуки; 0,8 (за кислотою) для суміші сполук. Використовують парабени як консерванти у співвідношенні 3:1 [21].

Натрію бензоат (ДФУ 2.0, Т. 2, с. 472)

Білий кристалічний порошок, без запаху або з легким запахом бензальдегіду, солодкувато-солоного смаку. Легко розчиняється у воді (1:2), гліцерині (1:9), помірно розчинний у спирті (1:45). Використовується як консервант з максимальною концентрацією 0,5% [21].

Бензалконію хлорид

Четвертинна амонійна сполука. Це білий з жовтуватим відтінком аморфний порошок або желеподібна жовтувата маса. Гігроскопічний, мильний на дотик, з м'яким ароматичним запахом та кислим смаком. Дуже добре розчинний у воді, спирті та ацетоні. Малорозчинний в бензолі, майже нерозчинний в ацетоні. Бензалконію хлорид є несумісний з милами, цитратами, йодидами, нітратами, перманганатами, саліцилатами, тетраборатами та солями срібла. Його водні розчини безбарвні та стійкі до зміни рН середовища та температури.

Бензалконію хлорид використовується у лікарських та косметичних засобах як антимікробний консервант.

Максимальна концентрація бензалконію хлориду як консерванта 0,1% [175].

Наночастинки срібла

Вже понад століття у клінічній практиці срібло застосовується як антимікробний засіб завдяки його ефективності проти широкого ряду аеробних, анаеробних, грам-позитивних та грам-негативних бактерій, дріжджових, нитчастих грибів та вірусів.

Срібло представляє інтерес тому, що його дія специфічна не по виду мікроорганізму, як у антибіотиків, а по клітинній структурі. Срібло діє на клітини бактерій, вірусів та інші організми без клітинної стінки [103].

З активним розвитком нанотехнологій оптимістичні прогнози з пошуку нових ефективних антисмікробних засобів та консервантів пов'язують з наночастинками срібла [49, 141, 188]. Їх розміри від 1 до 100 нм; механізм антимікробної дії наносрібла пов'язують з тим, що наночастинки срібла адсорбуються на поверхні мікробної мембрани; руйнують молекули ліпополісахариду, також проникають усередину мембрани, підвищуючи її проникність. Проникаючи всередину клітини, наночастинки срібла зв'язуються з цитохромами і блокують дихальний ланцюг; зв'язуються з компонентами електрон-транспортного ланцюга, а також ДНК, пригнічуючи його; зв'язуються з білками, особливо багатими на сульфгідрильні групи, пригнічуючи активність ферментів [103].

У порівняльних дослідженнях як консервант нами використано композицію наночастинок срібла у матриці натрію хлориду, яка містить 0,25% срібла. Дана композиція, розроблена лабораторією „Електронно-променевої нанотехнології неорганічних матеріалів для медицини” Інституту електрозварювання імені Є.О. Патона.

Вода очищена (ДФУ 2.0, Т. 2, С. 129)

Прозора, безбарвна рідина, без смаку та запаху. Змішується з усіма полярними розчинниками [21].

2.4 Методи дослідження

Для проведення контролю якості досліджуваних зразків емульсійних засобів дотримувались методик та рекомендацій, наведених у ДФУ 2.0., зокрема вимог загальної статті «М'які лікарські засоби для нашкірного застосування». За ДФУ м'які препарати для нашкірного застосування контролюють за наступними показниками: опис, ідентифікація, однорідність, маса вмісту контейнера, мікробіологічна чистота, кількісне визначення. За необхідністю додатково

контролюють розмір часток, рН, характерні властивості основи, супровідні домішки, герметичність контейнера (ДФУ 2.4. с. 279) [21].

У процесі виконання роботи використовували органолептичні, фізико-хімічні, технологічні, мікробіологічні та фармакологічні методи досліджень, що дозволяють об'єктивно оцінити зразки емульсійних засобів і готові лікарські та косметичні форми.

Статистичний аналіз результатів фізико-хімічних досліджень та біологічних випробувань проводили відповідно до ДФУ другого вид., том. 1, п. 5.3 та 5.3.N.1. Статистична обробка отриманих даних проводилась з використанням MS Excel. Дані наведені як середнє значення \pm похибка середнього значення.

2.4.1 Органолептичні методи дослідження

Опис. Контролювали зовнішній вигляд і характерні органолептичні властивості зразків емульсійних засобів (колір, запах, консистенцію тощо). Досліджувані зразки контролювали щодо наявності згірлого запаху. Визначення зовнішнього вигляду та кольору проводили переглядом зразків, нанесених на предметне скло товщиною 2 – 4 мм [21].

Однорідність визначали візуальним контролем дослідних зразків на предметному склі. Зразки мають бути однорідними, тобто не мати видимих часток, сторонніх включень, ознак фізичної нестабільності: агрегації, коалесценції, коагуляції часток [21].

2.4.2 Фізико-хімічні методи дослідження

Для *мікроскопічних* досліджень емульсій використовували мікроскоп Olympus BX51 (Olympus, Японія). Зразки емульсій досліджували за допомогою високоапертурного об'єктива 40x, 0.75 NA та камери LUMC-B11/Sony (Labtron, ВБ). Розмір диспергованих частинок визначали за допомогою програмного комплексу ImageJ, (NIH, США), статистичний аналіз розмірного розподілу частинок в емільсіях обраховували методом ANOVA в програмному комплексі GraphPad Prizm (GraphPad Software, США).

Мікроскопічні дослідження проводились на кафедрі гістології, цитології та ембріології під керівництвом д.біол.н., професора Білого Р.О.

Визначення *термостабільності* проводили на п'яти зразках емульсійних засобів, кожен із яких поміщали в скляні пробірки діаметром 15 мм і висотою 150 мм. Пробірки зі зразками термостатували за температури $(42,5 \pm 2,5)$ °С протягом 7 діб. Переносили досліджувані зразки на 7 діб у холодильник із температурою (6 ± 2) °С, після чого протягом 3-х діб їх витримували за кімнатної температури. Результат оцінювали візуально: якщо в жодній пробірці не спостерігали розшарування, то зразок вважали стабільним.

Дослідження *колоїдної стабільності* проводили за допомогою лабораторної центрифуги, набору пробірок, ртутного термометра, секундоміра і водяної бані. Пробірки наповнювали модельними зразками гелю на 2 / 3 об'єму таким чином, щоб їх маси не відрізнялися більш ніж на 0,02 г, і зважували з точністю до 0,01 г. Ставили досліджувані зразки у водяну баню за температури $(42,5 \pm 2,5)$ °С на 20 хв. Після цього їх центрифугували протягом 5 хв зі швидкістю 6000 об / хв. Стабільність досліджуваних модельних зразків визначали візуально за відсутністю розшарування.

Потенціометричне визначення рН проводили відповідно до ДФУ другого вид., том. 1, п. 2.2.3, з допомогою рН-метра, градуйованого в одиницях рН, з чутливістю 0,05 одиниць рН. Всі вимірювання проводили при температурі 20 - 25 °С. Прилад калібрували за допомогою стандартних буферних розчинів [21].

Ідентифікація ліпідів. Якісний аналіз і препаративне виділення ліпідів проводять методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) [116, 132, 139] на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 ("Merck") у системах розчинників: а) для полярних ліпідів: хлороформ-метанол-ацетон-оцтова кислота (90:10:6:1); б) для неполярних ліпідів: гексан-діетиловий ефір-оцтова кислота (90:10:1). Ідентифікацію ліпідів проводять шляхом візуалізації пластинок за допомогою специфічних реагентів (5%-ого спиртового розчину фосфорномолібденової кислоти, орцинового реагенту для рамноліпідів). Пластинки проявляють при 110° С. Для ідентифікації застосовують рамноліпіди як маркери [148].

Кількісне визначення рамноліпідів

Концентрацію рамноліпідів у супернатанті культуральної рідини визначають спектрофотометричним методом за методикою [119] з деякими модифікаціями. Приблизно 400 мкл супернатанту культуральної рідини двічі екстрагують 750 мкл діетилового ефіру. Після перемішування протягом 3 хвилин на вортексі та відстоювання фракцій, відбирають ефірну фракцію, випарюють і додають 400 мкл фосфатного буфера з рН 8. До 100 мкл отриманого зразка додають 900 мкл реагенту орцинол (0,19% мас./об. орцинолу в 53% об./об. H_2SO_4). Після нагрівання протягом 30 хв при 80 °С зразки охолоджують до кімнатної температури. Оптичну густину зразків визначають за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 421 нм [174, 148, 114, 119].

Для визначення концентрації рамноліпідів у біокомплексі *PS*, біопрепарат розчиняють у воді очищеній: 1 г біокомплексу в 100 мл води очищеної, перемішують на вортексі із додаванням декількох крапель 10% розчину NaOH для доведення рН зразка до 6,5-7,0. Отриманий розчин аналізують за методикою визначення концентрації рамноліпідів у супернатанті культуральної рідини із перерахунком кількості рамноліпідів на 1 г біокомплексу *PS*.

Для визначення концентрації рамноліпідів в емульсійних засобах, стабілізованих біокомплексом *PS*, 10 г емульсійного засобу поміщають у конічну колбу місткістю 250 мл, додають 100 мл води очищеної, перемішують на вортексі. Після розчинення крему фільтрують через беззольний фільтр. Фільтрат двічі екстрагують діетиловим ефіром. Після перемішування протягом 3 хвилин на вортексі та відстоювання фракцій, відбирають ефірну фракцію, випарюють, додають декілька крапель 10% розчину NaOH для доведення рН зразка до 6,5-7,0. Отриманий розчин аналізують за методикою визначення концентрації рамноліпідів у супернатанті культуральної рідини та у біокомплексі *PS* із перерахунком кількості рамноліпідів на 1 г емульсійного засобу.

2.4.3 Технологічні методи дослідження

Емульсії типу м/в з вмістом масляної фази 30% виготовляли у лабораторних умовах з використанням лабораторного гомогенізатора при швидкості перемішування 2000 об/хв, час гомогенізації – 15 хв [21].

Перед проведенням мікроскопічних досліджень емульсії піддавали ультразвуковій дисперсії протягом 5 хв за допомогою ультразвукового диспергатора УЗДН-А650Т (Академприлад, Україна).

2.4.4 Методи комп'ютерного моделювання

Для зменшення кількості технологічних експериментів при розробці емульсійних засобів стабілізованих біокомплексом PS розроблено та використано метод комп'ютерного моделювання складу емульсій у програмі MO Excel, який базується на застосуванні системи гідрофільно-ліпофільного балансу.

Метод комп'ютерного моделювання використано для обґрунтування вибору кількісного складу олійної фази емульсійних засобів та суміші емульгаторів I і II роду для стабілізації емульсій типу м/в. У процесах моделювання біокомплекс PS досліджено як самостійний емульгатор у емульсіях типу м/в, а також як співемульгатор даного типу емульсій у поєднанні з емульгаторами II роду.

2.4.5 Мікробіологічні методи досліджень

Мікробіологічну чистоту досліджуваних емульсійних засобів визначали відповідно до ДФУ другого вид., том. 1, п. 5.1.4 Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів та субстанцій для фармацевтичного застосування, п. 2.6.12 Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів: визначення числа мікроорганізмів та п. 2.6.13 Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів: випробування на окремі види мікроорганізмів [21]. Критерії прийнятності мікробіологічної чистоти наведені в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Критерії прийнятності (відповідно до ДФУ табл. 5.1.4.-1)

Шлях введення	ТАМС КУО/г або КУО/мл	ТУМС КУО/г або КУО/мл	Окремі види мікрорганізмів
Неводні лікарські засоби для орального застосування	10^3	10^2	Відсутність <i>Escherichia coli</i> в 1 г або 1 мл
Водні лікарські засоби для орального застосування	10^2	10^1	Відсутність <i>Escherichia coli</i> в 1 г або 1 мл
Для нашкоїрного застосування	10^2	10^1	Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г або 1 мл Відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г або 1 мл

Ефективність антимікробних консервантів досліджуваних емульсійних засобів визначали відповідно до ДФУ другого вид., том. 1, п. 5.1.3 Ефективність антимікробних консервантів [21]. Критерії прийнятності мікробіологічної чистоти наведені в табл. 2.2.

Мікробіологічні дослідження проводились в умовах біологічної лабораторії відділу контролю якості АТ «Галичфарм» під керівництвом завідувача лабораторії Ділай Н.В.

Таблиця 2.2

Критерії прийнятності ефективності антимікробних консервантів для лікарських засобів для нашкірного застосування (відповідно до ДФУ табл. 5.1.3.-2)

		Lg зменшення			
		2 доби	7 діб	14 діб	28 діб
Бактерії	A	2	3	-	НВ
	B	-	-	3	НЗ
Гриби	A	-	-	2	НЗ
	B	-	-	1	НЗ

2.4.6 Токсикологічні методи досліджень

Під час проведення досліджень на тваринах дотримувались принципів біоетики, законодавчих норм та вимог Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях, від 18 березня 1986 року, Директиви Європейського парламенту та Ради ЄС 2010/63/ЄС від 22 вересня 2010 року про захист тварин, які використовуються для наукових цілей, наказу Міністерства охорони здоров'я України від 14 грудня 2009 року № 944 «Про затвердження порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів» та Закону України від 21 лютого 2006 року № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [136, 89, 86, 88].

Тварин, які використовувались у фармакологічних дослідженнях, утримували в стандартних умовах віварію за температури повітря 22-24 °С та відносної вологості 50-70 % з вільним доступом до корму та води. Групи тварин формували за методом рандомізації.

Алергенну дію біокомплексу PS визначали методом внутрішньошкірної сенсibilізації морських свинок.

Для експерименту використовували 20 мурчаків білої масті віком 3-3,5 місяці і масою тіла 280-350 г, які утримувались в умовах віварію Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького при температурі 19,6-21,5⁰С в умовах природного світлового циклу на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до води та їжі.

Сенсибілізацію проводили за методом О.Г. Алексєєвої, А.І. Петкевич шляхом внутрішньошкірного введення біопрепарату розведеного ізотонічному розчині натрію хлориду в шкіру зовнішньої поверхні вуха тварини. Ступінь сенсибілізації встановлювали після постановки внутрішньошкірних проб в розведеннях: 1:10, 1:100, 1:200 [110].

Реакцію організму оцінювали шляхом візуального огляду поверхні шкіри та за результатами клінічних і алергічних тестів - індекс співвідношення лімфоцитів та моноцитів (ІСЛМ), індекс співвідношення нейтрофілів та моноцитів (ІСНМ), індекс співвідношення нейтрофілів та еозинофілів (ІСНЕ), реакція специфічного лізису лейкоцитів (РСЛЛ), реакція специфічної агломерації лейкоцитів крові (РСАЛ).

Подразнювальну дію біокомплексу PS визначали шляхом внесення біопрепарату в розведенні 1:10 в кон'юнктивальний мішок ока кроля. Спостерігали за станом слизової оболонки і прозорістю рогівки. Ступінь пошкодження оцінювали за класифікацією А. Majdai, К. Chrusaielska.

Фармакологічні дослідження проводили на базі ЦНДЛ та лабораторії промислової токсикології ЛНМУ імені Данила Галицького під керівництвом ст.н.сп., к.мед.н. Грушки О.І.

Висновки до розділу 2:

1. Розроблено загальний план досліджень з вивчення консервуючої та емульгуючої активності поверхнево-активних речовин мікробного походження на основі рамноліпідів *Pseudomonas* sp. PS-17 під умовною назвою біокомплекс PS та обґрунтовано послідовність етапів дослідження.

2. Для дослідження консервуючої та емульгуючої здатності біокомплексу PS та порівняння активності з відомими консервантами та емульгаторами вибрано емульсійні основи, оскільки емульсійні форми становлять близько 90% всіх косметичних засобів та значну частину лікарських засобів для нашкірного застосування.
3. Охарактеризовано об'єкти дослідження – біокомплекс PS та допоміжні речовини, використані при проведенні досліджень з розробки емульсійних засобів. Наведено їх фізико-хімічні властивості, які визначають спосіб їх введення до лікарських та косметичних форм.
4. Визначено обсяг методів досліджень, необхідних для створення емульсійних засобів, стабілізованих біокомплексом PS, які включають фізико-хімічні, фармако-технологічні, мікробіологічні та фармакологічні випробування

Результати досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Розробка косметичних засобів з консервантами мікробного походження. “Довкілля і здоров'я” присвяченої 30-річчю Чорнобильської катастрофи: зб. матеріалів наук.-практ. Конференції, Тернопіль, 2016, с.89. (Особистий внесок: проведення дослідження, написання тез).
2. Пелех І.Р., Білоус С.Б., Ділай Н.В. Дослідження консервуючої активності біокомплексу PS. “Сучасні досягнення фармацевтичної біотехнології”: зб. матеріалів V наук.-практ. інтернет-конференції з міжнародною участю, Харків, 2016, с.457. (Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез).
3. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Дослідження нових допоміжних речовин мікробного походження. “Управління якістю в фармації”: зб. матеріалів XIV наук.-практ. конференції, Харків, 2020, с.119. (Особистий внесок: проведення дослідження, написання тез).

РОЗДІЛ III

ВИВЧЕННЯ КОНСЕРВУЮЧОЇ АКТИВНОСТІ БІОКОМПЛЕКСУ PS

3.1 Обґрунтування складу емульсій для дослідження консервуючої здатності біокомплексу PS

Враховуючи, що на сьогодні емульсійні форми становлять близько 90% всіх косметичних кремів та широко застосовуються у складі м'яких лікарських засобів [98], для дослідження консервуючої здатності біокомплексу PS та порівняння його активності з відомими консервантами нами використано емульсійні креми типу м/в та в/м.

Як косметичні або лікарські засоби креми емульсійні мають відповідати таким вимогам:

- вільно видавлюватись із туб чи вилитись із флакона (екструзія);
- легко наноситись і всмоктуватись шкірою;
- мати цілеспрямовану лікувальну або косметичну дію на шкіру;
- легко видалятися із поверхні шкіри.

В емульсіях типу м/в дисперсійним середовищем є водна фаза, в якій дисперговані краплі олії. Активні речовини, розчинені у зовнішній водній фазі, легко вивільняються. Недоліком таких емульсій є ймовірність випаровування водної дисперсної фази, а також при виготовленні таких емульсій особливу увагу слід приділяти консервації, оскільки зовнішня водна фаза є сприятливим середовищем для розвитку бактерій та плісневих грибів [36, 84].

В емульсіях типу в/м дисперсійним середовищем є масляна фаза, в якій дисперговані краплі води. Емульсію такого типу утворюють піт і шкірне сало, які є на поверхні шкіри [36]. В складі лікарського або косметичного засобу така емульсія володіє добрими захисними властивостями, створює на шкірі шар, подібний до природного захисного шару, сприяє утриманню вологи в шкірі, потребує застосування меншої кількості консервантів. Емульсійні системи типу в/м характеризуються високим вмістом жирних компонентів – від 30 до 70%, а

кількість водної фази обмежена до 30-50%.

Склади використаних нами емульсійних засобів для дослідження консервуючої здатності біокомплексу PS наведені у таблиці 3.1 [27].

Таблиця 3.1

Склади досліджуваних емульсій

Емульсія м/в		Емульсія в/м	
Олія оливкова	29,0	Олія оливкова	60,0
Пропіленгліколь	4,0	Пропіленгліколь	4,0
Гліцерилмоностеарат	5,0	Гліцерилмоностеарат	2,0
Цетиловий спирт	2,0	Цетиловий спирт	5,0
Запашник	1 кр.	Запашник	1 кр.
Вода очищена	до 100,0	Вода очищена	до 100,0

У досліджуваних емульсійних засобах як масляна фаза використана олія оливкова, яка часто застосовується у складі дерматологічних засобів. За кислотним складом дана олія належить до лінолево-олеїнових олій. Містить ненасичені жирні кислоти, вітамін Е, незначну кількість мінеральних речовин. В медицині та косметології олію оливкову застосовують вже тисячі років, тому її можна вважати компонентом перевіченим часом. Олія оливкова застосовується в складі різноманітних кремів, очисних емульсій, масажних засобів, використовується для приготування олійних витяжок з лікарської рослинної сировини [27, 68, 70].

Як емульгатори у досліджуваних емульсійних засобах використані різні комбінації гліцерилмоностеарату та цетилового спирту, які також сприяють загущуванню системи та мають пом'якшувальні властивості. Введення гліцерилмоностеарату до складу нашкірних емульсійних засобів забезпечує створення доброї текстури засобу. За результатами маркетингових досліджень та даними наукової літератури дані емульгатори досить часто застосовуються у складі сучасних дерматологічних засобів [67].

Пропіленгліколь запобігає висиханню водної фази в кремах та сприяє всмоктуванню багатьох АФІ.

3.2. Обґрунтування технології емульсій для дослідження консервуючої здатності біокомплексу PS

Технологія емульсійних кремів значною мірою впливає на показники їх якості, зокрема стабільність, сенсорні властивості та у кінцевому результаті на їх терапевтичну активність.

Виготовлення емульсійних систем проводили із застосуванням технологічних правил і прийомів, які застосовуються при виготовленні м'яких лікарських засобів: сплавлення речовин з різною температурою топлення, введення до сплавів рідин, додавання термолабільних компонентів і ароматизуючих добавок. Дослідні зразки емульсійних кремів у лабораторних умовах виготовляли з використанням лабораторного гомогенізатора при швидкості перемішування від 500 до 2000 об/хв. Візуально визначали вплив швидкості та часу емульгування на стабільність і однорідність емульсій. Дослідні зразки емульсійних засобів оцінювали за органолептичними (зовнішній вигляд, колір) та споживчими властивостями (легкість нанесення, липкість, відчуття і стан шкіри після нанесення) [27, 68, 70]. Проведені дослідження дозволили обрати оптимальну швидкість перемішування крему – 2000 об/хв і час гомогенізації – 15 хв [48, 84, 92].

При виготовленні емульсійних кремів слідкували за попаданням у масу повітря, що може мати місце при виготовленні невеликої кількості засобу або при гомогенізації [97]. Для видалення повітря виготовлений емульсійний крем залишали у спокої на кілька годин (вистоювання), потім обережно перемішували [21, 97].

Технологічна схема виробництва емульсійних кремів наведена на рис. 3.1

Оцінку якості виготовлених емульсійних кремів проводили за такими показниками: однорідність, стабільність, консистенція, рН.

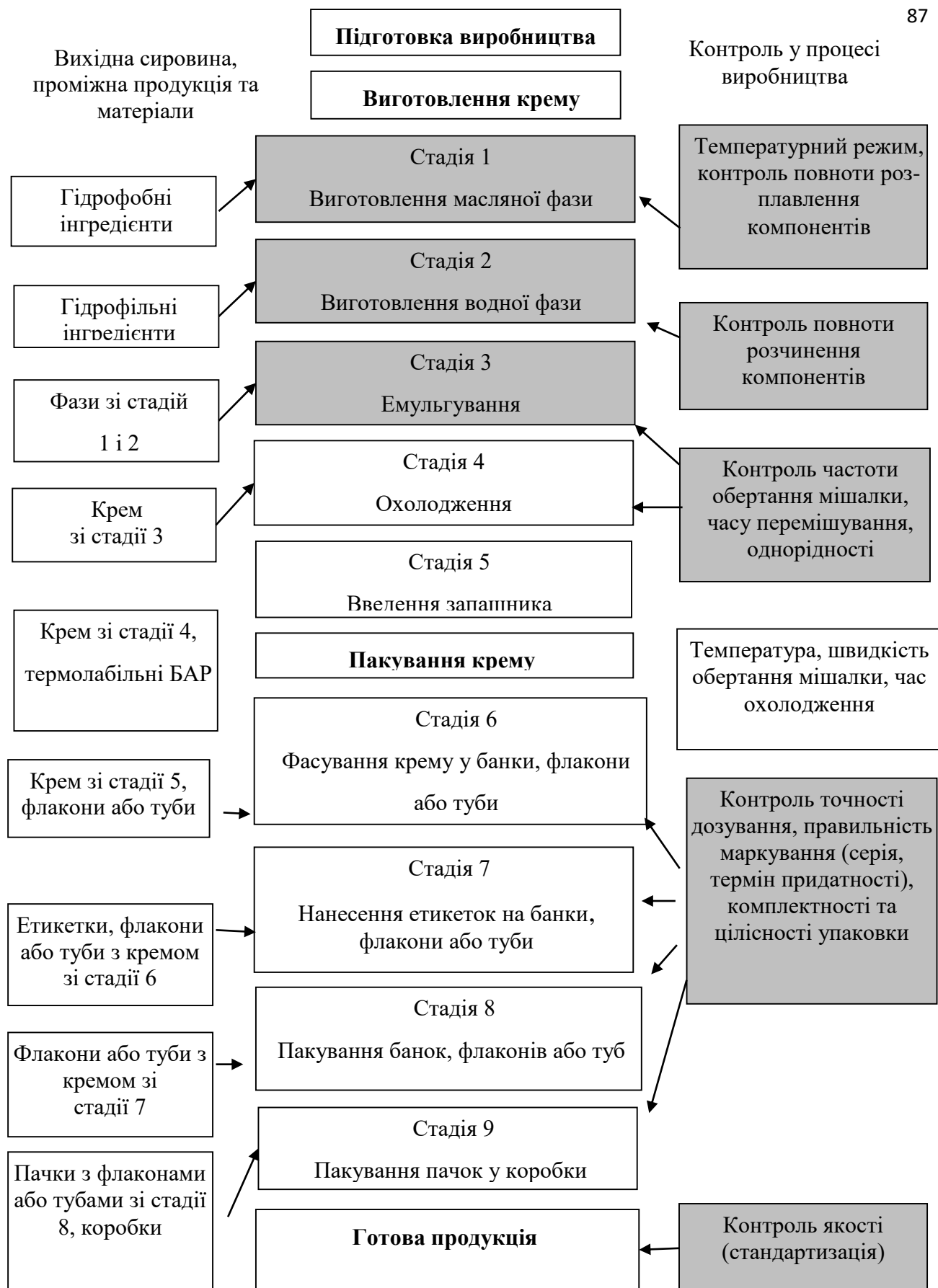


Рис. 3.1 Технологічна схема виробництва кремів

Примітки: Сірим кольором позначені критичні стадії та критичні контролю в процесі виробництва.

Стабільність – один із основних показників, який характеризує якість емульсійних систем [46]. У них не повинна відділятися олійна чи водна фаза упродовж терміну зберігання, а також при зміні температури навколишнього середовища в інтервалі від +5 до +25 °С.

Косметичні властивості емульсійних засобів багато в чому залежать від консистенції – одного з найважливіших показників, що визначають їх споживчу характеристику, також від консистенції залежить швидкість проникнення в шкіру БАР [84, 92].

Для визначення рН в емульсійних системах застосовували потенціометричний метод [13, 19, 42]. В емульсійних системах типу м/в рН встановлювали безпосередньо в досліджуваних зразках. В емульсіях типу в/м визначали рН водної витяжки. рН досліджуваних емульсій становив від 5,37 – до 5,62, що відповідає рН здорової шкіри. Виготовлені емульсії мають добру консистенцію, легко наносяться на шкіру та рівномірно розподіляються.

При виготовленні емульсійних кремів спочатку виготовляли масляну фазу шляхом сплавлення вищого жирного спирту та гліцерилмоностеарату. Емульгування з водною фазою проводили з використанням високо/низько температурного режиму шляхом додавання до гарячої масляної фази холодної водної фази, що зменшує час охолодження крему та значно пришвидшує процес його приготування [67].

3.3. Вибір консервантів для порівняльних досліджень

Номенклатура консервантів, які застосовуються на даний час в медицині та косметичці є достатньо широкою – це близько 50 консервантів різних класів хімічних сполук [175].

Беручи до уваги, що найчастіше у складі м'яких лікарських засобів для наскірнього застосування та косметичних засобів використовують наступні консерванти: парабени (ніпагін та ніпазол), солі бензойної кислоти (натрію бензоат) та бензалконію хлорид, у дослідженні для порівняння консервуючої здатності біокомплексу PS були вибрані саме ці консерванти, а також композиція

наночастинок срібла у матриці натрію хлориду, яка містить 0,25 % наночастинок срібла [27, 68, 70].

У косметичній продукції, відповідно до Технічного регламенту ЄС №1223/2009 та Технічного Регламенту України, затвердженого Постановою КМУ від 20.02.2021 року №65, встановлені обмеження концентрацій консервантів залежно від призначення косметичного засобу [175, 87].

Бензалконію хлорид найчастіше застосовують у косметичних засобах для догляду за волоссям (голови), що змиваються. Як відомо, при використанні таких засобів необхідно уникати контакту з очима. А у кінцевому продукті концентрація даного консерванта не повинна перевищувати 0,1% (у перерахунку на бензалконію хлорид) [175].

Натрію бензоат (сіль бензойної кислоти) також один із найпоширеніших консервантів, які дозволено використовувати у косметичних засобах відповідно до Технічного регламенту ЄС №1223/2009 та Технічного Регламенту України. Даний консервант можна застосовувати у продукції, яка змивається і максимально допустима концентрація в такому випадку складає 2,5%. Також можливе застосування у продукції, яка не змивається, але в цьому випадку максимально допустима концентрація буде 0,5%. У випадку коли натрію бензоат буде використовуватись у засобах для догляду за ротовою порожниною, то концентрація консерванта може становити 1,7% [175, 87].

Ніпагін або метилпарабен (метил-пара-гідроксибензоат) найчастіше застосовують як консервант у лікарських та косметичних засобах. Максимально допустима концентрація 0,4% (кислота) для одного ефіру та 0,8% для суміші ефірів. Ефективність метилпарабену збільшується при додаванні 2-5% пропіленгліколю [175].

Ніпазол або пропілпарабен (пропіл-пара-гідроксибензоат) заборонено застосовувати у засобах, які не змиваються, а також не застосовують на пелюшках дітям до трьох років. Максимально допустима концентрація 0,14% (кислота) для суми окремих компонентів або 0,8% (кислота) для сумішей речовин [175].

Склади досліджуваних емульсійних кремів з різними консервантами наведені у таблиці 3.2. Консерванти вводили у водну фазу емульсійної системи.

Таблиця 3.2

Склади досліджуваних емульсійних кремів з різними консервантами

Типи емульсій		Консервант	Концентрація консерванту, %
Емульсії типу масло/вода	Склад № 1	Ніпагін:Ніпазол, 1:3	0,400
	Склад № 2	Натрію бензоат	0,250
	Склад № 3	Бензалконію хлорид	0,050
	Склад № 4	Натрію хлорид з наночастинками срібла	0,500
	Склад № 5	БіоПАР	0,025
	Склад № 6	БіоПАР	0,050
	Склад № 7	БіоПАР	0,100
	Склад № 8	Парабени + БіоПАР	0,200+0,050
	Склад № 9	Бензоат натрію + БіоПАР	0,125+0,050
	Склад № 10	Бензалконію хлорид + БіоПАР	0,025+0,050
Емульсії типу вода/масло	Склад № 11	Ніпагін:Ніпазол, 1:3	0,200
	Склад № 12	Натрію бензоат	0,125
	Склад № 13	Бензалконію хлорид	0,025
	Склад № 14	Натрію хлорид з наночастинками срібла	0,250
	Склад № 15	БіоПАР	0,025
	Склад № 16	БіоПАР	0,050
	Склад № 17	БіоПАР	0,100
	Склад № 18	Парабени + БіоПАР	0,100+0,050
	Склад № 19	Бензоат натрію + БіоПАР	0,050+0,050
	Склад № 20	Бензалконію хлорид + БіоПАР	0,010+0,050

З метою вивчення консервуючої активності біокомплексу PS розроблено 10 складів емульсійних кремів кожного типу емульсії з різною концентрацією біокомплексу PS, а також з сумісним застосуванням біокомплексу PS з іншими відомими консервантами - парабенами (ніпагін та ніпазол), натрію бензоатом, бензалконію хлоридом, а також композицією наночастинок срібла у матриці натрію хлориду [27, 68, 70].

При виборі концентрації консервантів у складі досліджуваних емульсій враховували встановлені обмеження їх концентрацій у косметичних засобах [175]. У складі емульсій типу м/в консерванти застосовували у подвійній кількості в порівнянні з концентрацією консервантів у емульсіях типу в/м.

При виготовленні емульсій типу м/в, до складу яких входив біокомплекс PS спостерігалось, що даний біоПАР має емульгуючу здатність, сприяє швидшому утворенню емульсій, тому може використовуватись в якості емульгатора [27, 68, 70].

3.4 Дослідження ефективності антимікробних консервантів

На стадії розробки лікарського чи косметичного засобу треба довести, що антимікробна активність забезпечує належний захист від небажаних ефектів, які можуть бути результатом мікробного забруднення.

Ефективність антимікробного консерванта може посилюватися або послаблюватися в результаті взаємодії з діючою речовиною або іншими компонентами, пакувальними матеріалами. Тому протягом терміну придатності треба контролювати антимікробну активність, з метою доказу того, що вона не знижується в процесі зберігання.

Для такого контролю можуть бути використані зразки, добуті з контейнера безпосередньо перед випробовуванням [27, 68, 70].

Антимікробні консерванти у складі лікарських та косметичних засобів повинні забезпечити їх відповідність вимогам мікробіологічної чистоти, які нормуються відповідними нормативними документами, зокрема ДФУ II видання

та Європейською Фармакопеєю [21, 137].

Відповідно до ДФУ II видання для нестерильних лікарських засобів, зокрема засобів для нашкірного застосування встановлені наступні критерії прийнятності мікробіологічної чистоти (табл.3.3).

Таблиця 3.3

Критерії прийнятності мікробіологічної чистоти лікарських засобів

Шлях введення	ТАМС КУО/г або КУО/мл	ТУМС КУО/г або КУО/мл	Окремі види мікроорганізмів
Для нашкірного застосування	10^2	10^1	Відсутність <i>Staphylococcus aureus</i> в 1 г або 1 мл Відсутність <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в 1 г або 1 мл

Критерії базуються на загальному числі аеробних мікроорганізмів (ТАМС) та загальному числі дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) в 1 г або 1 мл лікарського засобу. Критерії прийнятності ґрунтуються на середньому результаті декількох повторних випробувань [21].

Виробники лікарських або косметичних засобів повинні забезпечити низький рівень мікробного забруднення засобів під час виробництва, пакування, зберігання, дистрибуції та застосування.

Для косметичних кремів, призначених для нанесення на шкіру, крім засобів, призначених для дітей до 3 років та тих, які у процесі застосування можуть контактувати зі слизовими оболонками, дозволяється дещо вищий вміст мікроорганізмів в 1 г або 1 мл засобу (табл.3.4). [23, 137].

Таблиця 3.4

Мікробіологічні показники косметичних кремів

Назва показника	Характеристика і норма
Кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів, КУО/г(см ³), не більше ніж	1000
Бактерії Enterobactereaceae в 1 г(см ³)	Немає
Staphylococcus aureus в 1г(см ³)	Немає
Pseudomonas aeruginosa в 1г(см ³)	Немає
Кількість дріжджів та пліснявих грибів, КУО/г(см ³), не більше ніж	100

З метою дослідження можливості застосування біокомплексу PS як консерванту в лікарських і косметичних засобах, який буде забезпечувати належну мікробіологічну чистоту засобу, авторами проведено визначення ефективності антимікробних консервантів у виготовлених емульсійних засобах за методикою ДФУ II вид. [21]. Дослідження проведено в умовах біологічної лабораторії відділу контролю якості АТ «Галичфарм» під керівництвом завідувача лабораторії Ділай Н.В.

ДФУ встановлює критерії прийнятності ефективності антимікробних консервантів для лікарських засобів для наскірного застосування у вигляді логарифма (lg) зменшення числа життєздатних мікроорганізмів (МО) по відношенню до визначеного вихідного числа МО. Для критерію прийнятності А через дві доби lg зменшення повинен становити не менше 2, через 7 діб – не

менше 3, в подальшому число життєздатних клітин бактерій не повинно збільшуватись. I_g зменшення числа життєздатних клітин грибів через 14 діб повинен становити не менше 2, в подальшому число життєздатних клітин грибів не повинно збільшуватись. Критерій А відповідає рекомендованій ефективності. Якщо обґрунтовано, що критерій А не може бути досягнутий, лікарський засіб має задовольняти критерій В. У відповідності до вимог критерію В у препаратах для нашкірного застосування I_g зниження кількості життєздатних клітин бактерій через 14 днів повинен становити не менше 3, в подальшому кількість життєздатних клітин бактерій не повинна збільшуватись. I_g зниження кількості життєздатних клітин грибів через 14 днів повинен становити не менше 1, в подальшому кількість життєздатних клітин грибів не повинна збільшуватись (табл. 3.5) [21].

Таблиця 3.5

**Критерії прийнятності ефективності антимікробних консервантів
для лікарських засобів для нашкірного застосування**

		L _g зменшення			
		2 доби	7 діб	14 діб	28 діб
Бактерії	А	2	3	–	НЗ
	В	–	–	3	НЗ
Гриби	А	–	–	2	НЗ
	В	–	–	1	НЗ

НЗ – не спостерігається збільшення числа МО у порівнянні з кількістю життєздатних МО у попередній контрольній точці.

Ефективність використаних антимікробних консервантів у виготовлених емульсійних засобах була досліджена відповідно до фармакопейних критеріїв (табл. 3.6).

Для порівняння проводились дослідження емульсій без консервантів. За результатами дослідження емульсії м/в і в/м без консервантів не відповідають ні критерію А, ні критерію В, тобто не можуть застосовуватись як основи косметичних або лікарських засобів, оскільки не будуть забезпечувати належної

мікробіологічної чистоти під час виробництва, пакування, зберігання, дистрибуції та застосування [27, 68, 70].

З даних представлених у табл. 3.6 видно, що консервуючі системи найбільш ефективні щодо досліджуваних тест-штамів мікроорганізмів у зразках:

– № 7 м/в (БіоПАР – 0,100), № 10 в/м (Бензалконію хлорид + БіоПАР – 0,025+0,050), № 16 в/м (БіоПАР – 0,050);

– № 17 в/м (БіоПАР – 0,100);

– № 18 в/м (Парабени + БіоПАР – 0,100+0,050);

– № 19 в/м (Бензоат натрію + БіоПАР – 0,050+0,050);

– № 20 в/м (Бензалконію хлорид + БіоПАР – 0,010+0,050).

Володіють ефективною антимікробною дією на рівні критерію А, щодо *S. aureus*, *C. albicans* та *A. brasiliensis*, проте менш ефективні щодо *P. aeruginosa* – на рівні критерію В зразки:

– № 13 в/м (Бензалконію хлорид 0,025);

– № 15 в/м (БіоПАР 0,025), № 6 м/в (БіоПАР 0,050);

– № 8 м/в (Парабени + БіоПАР – 0,200+0,050).

Володіють ефективною антимікробною дією на рівні критерію А, щодо *C. albicans* та *A. brasiliensis*, але менш ефективні щодо *S. aureus* та *P. aeruginosa* – на рівні критерію В зразки: № 11 в/м (Ніпагін:Ніпазол, 1:3 – 0,200) та № 14 в/м (Натрію хлорид з наночастинками срібла – 0,250).

Також ефективний на рівні критерію А щодо *P. aeruginosa*, *C. albicans* та *A. brasiliensis*, але на рівні критерію В до *S. aureus* зразок № 12 в/м (Натрію бензоат 0,125).

Зразок № 1 м/в (Ніпагін:Ніпазол, 1:3 – 0,400) ефективний на рівні критерію А щодо *P. aeruginosa* та *A. brasiliensis* і на рівні критерію В щодо *S. aureus* та *C. albicans*. Зразки № 2 м/в (Натрію бензоат 0,205), № 3 м/в (Бензалконію хлорид 0,050), № 4 м/в (Натрію хлорид з наночастинками срібла 0,500), № 5 м/в (БіоПАР 0,025), № 6 м/в (БіоПАР 0,100) та № 9 м/в (Бензоат натрію + БіоПАР – 0,125+0,050) виявляли невідповідність критерію А та В щодо одного або декількох досліджуваних тест-штамів мікроорганізмів тому не можуть бути

використані як ефективні антимікробні консерванти без додаткових досліджень [27, 68, 70].

Таблиця 3.6

Результати дослідження ефективності антимікробних консервантів

Досліджувані зразки		Відповідність критерію (A/B)			
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>
Емульсії типу масло/вода	№ 1	B	A	B	A
	№ 2	Не відповідає	Не відповідає	Не відповідає	B
	№ 3	A	Не відповідає	A	B
	№ 4	Не відповідає	Не відповідає	A	A
	№ 5	Не відповідає	B	A	Не відповідає
	№ 6	A	B	A	A
	№ 7	A	A	A	A
	№ 8	A	B	A	A
	№ 9	Не відповідає	Не відповідає	A	A
	№ 10	A	A	A	A
Емульсії типу вода/масло	№ 11	B	B	A	A
	№ 12	B	A	A	A
	№ 13	A	B	A	A
	№ 14	B	B	A	A
	№ 15	A	B	A	A
	№ 16	A	A	A	A
	№ 17	A	A	A	A
	№ 18	A	A	A	A
	№ 19	A	A	A	A
	№ 20	A	A	A	A

Як видно з табл. 3.6 біокомплекс PS у досліджуваних концентраціях від 0,025 % до 0,1 % проявляє ефективність як консервант, тобто пригнічує розвиток

тест-мікроорганізмів. Однак у концентрації 0,025 % при застосуванні у складі емульсій типу м/в його ефективність не є задовільною, тобто не відповідає фармакопейним критеріям прийнятності [27, 68, 70].

Сумісне використання біокомплексу PS з іншими консервантами (натрію бензоатом та бензалконію хлоридом) дозволяє зменшити концентрацію останніх у складі емульсійних засобів, оскільки спостерігається підсилення консервуючої активності досліджуваних засобів.

Висновки до розділу 3:

1. Біокомплекс PS можна розглядати як перспективний консервант мікробного походження для лікарських та косметичних засобів. Біокомплекс PS проявляє ефективність як консервант у досліджуваних концентраціях від 0,025% до 0,1%.
2. У мінімальній концентрації 0,025 % біокомплекс PS може бути використаний як консервант лише у емульсіях типу в/м з незначним вмістом водної фази (до 30%). При застосуванні у цій концентрації в складі емульсій типу м/в його ефективність не відповідає фармакопейним критеріям прийнятності.
3. Використання біокомплексу PS у концентраціях 0,05 та 0,1 % відповідає фармакопейним критеріям прийнятності ефективності антимікробних консервантів для емульсійних засобів двох типів.
4. Сумісне використання біокомплексу PS з натрію бензоатом та бензалконію хлоридом підсилює консервуючу активність останніх, що дозволяє зменшити концентрацію консервантів у складі емульсійних засобів.

Результати досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Пелех І.Р., Ділай Н.В., Білоус С.Б., Вільданова Р.І., Шульга О.М. Дослідження біокомплексу PS як перспективного консерванта у складі лікарських та косметичних засобів. *“ScienceRise: Pharmaceutical*

- science*". 2017. №3(7). С.814. (Особистий внесок: планування експерименту, приготування зразків, узагальнення результатів, підготовка статті до друку).
2. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Розробка косметичних засобів з консервантами мікробного походження. "Довкілля і здоров'я" присвяченої 30-річчю Чорнобильської катастрофи: зб. матеріалів наук.-практ. Конференції, Тернопіль, 2016, с.89. (Особистий внесок: проведення дослідження, написання тез).
 3. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Розробка емульсій для дослідження консервуючої активності біокомплексу PS. "Фармацевтична наука та практика: проблеми, досягнення, перспективи розвитку": зб. матеріалів I наук.-практ. інтернет-конференції з міжнародною участю, Харків, 2016, с.76. (Особистий внесок: проведення дослідження, написання тез).
 4. Пелех І.Р., Білоус С.Б., Ділай Н.В. Дослідження консервуючої активності біокомплексу PS. "Сучасні досягнення фармацевтичної біотехнології": зб. матеріалів V наук.-практ. інтернет-конференції з міжнародною участю, Харків, 2016, с.457. (Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез).

РОЗДІЛ IV

ВИВЧЕННЯ ЕМУЛЬГУЮЧОЇ АКТИВНОСТІ БІОКОМПЛЕКСУ PS

4.1 Дослідження емульсійних засобів, стабілізованих біокомплексом PS

Розробка емульсійних засобів, зокрема вибір концентрації емульгаторів, переважно, проводиться на основі експериментальних досліджень, хоч це є досить вартісним і вимагає тривалого часу на проведення досліджень. При проведенні таких експериментальних досліджень найчастіше застосовують емпіричний підхід: виготовляють декілька складів емульсій з різними емульгаторами в однакових або загальновідомих концентраціях, а потім виготовляють склади емульсії з вибраним емульгатором у різних концентраціях. Також досліджують можливість поєднання емульгаторів I і II роду, вивчаючи різні поєднання співемульгаторів з певним сумарним вмістом, який зазвичай не перевищує 10% [92].

На першому етапі нашого дослідження також було застосовано емпіричний підхід до вибору концентрації біокомплексу PS, зокрема було досліджено декілька складів емульсій типу м/в з вмістом масляної фази 30%, у яких біокомплекс PS використано як самостійний емульгатор, а також емульсії, у яких біокомплекс PS використано як співемульгатор у поєднанні з емульгаторами другого роду – ланоліном та гліцерину моностеаратом [177].

Оскільки за показником ГЛБ досліджуваний емульгатор є подібним до полісорбатів (за даними літератури ГЛБ монорамноліпиду становить 13, а дирамноліпиду – 21 [68, 65, 64]), то з метою вибору концентрації біокомплексу PS для одержання стабільних емульсій проводились дослідження емульгуючих властивостей біокомплексу PS у порівнянні з полісорбатом-80. Відомо, що для стабілізації емульсій полісорбат-80 використовують в кількості 1,0-2,0 на 10,0 олії [54], тому у досліджуваних емульсійних засобах біокомплекс PS як самостійний емульгатор використано у концентрації від 4 до 10%. З урахуванням загально відомих підходів до застосування в емульсіях типу м/в 70% емульгатора

I роду і 30% емульгатора II роду, в емульсіях, у яких біокомплекс PS використано як співемульгатор, використали комплексний емульгатор ланолін безводний : біокомплекс PS та гліцерину моностеарат : біокомплекс PS у співвідношенні 70:30 з сумарним вмістом емульгаторів від 4 до 10%.

Виготовлення емульсій передбачало застосування технологічних правил і прийомів, які використовуються при виготовленні м'яких лікарських засобів [92]. Склад досліджуваних емульсійних засобів наведено у таблиці 4.1.

Таблиця 4.1

Емульсійні засоби, стабілізовані біокомплексом PS

Назва компонента	Склад								
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6	№ 7	№ 8	№ 9
Олія виноградних кісточок	30,0								
Біокомплекс PS	4,0	7,0	10,0						
Комплексний емульгатор (ланолін безводний : біокомплекс PS 70:30)				4,0	7,0	10,0			
Комплексний емульгатор (гліцерину моностеарат : біокомплекс PS 70:30)							4,0	7,0	10,0
Вода очищена	до 100,0								

Для дослідження емульсій використовували мікроскоп Olympus BX51 (Olympus, Японія). Зразки емульсій досліджували за допомогою

високоапертурного об'єктива 40x, 0.75 NA та камери LUMC-B11/Sony (Labtron, ВБ). Розмір диспергованих частинок визначали за допомогою програмного комплексу ImageJ, (НИН, США), статистичний аналіз розмірного розподілу частинок в емільсіях обраховували методом ANOVA в програмному комплексі GraphPad Prizm (GraphPad Software, США). Дослідження проведені на кафедрі гістології, цитології та ембріології Львівського національного медичного університету імені Д.Галицького, під керівництвом д.біол.наук, проф. Білого Р.О.

У результаті вивчення стійкості емульсій було встановлено, що емульсії стабілізовані лише біокомплексом PS у досліджуваних концентраціях не є стабільними протягом тривалого часу, вони швидко розшаровуються та вимагають застосування високих концентрацій біокомплексу PS, більше 10%, що є недоцільним та економічно необґрунтованим. Час розшарування емульсій залежить від концентрації біокомплексу PS, найдовше залишались стабільними емульсії з концентрацією біокомплексу PS 10 %. Перемішування зразків протягом 5 хв за допомогою ультразвукового диспергатора УЗДН-А650Т (Академприлад, Україна) не сприяло суттєвому покращенню стабільності емульсій. На рис.4.1 показано мікроструктуру експериментальних зразків № 1-6.

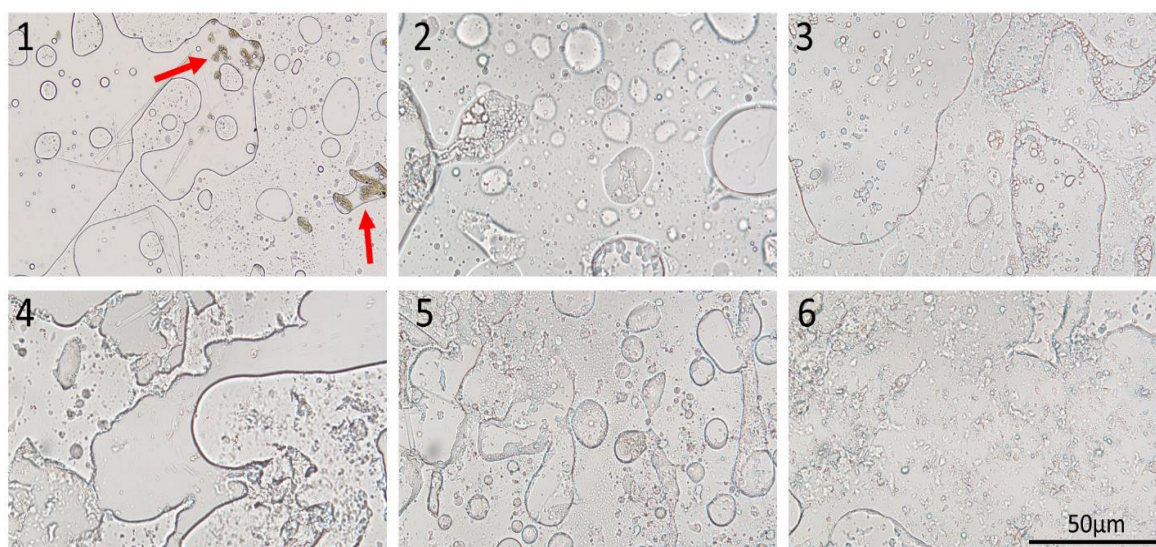


Рис. 4.1. Мікрофотографії досліджуваних зразків емульсій № 1-6.

Через 12 місяців зберігання емульсій № 1-2 спостерігалось їх розшарування та утворення темних включень, що свідчить про мікробіологічне забруднення і необхідність введення додаткового консерванта (рис. 4.1, червоні стрілки). Такі результати підтверджують одержані нами раніше результати про непридатність застосування біокомплексу PS як єдиного консерванта в емульсіях м/в, а лише у складі комплексного консерванта [192].

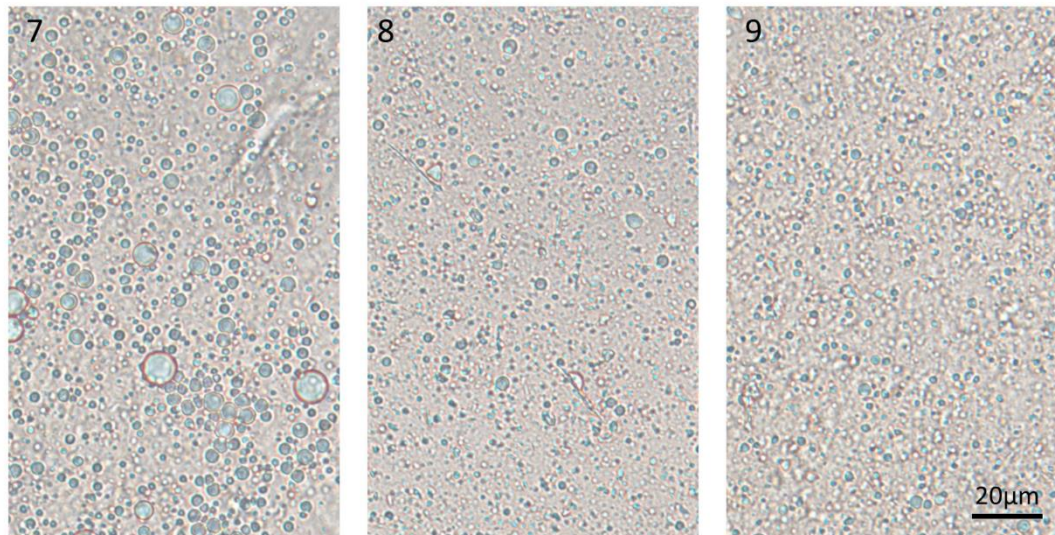
Поєднання біокомплексу PS з іншими ПАР, у співвідношенні 30% емульгатора 1 роду (біокомплекс PS) і 70% - 2 роду, дозволяє отримати більш стійкі емульсії, стабільність яких додатково підтверджена мікроскопічними дослідженнями (рис. 4.1) [167, 71, 192].

За результатами дослідження органолептичних та мікроскопічних характеристик зразків емульсійних засобів з комплексним емульгатором (ланолін безводний:біокомплекс PS 70:30) встановлено оптимальну концентрацію комплексного емульгатора 10% (склад № 6); використана концентрація комплексного емульгатора в кількості 4% не забезпечувала утворення стабільної емульсії (склад № 4) – емульсія розшаровувалась, характеризувалась низькою в'язкістю; використання 7% комплексного емульгатора сприяло утворенню емульсії з великим розміром частинок дисперсної фази (склад № 5).

На рис. 4.2 показано мікроструктуру експериментальних зразків № 7-9 та розмірний розподіл їх часточок.

Використання комплексного емульгатора (гліцерину моностеарат: біокомплекс PS 70:30) в усіх досліджуваних концентраціях забезпечувало утворення стабільних емульсій (склади № 7-9), проте використання 10 % емульгатора сприяє надмірному загущенню емульсії (склад № 9). Оптимальною концентрацією даного комплексного емульгатора є 7% (склад № 8). Середній розмір часточок в емульсіях становив $1,665 \pm 1,032$ мкм (середнє значення \pm стандартне відхилення) для зразка № 7 з медіаною розмірів 1,37 мкм, $n = 1123$, для зразка № 8 середній розмір частинок становив $1,024 \pm 0.670$ мкм з медіаною розмірного розподілу при 0,85 мкм, $n = 6869$, та для зразка № 9 середній розмір

частинок становив $1,123 \text{ мкм} \pm 0,653 \text{ мкм}$ з медіаною розмірного розподілу при $0,992 \text{ мкм}$, $n=2154$. Зразки № 7-9 достовірно розрізнялись за розмірним розподілом часточок в емульсіях (рис.4.2), визначених методом ANOVA, $p<0.0001$).



Size distribution of particles

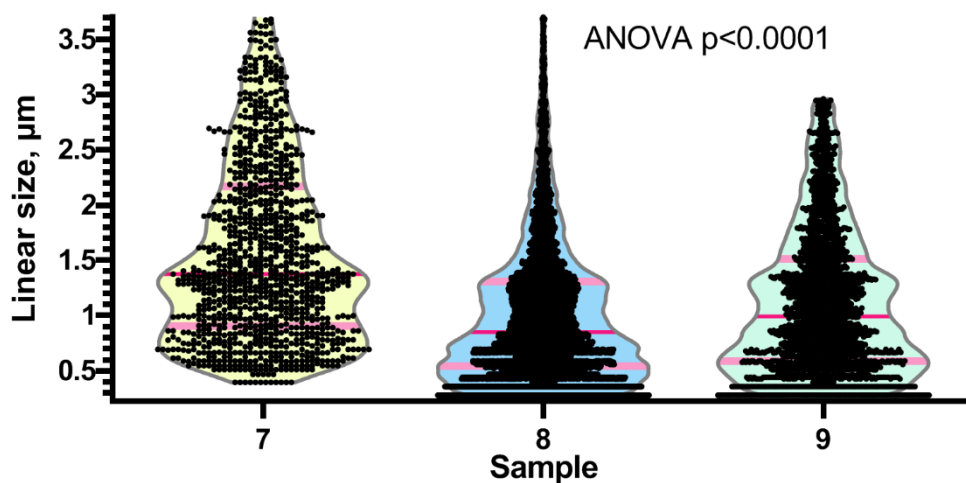


Рис.4.2. Мікрофотографії зразків емульсії № 7-9 та розмірний розподіл їх часточок

Використання комплексного емульгатора (гліцерину моностеарат: біокомплекс PS 70:30) в усіх досліджуваних концентраціях забезпечувало утворення стабільних емульсій (склади № 7-9), проте використання 10 % емульгатора сприяє надмірному загущенню емульсії (склад № 9). Оптимальною концентрацією даного комплексного емульгатора є 7% (склад № 8). Середній

розмір часточок в емульсіях становив $1,665 \pm 1,032$ мкм (середнє значення \pm стандартне відхилення) для зразка № 7 з медіаною розмірів 1,37 мкм, $n = 1123$, для зразка № 8 середній розмір частинок становив $1,024 \pm 0,670$ мкм з медіаною розмірного розподілу при 0,85 мкм, $n = 6869$, та для зразка № 9 середній розмір частинок становив $1,123 \pm 0,653$ мкм з медіаною розмірного розподілу при 0,992 мкм, $n=2154$. Зразки № 7-9 достовірно розрізнялись за розмірним розподілом часточок в емульсіях (рис.4.2), визначених методом ANOVA, $p < 0.0001$).

Таким чином поєднання емульгаторів другого роду з біокомплексом PS у співвідношенні 70: 30 дозволяє одержувати стабільні емульсії при використанні порівняно невисокої сумарної кількості емульгатора, 7-10%.

4.2 Моделювання складу емульсійних лікарських та косметичних засобів, стабілізованих біокомплексом PS

Вибір найбільш раціонального емульгатора є складним завданням, особливо у зв'язку з швидким зростанням кількості емульгаторів. При виборі емульгатора розробники лікарських та косметичних засобів, в першу чергу, звертають увагу на те, стійкість якого типу емульсії він забезпечує, а також, яка найменша кількість емульгатора дозволяє отримати стабільну емульсію. При використанні одного типу емульгатора стабілізація емульсій відбувається при високих концентраціях ПАР (понад 30-50%), що технологічно не раціонально та може викликати побічні ефекти, зокрема алергічні реакції, та змінювати проникність мембран клітин шкіри [101]. Високий стабілізаційний ефект спостерігається при використанні двох типів ПАР – гідрофільних і гідрофобних, що відповідно зменшує сумарний ГЛБ суміші емульгаторів і підвищує в'язкість системи при досить невисокому вмісті суміші ПАР (до 10%) [74, 92].

При виборі емульгаторів для стабілізації емульсійних систем необхідно враховувати не лише ГЛБ емульгаторів, але механізм їх стабілізаційної дії, токсичність, величину рН, хімічну сумісність з іншими компонентами емульсії тощо. Бажано, щоб емульгатор був без запаху і забарвлення. Його фінансова

вартість і доступність також відіграють важливу роль. Врахування всіх цих чинників може призвести до того, що ще на початковому етапі фармацевтичної розробки доведеться відмовитись від розгляду деяких потенційних емульгаторів [161].

Для зменшення кількості технологічних експериментів, тобто реалізації можливості теоретичного обґрунтування якісного та кількісного вибору емульгатора чи суміші емульгаторів, розроблено та використано метод комп'ютерного моделювання складу емульсій у програмі MO Excel, який базується на застосуванні системи гідрофільно-ліпофільного балансу. Дослідження проведені на кафедрі організації і економіки фармації, технології ліків та фармакоеконіміки ФПДО у співраці з к.фарм.наук, доц. Рев'яцьким І.Ю.

Величина ГЛБ характеризує не лише ПАР, але і «необхідне» значення ГЛБ для емульгування олійної фази, залежно від типу емульсії (м/в або в/м) [186]. Знаючи величини ГЛБ, необхідні для емульгування окремих олійних компонентів емульсії, можна розрахувати загальне значення ГЛБ жирової системи за наступною формулою:

$$HLB = \sum_{i=1}^n \left(HLB_i \cdot \frac{X_i}{100} \right)$$

де HLB – гідрофільно-ліпофільний баланс суміші олійних компонентів;

X_i – відсотковий вміст конкретного компонента у олійній фазі;

HLB_i – гідрофільно-ліпофільний баланс конкретного компонента;

n – кількість компонентів.

В результаті таких розрахунків, величина ГЛБ буде показувати, що для емульгування жирової системи необхідний емульгатор з такою ж самою величиною ГЛБ [65, 167]. Однак це не означає, що кожен емульгатор або суміш емульгаторів з відповідним ГЛБ буде оптимальним, оскільки можлива хімічна несумісність з компонентами емульсії або інші причини неприйнятності даного

емульгатора. Проте, можна бути впевненим, що виконуючи експериментальні дослідження, отримаємо більше оптимальних результатів швидко, якщо будемо експериментувати в області необхідного ГЛБ ± 1 . Необхідно було б витратили більше часу, щоб спробувати інші суміші емульгаторів, підбираючи їх випадково [71].

Також слід враховувати, що величини ГЛБ, необхідні для емульгування окремих олійних компонентів емульсії у різних джерелах літератури можуть дещо відрізнятись, залежно від умов випробування [167].

З допомогою розрахунків можна підібрати кілька пар сумішей емульгаторів різних хімічних груп, кожна з яких утворить бажаний ГЛБ. Суміші будь-яких двох (або трьох або більше) ПАР можуть досліджуватись, за винятком змішування аніонних і катіонних ПАР. Експериментальні дослідження у такому випадку будуть зводитись до того, щоб протестувати однакову кількість кожної суміші емульгаторів та вибрати найкращу, наприклад з меншою вартістю, або ту, яка краще загущує емульсію тощо [177].

Процеси моделювання напівавтоматизованого вибору складу емульсії доцільно застосовувати на перших етапах їх фармацевтичної розробки.

У процесах моделювання складу емульсійних засобів для стабілізації досліджуваних емульсій нами використано біокомплекс PS.

Враховуючи, що доступні джерела літератури не містять точної інформації про ГЛБ біокомплексу PS, нами проводились дослідження його розчинності у воді з метою встановлення даного показника, а також теоретичні розрахунки ГЛБ біокомплексу PS, виходячи з відомих значень ГЛБ рамноліпідів.

Дослідження, які базуються на розчинності у воді, дають можливість приблизно визначити ГЛБ, однак в багатьох випадках цього достатньо для скринінгової роботи. У таблиці 4.2 показано зв'язок між здатністю до розчинення (диспергування) ПАР у воді і значенням ГЛБ [177, 167].

Таблиця 4.2

Значення ГЛБ залежно від розчинності у воді

Розчинність у воді	ГЛБ
Не диспергується	0-3
Диспергується погано	3-6
Стабільна дисперсія при сильному перемішуванні	6-8
Каламутна дисперсія	9-13
Напів- або прозорий розчин	Більше 13

В результаті вивчення розчинності встановлено, що біокомплекс PS при диспергуванні у воді спочатку утворює напівпрозорий розчин, а при збільшенні концентрації – каламутну дисперсію, тому можна вважати, що його ГЛБ є близьким до 13.

Враховуючи, що моно- і дирамноліпіди входять до складу біокомплексу PS у співвідношенні 90:10 [64], а ГЛБ монорамноліпіду і дирамноліпіду, розраховані на основі їх хімічної структури, становлять 13 та 21 відповідно [64], то ГЛБ біокомплексу PS розраховали також наступним чином:

$$\text{ГЛБ біокомплексу PS} = (90 \times 13 + 10 \times 21) / 100 = 13,8$$

Таким чином, за показником ГЛБ біокомплекс PS є подібним до полісорбатів (ГЛБ полісорбату 80 становить 15), що вказує на здатність біокомплексу PS утворювати стабільні емульсії типу м/в, тобто використовуватись у якості емульгатора та співемульгатора.

Нами розроблена в програмі MO Excel напівавтоматизована система моделювання складу емульсій типу м/в з біокомплексом PS як самостійним емульгатором або співемульгатором.

З урахуванням загально відомих підходів до застосування емульгаторів в

максимальній кількості до 10% в складі емульсійних засобів, при моделюванні складу емульсій ми вважали прийнятними для подальших досліджень ті склади емульсій, у яких можна використовувати біокомплекс PS у даній максимальній концентрації як самостійний емульгатор, а також у складі комплексного емульгатора з сумарним вмістом до 10%.

При здійсненні будь-якого моделювання мають бути закладені стартові параметри, тому при побудові напівавтоматизованої моделі вибору компонентів олійної фази та емульгаторів стабільної емульсії типу м/в нами використовувались наступні стартові параметри, які вводить користувач:

1. Вихідна кількість готового засобу (г).
2. Кількість емульгаторів, що буде використана (1 або 2).
3. Бажана кількість компонентів олійної фази (шт).
4. Бажаний вміст олійної фази (%).
5. Бажаний вміст емульгатора або суміші емульгаторів (%).

Введення бажаних величин зовсім не означає, що на виході будуть отримані саме такі параметри. Вони вводяться з метою забезпечення здійснення в моделі автоматизованих розрахунків для пропонування користувачеві можливих варіантів якісного та кількісного вибору компонентів олійної фази та емульгаторів.

Також в модель для апробації були закладені перелік компонентів олійної фази та емульгаторів, наведені у табл. 4.3 [177].

Алгоритм моделювання складу емульсій наведено на рис. 4.3

Після завершення моделювання розробник експериментально встановлює оптимальну концентрацію біокомплексу PS як самостійного емульгатора або концентрацію комплексного емульгатора, виготовляючи декілька складів емульсії з різною концентрацією біокомплексу PS або комплексного емульгатора у певному співвідношенні, розрахованому програмою, між біокомплексом PS та емульгатором II роду (наприклад, у співвідношенні 40 : 60 з сумарною концентрацією комплексного емульгатора 2, 4, 6, 8, 10%).

Таблиця 4.3

Компоненти олійної фази та емульгатори

Компоненти олійної фази	ГЛБ при якому відбувається емульгування	Емульгатори	ГЛБ
Спирт стеариловий	15.0	Полісорбат 20	16.7
Спирт цетиловий	15.0	Полісорбат 80	15.0
Олія вазелінова	10.0	Полісорбат 60	14.9
Парафін	10.0	Біокомплекс PS	13.8
Віск бджолиний	9.0	Сорбітан монолаурат (Спен-20)	9.0
Ланолін безводний	9.0	Диетиленгліколь монолаурат	6.0
Олія виноградних кісточок	7.0	Сорбітан моностеарат	4.7
Олія оливкова	7.0	Сорбітан моноолеат (Спен-80)	4.0
Масло какао	6.0	Гліцерол моностеарат	3.8
Жир норковий	5.0	Сорбітан тристеарат (Спен-65)	2.0

Для апробації системи моделювання ми поставили два завдання. В обидвох завданнях вихідна кількість готового засобу становитиме 100 г.

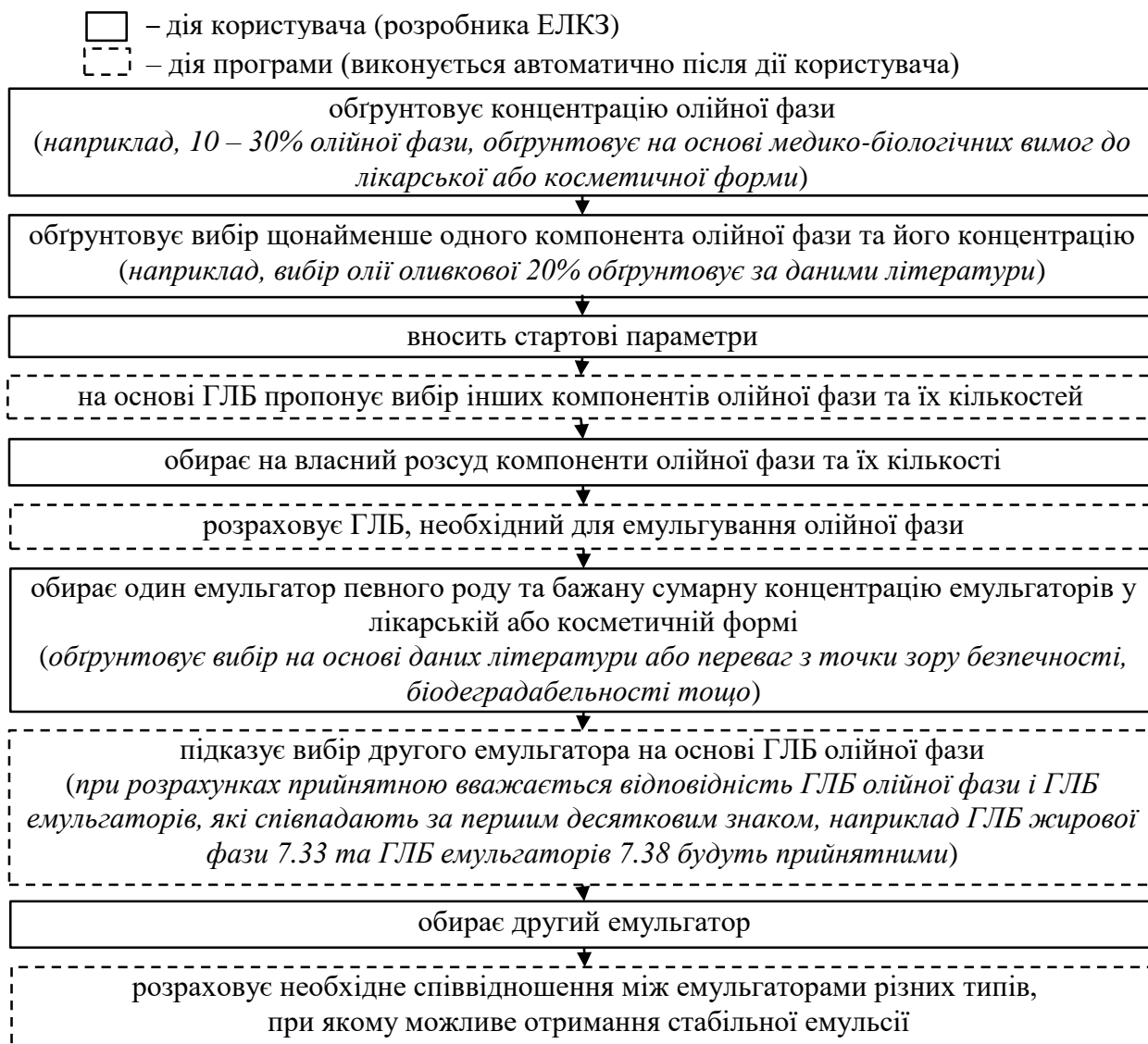


Рис. 4.3. Алгоритм моделювання складу емульсії

4.2.1 Моделювання складу емульсії стабілізованих біокомплексом PS у складі комплексного емульгатора

Завдання 1: підібрати оптимальний кількісний склад компонентів для наступного пропису:

Олійна фаза 30% (олія виноградних кісточок, парафін)

Комплексний емульгатор (гліцеролу моностеарат : біокомплекс PS);

Вода до 100,0

У даному прописі концентрація жодного компонента олійної фази не відома. Відзначивши олію виноградних кісточок та парафін у моделі, розробник отримує графік залежності величини ГЛБ, необхідного для емульгування олійної фази,

від двох компонентів (рис. 4.4). Така залежність має лінійний характер. Представлення інформації такого типу в моделі було реалізоване з допомогою комбінованої діаграми із використанням допоміжної осі та рядів у вигляді ліній і гістограм (основна вісь - величина ГЛБ, допоміжна вісь - концентрація компонентів,%).

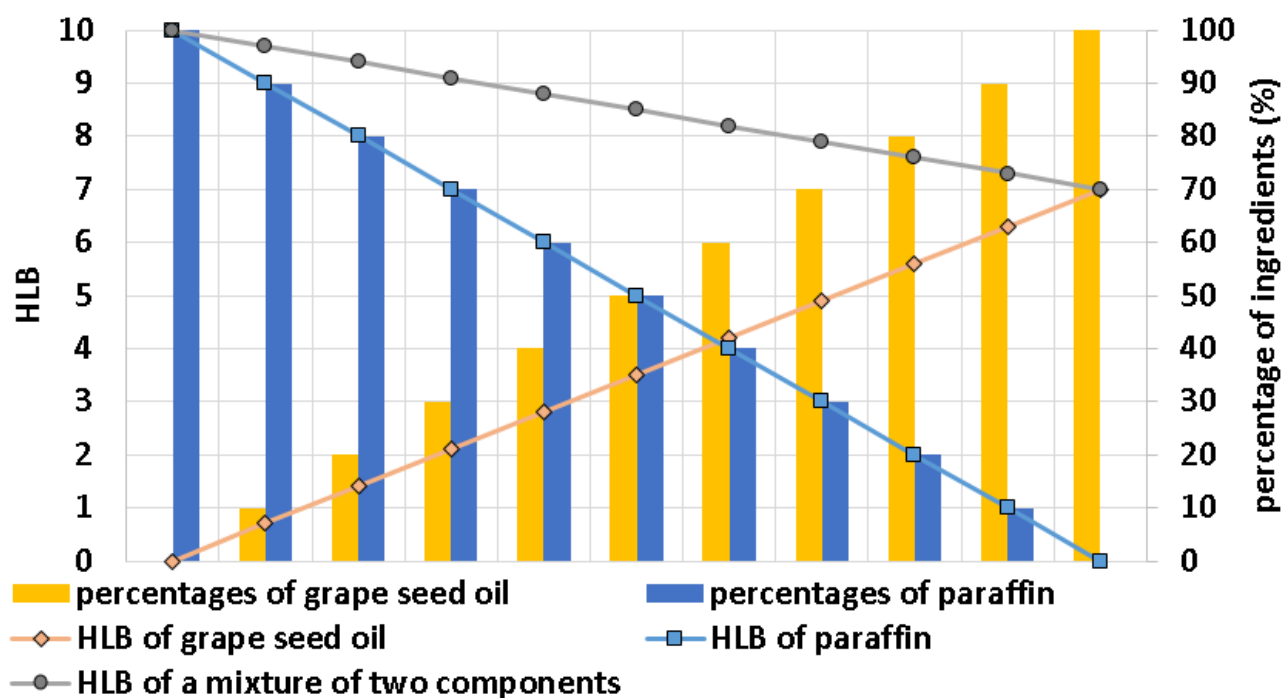


Рис. 4.4. Лінійна залежність величини необхідного ГЛБ від двох компонентів (олія виноградних кісточок, парафін)

Обравши із відображених варіантів найбільш оптимальний за співвідношенням компонентів та величиною ГЛБ варіант, розробник зазначає у моделі обрані кількості.

Наприклад, розробник вирішив обрати варіант із наступним кількісним складом компонентів олійної фази: олії виноградних кісточок 25 г та парафіну 5 г, що становитиме 83.3% та 16.7 % олійної фази відповідно. ГЛБ, необхідне для емульгування даної олійної фази, становитиме 7.5 (рис.4.5).

control totals								
30	30	100						
amount of the component			oil phase ingredients		7.50	predicting		7.50
the actual (g)	of the total (%)	in oil phase (%)	name	HLB	HLB f	in oil phase (%)	value of HLB	HLB p
0	0	0	Stearyl alcohol	15	0.00	0	0	0
0	0	0	Cetyl alcohol	15	0.00	0	0	0
0	0	0	Vaseline oil	10	0.00	0	0	0
5	5.0	16.7	Paraffin	10	1.67	16.7	1.67	1.67
0	0	0	Beeswax	9	0.00	0	0	0
0	0	0	Lanolin anhydrous	9	0.00	0	0	0
25	25.0	83.3	Grape seed oil	7	5.83	83.3	5.83	5.83
0	0	0	Olive oil	7	0.00	0	0	0
0	0	0	Cocoa butter	6	0.00	0	0	0
0	0	0	Mink fat	5	0.00	0	0	0

HLB f – actual HLB of mixture of selected components
HLB p – predicted HLB of mixture components

Рис.4.5. Розрахунок ГЛБ, необхідного для емульгування олійної фази

У даному завданні вибір емульгаторів у моделі не використовується, емульгатори визначені прописом, необхідним є лише розрахунок співвідношення між емульгаторами. Концентрація олійної фази і її склад мають вирішальне значення для вибору співвідношення між емульгаторами I і II роду. При автоматизованих розрахунках отримано частки емульгаторів гліцеролу моностеарату і біокомплексу PS: 63 : 37 (рис. 4.6).

biocomplex PS	13.8		3.70	37.01
	HLB	7.50		%
glycerol monostearate	3.8		6.30	62.99
			10.00	100.00

Рис. 4.6 Розрахунок співвідношення між емульгаторами двох типів

Таким чином, при використанні методу моделювання у даному завданні розробникові необхідно буде експериментально підтверджувати лише вибір оптимальної концентрації комплексного емульгатора гліцеролу моностеарату і біокомплексу PS (63 : 37).

4.2.2 Моделювання складу емульсій стабілізованих біокомплексом PS

Завдання 2: Підібрати оптимальний кількісний склад компонентів олійної фази для наступного пропису:

Олійна фаза 30% (олія виноградних кісточок, парафін, спирт цетиловий)

Емульгатор: біокомплекс PS

Вода до 100,0

У даному прописі в якості емульгатора використовується лише біокомплекс PS (ГЛБ 13.8) і частка жодного компонента олійної фази не відома. Величини ГЛБ, необхідні для емульгування компонентів олійної фази, є наступні: олія виноградних кісточок – 7, парафін – 10, спирт цетиловий – 15.

Для розрахунків оптимальної концентрації речовин у трьохкомпонентній олійній фазі ми використали графік, що показує зв'язок між трьома змінними (Ternary Plot) (рис. 4.7). Врахувавши, що кожен з трьох компонентів є наявним у олійній фазі, та взявши за основу інтервал концентрації в один відсоток, загальна кількість допустимих комбінацій складала 4754 (діапазон співвідношення компонентів від 1:1:98 до 98:1:1).

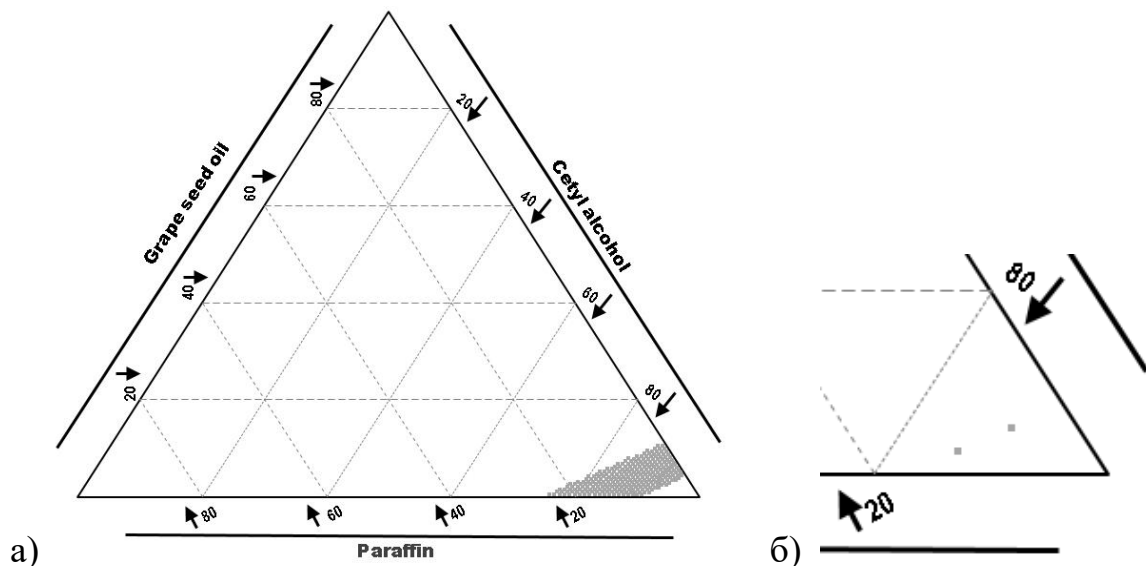


Рис. 4.7. Взаємозв'язок між концентраціями трьох компонентів при одержанні значення ГЛБ олійної фази: а) в діапазоні від 13.3 до 14.3 (13.8 ± 1); б) в точній величині 13.8

Крім графічного представлення результатів (рис. 5) розроблена нами модель, видає і числові результати – графік будується саме на їх значеннях. В моделі реалізована можливість відбору значень результатів на основі заданих користувачем критеріїв. Так, відібравши результати у відповідності до поставленого завдання для точного значення ГЛБ 13.8 (що відповідає ГЛБ біокомплексу PS) (рис. 5 б), отримаємо наступні автоматизовано розраховані результати співвідношення компонентів:

олія оливкова : парафін : спирт цетиловий – 10 : 8 : 82 або 5 : 16 : 79

Загальна кількість олійної фази становить 30 г. Тоді, у відповідності до поставленого завдання, масова частка кожного з компонентів буде становити:

олія оливкова : парафін : спирт цетиловий – 3.0 : 2.4 : 24.6 або 1.5 : 4.8 : 23.7.

Таким чином, при використанні методу моделювання у завданні 2, розробнику необхідно лише обрати один із запропонованих моделлю варіантів олійної фази.

Отже, для зменшення кількості технологічних експериментів на етапі фармацевтичної розробки емульсійних лікарських або косметичних засобів стабілізованих біокомплексом PS є доцільним використання методу комп'ютерного моделювання складу емульсій у програмі MO Excel, який базується на застосуванні системи ГЛБ. Такий підхід забезпечить аргументований вибір складу олійної фази емульсії при використанні біокомплексу PS як самостійного емульгатора або вибір співвідношення між біокомплексом PS та емульгатором II роду при використанні комплексного емульгатора та дозволить раціонально провести експериментальні дослідження.

Висновки до розділу 4:

1. Створення стабільних емульсій м/в вимагає застосування високих концентрацій біокомплексу PS як самостійного емульгатора, більше 10%, що є недоцільним та економічно необґрунтованим.
2. Поєднання емульгаторів другого роду з біокомплексом PS у співвідношенні 70: 30 дозволяє одержувати стабільні емульсії при

використанні порівняно невисокої кількості комплексного емульгатора, 7-10%.

3. Для раціонального проведення експериментальних досліджень на етапі розробки емульсійних лікарських або косметичних засобів, стабілізованих біокомплексом PS є доцільним використання методу комп'ютерного моделювання складу емульсій у програмі MO Excel, який базується на застосуванні системи ГЛБ.
4. Комп'ютерне моделювання дає можливість обґрунтувати склад олійної фази емульсії при використанні біокомплексу PS як самостійного емульгатора або встановити співвідношення між біокомплексом PS та емульгатором II роду при використанні комплексного емульгатора.

Результати даних досліджень наведено у публікаціях:

1. Study of emulsion products stabilized with surfactants based on rhamnolipids Pseudomonas sp. PS-17 / Pelekh-Bondaruk I.R., Vildanova R.I., Kobylinska L.I., Bila Y.Y., Bilous S.B. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2022. № 14(2). P.315-318. DOI: <https://doi.org/10.22159/ijap.2022v14i2.43715>. (Особистий внесок: участь у плануванні експерименту та проведенні дослідження, узагальнення результатів, підготовка статті до друку).
2. Revyatskyu I.Y., Pelekh-Bondaruk I.R., Bilous S.B. Modeling of the process of emulsifiers selecting in emulsion medicines and cosmetics. *PharmacologyOnLine*. 2021. Vol.3. P.139-150. ISSN: 1827-8620. URL: <https://pharmacologyonline.silae.it>. (Особистий внесок: участь і плануванні та проведенні дослідження, узагальнення результатів, підготовка статті до друку).
3. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Дослідження емульгуючих властивостей біокомплексу PS у дерматологічних засобах. “Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів”: зб. матеріалів VII наук.-практ. інтернет-конференції з міжнародною

участю, Тернопіль, 2018, с.117. (*Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез*).

4. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Біокомплекс PS як перспективний емульгатор у складі лікарських та косметичних засобів. “Інновації в медицині”: зб. матеріалів 88-ої наук.-практ. конференції студентів та молодих вчених із міжнародною участю, Івано_Франківськ, 2019, с.106. (*Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез*).
5. Pelekh I.R., Bilous S.B. Study of auxiliary substance of microbial origin in dermatology products. “*Medicine under the modern conditions of integration development of European countries*”: international scientific conference, Lublin, Republic of Poland, 2019, p.267. (*Особистий внесок: проведення дослідження, написання тез*).
6. Пелех-Бондарук І.Р., Білоус С.Б. Дослідження стійкості емульсій, стабілізованих біокомплексом PS. “*Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи*”: зб. матеріалів наук.-практ. конференції з міжнародною участю присвячена 100-річчю Національного фармацевтичного університету, Харків, 2021, с.99-100. (*Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез*).

РОЗДІЛ V

РОЗРОБКА АЛГОРИТМУ ДОСЛІДЖЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ ЕМУЛЬСІЙНИХ ЗАСОБІВ ТА ТОКСИКОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОКОМПЛЕКСУ PS

5.1 Розробка алгоритму дослідження стабільності м'яких лікарських та косметичних засобів з біокомплексом PS

Важливим показником якості лікарського або косметичного засобу є стабільність, яка забезпечує збереження терапевтичних або косметичних властивостей протягом терміну зберігання. Дослідження стабільності та встановлення терміну придатності - одна з важливих проблем, яку вирішують на етапі розробки засобу [75, 50]. Стабільність контролюється за органолептичними і фізико-хімічними показниками, мікробіологічною чистотою, специфічною фармакологічною активністю та ін.

Роль допоміжних речовин у забезпеченні стабільності є визначальною. Особливої уваги заслуговують емульгатори та консерванти, від яких залежить стабільність засобу як дисперсної системи та його мікробіологічна чистота [166].

Підхід до проблеми встановлення термінів придатності та методів визначення стабільності в історичному аспекті суттєво змінився. Раніше дані дослідження були таємницею виробників фармацевтичної продукції, оскільки вважались "секретом виробництва". Ситуація змінилася в 70-х роках минулого століття, коли стало обов'язковим позначення термінів придатності на упаковках ЛЗ, дана вимога була введена до правил Належної виробничої практики [60].

Настанова з якості 42-3.3:2004 «Лікарські засоби. Випробування стабільності» є методичною основою дослідження стабільності лікарських засобів та визначення умов зберігання [51].

Настанова 42-3.3:2004 «Лікарські засоби. Випробування стабільності» подає загальні рекомендації щодо дослідження стабільності лікарських засобів залежно від виду діючої речовини та стосується всіх лікарських форм [51]. При

дослідженні стабільності лікарського засобу залежно від виду лікарської форми є свої особливості, які зумовлені вимогами фармакопеї та настанов з фармацевтичної розробки до різних лікарських форм [101]. Щодо косметичних засобів, то нормативні документи також рекомендують досліджувати їх стабільність залежно від форми випуску. Тому дослідження стабільності конкретного лікарського або косметичного засобу вимагає узагальнення вимог і розробки алгоритму проведення досліджень [166].

Дослідження стабільності передбачає одержання даних про зміну якості лікарського засобу з часом під впливом різних чинників навколишнього середовища, таких як температура, вологість і світло, а також встановлення рекомендованих умов та терміну зберігання [51].

Стабільність готових лікарських препаратів залежить як від властивостей субстанцій, так і від умов зберігання готового препарату. Для уніфікації вимог щодо дослідження стабільності лікарських засобів у різних країнах Настанова 42-3.3:2004 «Лікарські засоби. Випробування стабільності» рекомендує проводити дослідження стабільності з урахуванням кліматичної зони, залежно від середньої кінетичної температури та відносної вологості. Даній температурі повинна відповідати температура, яка використовується при проведенні довгострокових випробувань [51].

Відповідно до Настанови 42-3.3:2004 «Настанови з якості. Лікарські засоби. Випробування стабільності» для проведення досліджень стабільності використовуються три основних методи: стрес-випробування, прискорені випробування стабільності та дослідження в реальному часі (або довгострокові випробування) (рис.5.1) [51].

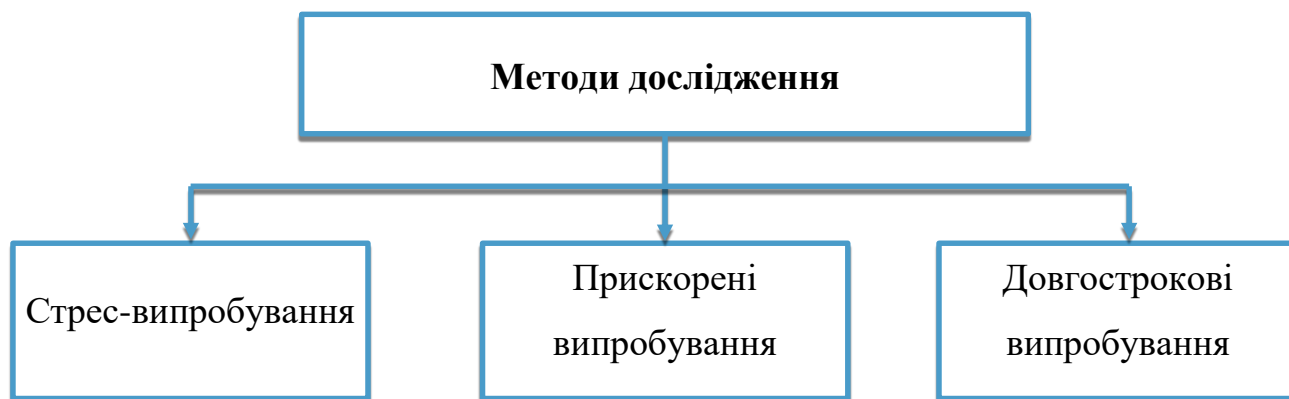


Рис. 5.1 Методи дослідження стабільності

Стрес-випробування проводяться для нових субстанцій з метою вибору найбільш стабільної форми ЛЗ, визначення продуктів їх розпаду, вибору реакцій їх ідентифікації та кількісного визначення. В подальшому дані дослідження можуть бути використані для оптимізації процесу виробництва препарату, а також вибору упаковки ЛЗ. При проведенні даних досліджень використовується температура 50, 60, рідше 70°C та підвищена вологість (75 % або вище). Стрес-випробування проводяться на одній серії субстанції [51].

Прискорені випробування стабільності використовують при аналізі нових лікарських форм. Метод дає можливість вибрати оптимальний пропис ЛЗ, технологічні прийоми його виробництва та обрати вид упаковки. Для даних випробувань застосовується температура на 15 °C вища від температури, яка буде використовуватись в подальшому для зберігання готового препарату та підвищена вологість в порівнянні з нормальними умовами зберігання [51].

Якщо в умовах прискорених досліджень протягом 6 місяців зберігання спостерігаються «значні зміни», то рекомендується провести додаткові дослідження при проміжних умовах зберігання і оцінити результати у порівнянні з критеріями «значних змін».

Основним методом встановлення та підтвердження термінів придатності є довгострокові випробування. Вони проводяться на трьох серіях продукції з врахуванням абсолютно всіх нюансів виробництва при температурі та вологості,

які відповідають умовам зберігання препарату при його використанні в практиці. Тривалість даних досліджень відповідає як мінімум повному терміну зберігання ЛЗ [51].

Частота проведення випробувань має бути достатньою для встановлення параметрів стабільності лікарського засобу. Якщо запропонований термін зберігання лікарського засобу становить 12 місяців і більше, випробування при довгострокових дослідженнях, як правило, слід проводити кожні 3 місяці протягом першого року, кожні 6 місяців протягом другого року і потім щорічно протягом запропонованого терміну зберігання.

Оскільки настанова 42-3.3:2004 «Лікарські засоби. Випробування стабільності» стосується всіх лікарських форм, є складно користуватись цим нормативним документом при дослідженні стабільності конкретного лікарського засобу [51]. Нами узагальнено інформацію щодо м'яких лікарських засобів та запропоновано методичний підхід до визначення стабільності лікарських засобів у формі емульсійних мазей, кремів та гелів у вигляді алгоритму дослідження, який буде доцільно застосувати в процесі дослідження біокомплексу Ps як нового допоміжного компонента.

Розробка алгоритму дослідження включала вибір досліджуваних характеристик, умов та частоти випробування даних лікарських і косметичних засобів. Розроблений алгоритм дослідження у вигляді схеми наведено на рис. 5.2 [166].

Застосування алгоритму дослідження стабільності дозволить значно спростити та пришвидшити експериментальні дослідження у процесі розробки засобів у формі емульсійних мазей, гелів та кремів з біокомплексом Ps.

Щодо аналітичних методів дослідження рамноліпідів, то на даний час у науковій літературі описано багато як фізико-хімічних, так і біологічних методів виявлення і кількісного визначення рамноліпідів - за допомогою тонкошарової хроматографії, спектрофотометрії, високоефективної рідинної хроматографії у поєднанні з мас-спектрометрією, гемо-лізису еритроцитів рамноліпідами та інгібування *B. subtilis*, що здійснюється рамноліпідами [166].

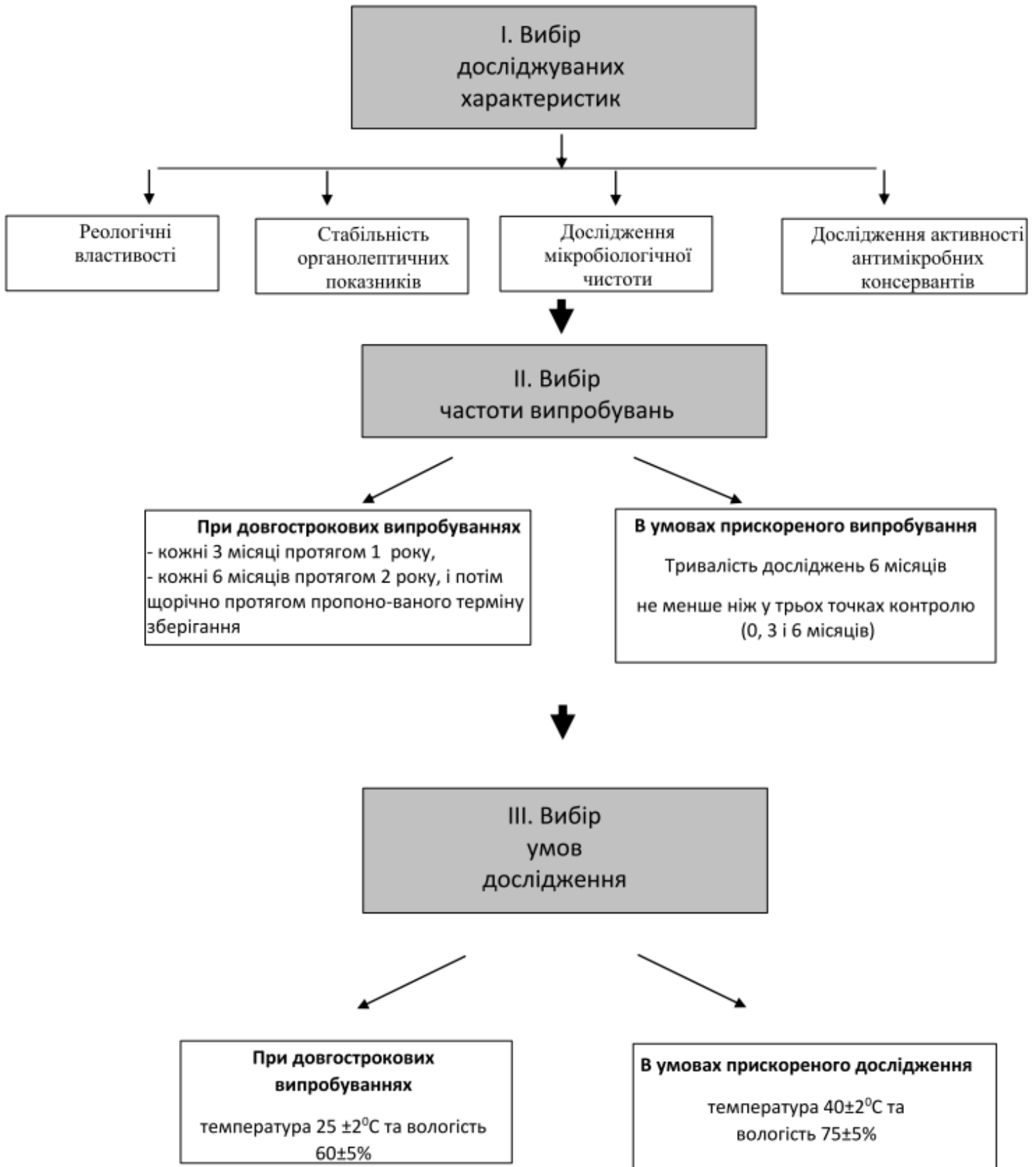


Рис.5.2. Алгоритм проведення досліджень стабільності емульсійних засобів з біокомплексом PS

Кількісно рамноліпіди можна також визначити колориметричними методами, і цей підхід має переваги надійності, простоти, низької вартості та доброї відтворюваності з дуже низькими технологічними вимогами [139, 179]]. Проте для ідентифікації та кількісного визначення рамноліпідів у емульсійних засобах, стабілізованих біокомплексом PS, доцільно використовувати методи, які застосовані розробниками біопрепарату для його стандартизації. Тобто для ідентифікації рамноліпідів - метод тонкошарової хроматографії на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 ("Merck") у системах розчинників: а) для полярних ліпідів: хлороформ-метанол-ацетон-оцтова кислота (90:10:6:1); б) для неполярних ліпідів: гексан-діетиловий ефір-оцтова кислота (90:10:1). Для візуалізації пластинок - специфічний реагент (5%- спиртовий розчин фосфорномолібденової кислоти, орциновий реагент для рамноліпідів). Для кількісного визначення рамноліпідів - спектрофотометричний метод при довжині хвилі 421 нм.

5.2 Токсикологічні дослідження біокомплексу PS

Для встановлення алергенних властивостей біокомплексу PS дослідження проводили на базі ЦНДЛ та лабораторії промислової токсикології ЛНМУ імені Данила Галицького під керівництвом ст.н.сп., к.мед.н. Грушки О.І.

Під час проведення досліджень на тваринах дотримувались принципів біоетики, законодавчих норм та вимог згідно з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей" [55, 83, 136].

5.2.1 Дослідження алергенних властивостей біокомплексу PS

Алергенну дію біокомплексу PS визначали методом внутрішньошкірної сенсibilізації морських свинок.

В експерименті використовували мурчаків світлої масті масою 280-350 г, які утримувались в умовах віварію Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького при температурі 19,6-21,5⁰С в умовах

природного світлового циклу на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до води та їжі. Тварин розділили на 2 групи (1 дослідна, 1 контрольна), які включали по 10 особин [82]. Сенсibilізацію проводили за методом О.Г. Алексєєвої, А.І. Петкевич шляхом внутрішньошкірного введення 200 мкг біопрепарату, розведеного в 0,02 мл ізотонічного розчину натрію хлориду у співвідношенні 1:10, в шкіру зовнішньої поверхні вуха тварини [102, 110]. Тваринам контрольної групи вводили по 0,02 мл розчинника. Через 10 діб додатково наносили 20 аплікацій біопрепарату на попередньо депільовану ділянку бокової поверхні тулуба. Ступінь сенсibilізації встановлювали після постановки внутрішньошкірних проб в розведеннях: 1:10, 1:100, 1:200. Вираженість алергічної дії препарату встановлювали у порівнянні з контролем, за інтенсивністю місцевої гіперемії, набряку, наявності ерозій та некрозу тканин. Реакцію організму оцінювали шляхом візуального огляду поверхні шкіри (діаметр еритеми, інфільтрат чи набряк в місці інокуляції або генералізований) на місці введення проб через 20-30 хв, 4-5 год та 24 год після введення та за результатами клінічних і алергічних тестів.

Визначали зміни показників периферійної крові (лейкоцити та лейкоцитарну формулу) [20]. На основі лейкоцитарної формули проводили обчислення співвідношення окремих популяцій лейкоцитів, які можуть бути використані в якості загальної характеристики клітинних реакцій неспецифічного і специфічного захисту організму. Враховували гематологічні індекси: індекс співвідношення лімфоцитів та моноцитів (ІСЛМ), що вказує на наявність взаємодії ефекторної та афекторної ланок імунної відповіді; індекс співвідношення нейтрофілів та моноцитів (ІСНМ), індекс співвідношення нейтрофілів та еозинофілів (ІСНЕ), що характеризують роль кожного компонента мікрофагальної та макрофагальної системи захисту організму [110]. Проводили алерготести: реакція специфічного лізису лейкоцитів (РСЛЛ) та реакція специфічної агломерації лейкоцитів крові (РСАЛ). Реакція специфічного лізису лейкоцитів базується на зміні сенсibilізованих клітин при дії специфічного алергену і зв'язана з включенням комплекменту в реалізацію

формування імунного комплексу на поверхні клітин, який призводить до їх пошкодження і лізису. Реакція специфічної агломерації лейкоцитів крові базується на ефекті посилення склеювання клітин крові при додаванні до неї специфічного алергену, що є однією з перших фаз специфічної алергенної реакції клітин крові [110].

Гуморальний імунітет вивчали за вмістом імуноглобулінів А, М і G (IgA, IgM, IgG та загального E (IgE) і циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) [45]. Імуноглобуліни IgA, IgM, IgG та IgE в сироватці крові визначали методом імуноферментного аналізу за інструкціями тест-систем IgA-ІФА, IgM-ІФА, IgG-ІФА та IgE-ІФА виробництва ТОВ «Лабораторія Гранум», використовуючи імуноферментний аналізатор „STAT FAX PLUS– 303”.

Отримані дані виражали у відсотках і в абсолютних одиницях у перерахунку на 1 літр крові (10^9 /л), (г/л). Достовірність отриманих змін оцінювали з використанням t-критерію Стьюдента [168].

При проведенні біопрепаратом шкірних аплікацій та після внутрішньошкірних проб в дозах 1:10, 1:100 і 1:200 (розчинник - фізрозчин) змін на шкірі мурчаків не виявлено змін.

У сенсibilізованих біокомплексом PS тварин вміст лейкоцитів ($13,26 \pm 1,33$ г/л) збільшився на 5,9 % у порівнянні з контролем ($12,52 \pm 1,59$ г/л). Значення відсоткового вмісту і абсолютної кількості гранулоцитів (нейтрофілів, еозинофілів і базофілів) достовірно не змінювалися у порівнянні з контрольною групою. Результати досліджень подані в таблиці 5.1 [168].

Індекси співвідношення лімфоцитів до моноцитів (ІСЛМ) та співвідношення нейтрофілів до моноцитів (ІСНМ) достовірно не змінилися в обох групах. ІСЛМ зменшився на 8,5 % у сенсibilізованих тварин порівняно з контролем за рахунок збільшення кількості лімфоцитів на 2,7 % та збільшення моноцитів на 16,0 %. ІСНМ зменшився на 3,3 % у тварин дослідної групи порівняно з контрольною за рахунок збільшення нейтрофілів на 12,5 % та моноцитів на 16,0 %. Індекс співвідношення нейтрофілів до еозинофілів (ІСНЕ)

знизився на 9,5 % за рахунок збільшення нейтрофілів на 12,5 % та збільшення кількості еозинофілів на 33,3 % у сенсibilізованих тварин (табл. 5.2) [168].

Таблиця 5.1

**Показники периферичної крові білих мурчаків
після сенсibilізації**

Показники	Кількість тварин	Контрольні тварини	Сенсibilізовані тварини	t
Лейкоцити, Г/л	20	12,52±1,59	13,26±1,33	0,60
Базофіли, %	20	0,20±0,133	0,20±0,117	0
Базофіли, Г/л	20	0,026±0,053	0,029±0,032	0,10
Еозинофіли, %	20	1,70±0,675	2,10±0,87	0,36
Еозинофіли, Г/л	20	0,211±0,081	0,281±0,12	0,48
Нейтрофіли, %	20	21,4±5,60	23,20±7,04	0,20
Нейтрофіли, Г/л	20	2,72±1,04	3,06±0,90	0,25
Моноцити, %	20	3,00±0,94	3,30±1,16	0,20
Моноцити, Г/л	20	0,375±0,126	0,435±0,146	0,31
Лімфоцити, %	20	73,70±6,00	71,20±7,00	0,27
Лімфоцити, Г/л	20	9,19±1,09	9,44±1,33	0,15

*t - коефіцієнт Ст'юдента, при $t > 2,1$ достовірні зміни ($p < 0,05$).

Таблиця 5.2

Зміни гематологічних індексів у мурчаків

Назва показників	Значення показників, $M \pm m$		
	Контрольні Тварини	Сенсibilізовані тварини	t
ІСЛМ	26,93±9,10	24,64±10,48	0,17
ІСНМ	7,47±1,78	7,23±2,97	0,12
ІСНЕ	14,91±8,49	13,50±8,50	0,14

*t - коефіцієнт Ст'юдента, при $t > 2,1$ достовірні зміни ($p < 0,05$).

Встановлено, що показники реакції специфічного лізису лейкоцитів (РСЛЛ) та реакції специфічної агломерації лейкоцитів (РСАЛ) вказують на відсутність алергійної реакції клітин крові (табл. 5.3) [168].

Таблиця 5.3

Результати алерготестів in vitro у мурчаків, сенсibilізованих біокомплексом PS ($p \leq 0,05$, t критичне=2,1)

Показники	Контроль	Дослід	t
РСЛЛ, % розведення 1:10	7,60±0,885	8,26±3,09	0,21
РСЛЛ, % розведення 1:100	5,00±0,67	6,55±2,33	0,64
РСЛЛ, розведення 1:200	3,54±0,86	4,69±2,25	0,48
РСАЛ, розведення 1:10	0,984±0,20	1,09±0,14	0,43
РСАЛ, розведення 1:100	0,873±0,24	0,895±0,157	0,17
РСАЛ, розведення 1:200	0,640±0,134	0,675±0,130	0,19

*t - коефіцієнт Ст'юдента, при $t > 2,1$ достовірні зміни ($p < 0,05$).

В гуморальній ланці імунітету сенсibilізованих тварин спостерігалось помірне зростання вмісту циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) на 43,7 % та недостовірне збільшення рівнів імуноглобулінів класу Ig A – на 8,44 % і Ig G – на 8,45 % порівняно з контролем (табл. 5.4) [168].

Під впливом біопрепарату рівні загального імуноглобуліну E помірно зростали у дослідних тварин: Ig E – на 35,27 % (табл.5.5) [168]

Таблиця 5.4

Вміст імуноглобулінів А, М, G

Показники	Кількість тварин	Значення показників, $M \pm m$		
		Контрольні тварини	Сенсибілізовані тварини	t
1	2	3	4	5
ЦІК, ум.од.	20	64,10±18,50	92,10±15,25	1,17
Ig A, г/л	20	1,315±0,118	1,426±0,385	0,28
Ig M, г/л	20	1,173±0,172	1,167±0,273	0,19
Ig G, г/л	20	12,54±1,305	13,605±1,95	0,45

*t - коефіцієнт Ст'юдента, при $t > 2,1$ достовірні зміни ($p < 0,05$).

Таблиця 5.5

Вміст імуноглобуліну E

Показники	Кількість тварин	Значення показників, $M \pm m$		
		Контрольні тварини	Сенсибілізовані тварини	t
1	2	3	4	5
Ig E, МОд/мл	20	15,31±4,45	20,71±7,90	0,62

*t - коефіцієнт Ст'юдента, при $t > 2,1$ достовірні зміни ($p < 0,05$).

Одержані результати дозволяють стверджувати, що біопрепарат під умовною назвою біокомплекс PS при внутрішньошкірній сенсибілізації морських свинок не викликає достовірних змін у периферичній крові тварин та алерготестів РСЛЛ і РСАЛ, що свідчить про відсутність алергізації організму.

5.2.2 Дослідження подразнювальної дії біокомплексу PS

Можливість впливу біопрепарату на слизову оболонку ока визначали шляхом внесення 50 мг нативного біопрепарату в розведенні 1:10 (розчинник – фізрозчин) в кон'юнктивальний мішок правого ока кроля, ліве око - контроль. Впродовж двох тижнів проводили спостереження за станом слизової оболонки і

прозорістю роگیвки. Ступінь пошкодження оцінювали за класифікацією А. Majdai, K. Chrusaielska [110].

Внесення 50 мг біокомплексу PS у розведенні 1:10 в кон'юнктивальний мішок ока кроля викликало слабку подразнюючу дію: серозні виділення – 0 балів, гіперемія – 1 бал, набряк – 0 балів (за класифікацією А. Maydai і К. Chrusaielska). Відновлення офтальмо статусу спостерігалось на 2-гу добу (серозні виділення – 0 балів, гіперемія – 0 балів, набряк – 0 балів) без проведення лікувальних заходів [73].

Одержані результати свідчать, що при нанесенні на слизові оболонки біокомплекс PS чинить слабку подразнювальну дію. Враховуючи, що біокомплекс PS буде використовуватись у складі емульсійних засобів типу м/в як емульгатор або співемульгатор у поєднанні з емульгаторами другого роду з сумарним вмістом емульгаторів від до 10%, можна стверджувати, що біокомплекс PS не буде проявляти подразнюючої дії при нанесенні на шкіру у складі дерматологічних засобів [73].

Висновки до розділу 5:

1. Узагальнено інформацію щодо особливостей дослідження стабільності та встановлення терміну придатності м'яких лікарських та косметичних засобів, визначено перелік необхідних досліджуваних характеристик, умов та частоти випробування та розроблено алгоритм дослідження, який буде доцільно застосувати на етапі розробки емульсійних засобів з біокомплексом PS.
2. Алергенні властивості біокомплексу PS досліджено методом внутрішньошкірної сенсibiliзації морських свинок. Встановлено, що біокомплекс PS не викликає достовірних змін у периферичній крові тварин та алерготестів, що свідчить про відсутність алергізації організму.
3. Подразнювальну дію біокомплексу PS досліджено шляхом внесення біопрепарату в розведенні 1:10 в кон'юнктивальний мішок ока кроля. Встановлено, що при нанесенні на слизові оболонки біокомплекс PS

чинить слабку подразнювальну дію. Відновлення офтальмо статусу спостерігалось на 2-гу добу без проведення лікувальних заходів.

Результати даних досліджень наведено у публікаціях:

1. Pelekh I.R., Bilous S.B. Development of the algorithm of stability study of semi-solid preparations and cosmetics with biocomplex PS. *Danish scientific journal*. 2020. №36(2). С.62-65. ISSN: 3375-2389. (Особистий внесок: пошук інформації, узагальнення результатів, підготовка статті до друку).
2. Pelekh-Bondaruk I.R., Hrushka O.I., Bilous S.B. Study of allergenic action of biosurfactant on the basis of rhamnolipids *Pseudomonas* sp. PS-17. “*Modern scientific research: achievements, innovations and development prospects*”: proceedings of XIII international scientific and practical conference, Berlin, Germany, 2022, p.139-140. (Особистий внесок: формулювання мети, обговорення результатів дослідження, написання тез).
3. Пелех-Бондарук І.Р., Грушка О.І., Білоус С.Б. Дослідження подразнювальної дії біосурфактанту на основі рамноліпідів *Pseudomonas* sp. PS-17. “*Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії*”: зб. матеріалів VII міжнародної наук.-практ. інтернет-конференції, Харків, 2022, с.346. (Особистий внесок: формулювання мети, обговорення результатів дослідження, написання тез).

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

1. В сучасній дерматології спостерігається тенденція до застосування емульсійних лікарських та косметичних засобів з високим вмістом води, які мають ряд переваг в порівнянні з іншими засобами. Проте розробка таких засобів потребує особливої уваги, зокрема щодо обґрунтованого вибору допоміжних речовин.
2. До найважливіших допоміжних речовин, які застосовуються в емульсійних засобах, належать консерванти та емульгатори, які, переважно, є поверхнево-активними речовинами, і здатні викликати побічні ефекти, зокрема і алергічні реакції.
3. Останнім часом спостерігається зростання інтересу до біогенних поверхнево-активних речовин або біосурфактантів як нових перспективних допоміжних компонентів з високою ефективністю і меншою токсичністю. У складі лікарських та косметичних засобів біогенні ПАР можуть виконувати функції антимікробних консервантів, емульгаторів, антиоксидантів, солубілізаторів та інших.
4. Розроблено загальний план досліджень поверхнево-активних речовин мікробного походження на основі рамноліпідів *Pseudomonas* sp. PS-17 під умовною назвою біокомплекс PS як перспективного консерванта та емульгатора. Для дослідження консервуючої та емульгуючої здатності біокомплексу PS та порівняння його активності з відомими консервантами та емульгаторами вибрано емульсійні основи, оскільки емульсійні форми становлять близько 90% всіх косметичних засобів та значну частину лікарських засобів для нашкірного застосування.
5. Встановлено, що біокомплекс PS проявляє ефективність консерванта у досліджуваних концентраціях від 0,025% до 0,1%. У мінімальній концентрації 0,025 % біокомплекс PS може бути використаний як консервант лише у емульсіях типу в/м з незначним вмістом водної фази (до 30%). Використання біокомплексу PS у концентраціях 0,05 та 0,1 %

відповідає фармакопейним критеріям прийнятності ефективності антимікробних консервантів для емульсійних засобів двох типів.

6. Сумісне використання біокомплексу PS з іншими консервантами, зокрема натрію бензоатом та бензалконію хлоридом підсилює консервуючу активність останніх, що дозволяє зменшити концентрацію консервантів у складі емульсійних засобів.
7. Встановлено, що створення стабільних емульсій м/в вимагає застосування високих концентрацій біокомплексу PS як самостійного емульгатора, більше 10%, що є недоцільним та економічно необґрунтованим, а поєднання емульгаторів другого роду з біокомплексом PS у співвідношенні 70:30 дозволяє одержувати стабільні емульсії при використанні порівняно невисокої кількості комплексного емульгатора, 7-10%.
8. Для раціонального проведення експериментальних досліджень на етапі розробки емульсійних лікарських або косметичних засобів, стабілізованих біокомплексом PS, запропоновано використання методу комп'ютерного моделювання складу емульсій у програмі MO Excel, який базується на застосуванні системи ГЛБ. Комп'ютерне моделювання дає можливість обґрунтувати склад олійної фази емульсії при використанні біокомплексу PS як самостійного емульгатора або встановити співвідношення між біокомплексом PS та емульгатором другого роду при використанні комплексного емульгатора.
9. Узагальнено інформацію щодо особливостей дослідження стабільності та встановлення терміну придатності м'яких лікарських та косметичних засобів, визначено перелік необхідних досліджуваних характеристик, умов та частоти випробування та розроблено алгоритм дослідження, який доцільно застосувати на етапі розробки емульсійних засобів з біокомплексом PS.
10. Досліджено алергенні властивості біокомплексу PS за допомогою методу внутрішньошкірної сенсibiliзації морських свинок та подразнювальну

дію біокомплексу PS шляхом внесення біопрепарату в розведенні 1:10 в кон'юнктивальний мішок ока кроля. Встановлено, що біокомплекс PS не викликає достовірних змін у периферичній крові тварин та алерготестів, що свідчить про відсутність алергізації організму. При нанесенні на слизову оболонку ока біокомплекс PS чинить слабку подразнювальну дію, проте відновлення офтальмостатусу спостерігається на 2-гу добу без проведення лікувальних заходів.

Список використаних джерел

1. Амфіфільні поверхнево-активні речовини на основі промелітового діангідриду як емульгатори емульсійної полімеризації / О. І. Хоменко та ін. *Вопросы химии у химической технологии*. 2012. №4. С. 40-46.
2. Антивірусна активність біосурфактанту культури *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122 / О. В. Карпенко та ін. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2011, Вип. 13. С.164-170.
3. Антимікробна активність композицій на основі тіосульфонатів і біогенних поверхнево-активних речовин щодо фітопатогенів / В. В. Швець та ін. *Наукові вісті НТУУ "КПІ": міжнародний науково-технічний журнал*. 2017. №3. С. 89-94.
4. Білоус С. Б., Шостак Т. А., Пелех-Бондарук І. Р. Перший досвід викладання "Фармацевтична біотехнологія" для здобувачів вищої освіти спеціальності "Фармація, промислова фармація". *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології* : зб. матер. І міжнар. наук.-практ. інтернет-конференції. Харків, 2021. С. 90.
5. Біосинтез пар мікроорганізмами родів *Pseudomonas* на соєвій олії та дослідження їх властивостей / Т. Я. Покинсьброда та ін. *Вісник національного університету «Львівська політехніка», Хімія, технологія речовин та їх застосування*. 2017. № 868. С. 222-228.
6. Бова Т. О. Скринінг речовин мікробного походження з антивірусною активністю *in vitro*. *Біологія тварин*. 2010, Т. 12, № 2. С. 503-507.
7. Бова Т. О., Решотько Л. М. Біологічна активність комплексних препаратів мікробного походження. *Сільськогосподарська мікробіологія*, 2012. Вип. 5-16. С. 118-124.
8. Богш Є., Грейнер И., Глустова Т. Гедеон Рихтер: биотехнологии - будущее фармации. *Новини медицини і фармації*. 2012. № 17 (430). С. 8-9.
9. Бондаренко А. М. Перспективи розробки способів і засобів антивірусної терапії. *Інфекційні хвороби*. 2011. № 4. С. 87-101.

- 10.Бондаренко А. М. Векторні технології і біоекобезпека. *Інфекційні хвороби*. 2011. № 3. С. 94-104.
- 11.Бондаренко Ж. В., Андрюхова М. В. Технология парфюмерно-косметических продуктов. Лабораторный практикум. Минск: БГТУ, 2018. 98 с.
- 12.Бурбан О. І., Вишнеvsька Л. І. Дослідження щодо ефективності антимікробних консервантів у складі багатокomпонентного гелю. *Пріоритетні напрями досліджень в науковій та освітній діяльності : проблеми та перспективи*: матер. Всеукраїнської наук.-практ. конф. з міжнар. участю (м. Рівне, 12-13 жовтня 2021 р.). Рівне, 2021. С. 70-71.
- 13.Виноградова Р. П., Храпунов С. Н. Физико-химические методы в биохимии. К.: Вища школа, 1983. 287 с
- 14.Водянова М. А., Хабарова Е. И., Денерьян Л. Г. Анализ существующих микробиологических препаратов, используемых для биodeградации нефти в почве. *Горный информационно-аналитический бюллетень*. 2010. №7. С. 253-258.
- 15.Волова Л. Т., Пономарева Ю. В., Розенбаум А. Ю. Значение тестирования на культуре клеток для выявления малотоксического эффекта средств медицинского назначения. *Вісник невідкладної і відновної медицини*. 2012. Том 13, № 1. С. 48-51.
- 16.Волова Л. Т., Котельников Г. П., Тертерян М. А Эффективность совместного применения клеточных и тканевых биотехнологий для восстановления суставной гиалиновой хрящевой ткани. *Вісник невідкладної і відновної медицини*. 2012. Том 13, № 1. С. 44-47.
- 17.Вплив мікробних поверхнево-активних речовин на ріст бобових рослин / Н. С. Щеглова та ін. *Biotechnologia ACTA*. 2015. Vol. 8, №1. P. 76-81.
- 18.Вплив поживного середовища на здатність нафтоокислювальних бактерій роду *Pseudomonas* продукувати біосурфактанти / Т. В. Гудзенко та ін. *Science Rise*. 2014. №5(1). С. 7-11.

19. Гомонай В. І. Фізична та колоїдна хімія. Вінниця: Нова книга, 2012. 496 с.
20. Гриневич Ю. А., Алферов А. Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных. *Лабораторное дело*. 1981. №8. С. 493-495.
21. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014.
22. Державний реєстр лікарських засобів України. Режим доступу: <http://www.drlz.kiev.ua/>
23. Державні санітарні правила і норми безпеки продукції парфумерно-косметичної промисловості. Постанова Головного державного санітарного лікаря України № 27 від 01.07.1999 р.
24. Дмитрук С. И. Фармацевтическая и медицинская косметология: учебник. ООО «МИА», 2007. 184 с.
25. Допоміжні речовини у виробництві ліків : навч. посіб. для студентів вищ. фармац. навч. закл. / О. А. Рубан та ін. ; за ред. І. М. Перцева. Харків : Золоті сторінки, 2016. 720 с.
26. Допоміжні речовини у розробці лікарських засобів: фармакологічні, фармацевтичні та технологічні аспекти / Д. С. Савченко, Ю. А. Курапов, Є. П. Воронін, І. С. Чекман. *Запорожский медицинский журнал*. 2011. Т.13, №5. С. 122-129.
27. Дослідження біокомплексу PS як перспективного консерванта у складі лікарських та косметичних засобів / І. Р. Пелех та ін. *ScienceRise: Pharmaceutical science*. 2017. № 3(7). С. 814.
28. Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів: метод. рек. / В. М. Коваленко, О. В. Стефанов, Ю. М. Максимов, І. М. Трахтенберг. Київ, 2000. С.74–97.
29. Использование омегицина при лечении псориаза / Р. Н. Павлова и др. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011. № 7. С. 17-20.

30. Калашникова Е. А. Клеточная инженерия растений: учебное пособие. М.: РГАУ-МСХА. 2012. 318 с.
31. Калюжная О. С., Бурбан О. І. Експериментальне обґрунтування вибору антимікробного консерванта у складі комбінованого гелю. *Annals of Mechnikov Institute*. 2022. № 1. С. 46–50.
32. Карпенко І. В. Біотехнологія рамноліпідних поверхнево-активних продуктів щтаму *Pseudomonas* sp. PS-17 та їх застосування для олійних рослин: дис. к.тех.н.: 03.00.20 / НАН України Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії та вуглехімії ім. Л.М.Литвиненка. Львів, 2017. 146 с.
33. Кильчевский А. В., Хотылева Л. В. Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т.3 Биотехнология селекции растений. Клеточная инженерия. Минск: Беларус. навука. 2012. 489 с.
34. Коваль А. С. Вибір способу введення діючих речовин до складу основи крему для лікування акне і демодекозу. *Фармацевтичний журнал*. 2021. Т. 76, № 1. С. 50-56.
35. Короленко В. В., Степаненко В. І. Місце дерматології в сучасному глобальному здоров'ї. *Український журнал дерматології, венерології, косметології*. 2015. № 2. С. 15-19.
36. Креми косметичні: ДСТУ 4765:2007 (Національний стандарт України). К.: Держспоживстандарт України, 2008. 7 с.
37. Куприненко Н. Г. Биотехнологии в клинической медицине. *Новини медицини і фармації*. 2012. № 17 (430). С. 3-4.
38. Кхаем Хамді, Гортинська О. М. Особливості дермальної мікроциркуляції у хворих на розацеа. *Дерматологія та венерологія*. 2020. № 4. С. 26-28.
39. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / под ред. В. В.Меньшикова. Москва: Медицина, 1987. 364 с.
40. Литинська Т. О. Застосування омега-3 поліненасичених жирних кислот у клінічній дерматології. *Український журнал дерматології, венерології, косметології*. 2013. № 1. С. 123-128.

- 41.Лихтенштейн И. Е. Николай Васильевич Гоголь (20 марта 1809 - 21 февраля 1852). Глазами врача. *Новини медицини і фармації*. 2012. № 8 (410). С. 22-24.
- 42.Лютий Т. В. Лабораторний практикум з фізики. Частина 2 / Т. В. Лютий, О. С. Денисова. Суми : Сумський державний університет, 2012. 70 с.
- 43.Макарова О. Є., Фазекош Я. В. Рослинні вакцини та перспективи їх застосування. *Фітотерапія. Часопис*. 2011. № 4. С. 44-46.
- 44.Метод виділення поверхнево-активного комплексу штаму *Pseudomonas aeruginosa* JRV-L / Д. О. Ляскун та ін. *Вісн. Нац. ун-ту «Львів. політехніка»*. 2016. № 841. С. 181-186.
- 45.Методичні рекомендації для оцінки імунного статусу людини: клініко-лабораторна діагностика алергічних захворювань, типування лейкоцитів, оцінка імунограми: метод. рекомендації / укл. Я. М. Романишин та ін. Львів, 1999. 26 с.
- 46.Мешковский А. П. Испытания стабильности и установление сроков годности лекарственных препаратов. *Газета "Аптека"*. 2000. № 237 (16). Режим доступу: <http://www.apteka.ua/article/10658>.
- 47.Міщенко О. І., Тихонов О.І. Вивчення впливу емульгаторів на реологічні властивості комбінованої м'якої лікарської форми хондропротекторної дії. *Вісник фармації*. 2011. № 3 (67). С. 3-7.
- 48.Мягкие лекарственные средства: фармацевтическая разработка и трансфер технологии / Н. А. Ляпунов и др. *Фармацевтическая отрасль*. 2014. № 5 (46). С. 22–33.
- 49.Нанотехнологии в фармации и медицине: монография / под общ. ред. А. Ф. Пиминова. Харьков: Факт, 2014. Т. 1. 672 с.; Т. 2. 820 с.
- 50.Настанова 42-3.1:2004. Настанови з якості. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка. Київ, 2004. 15 с. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya->

- farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-1/st-n-mozu-42-3-1-2004/
51. Настанова 42-3.3:2004 СТ–Н МОЗУ Лікарські засоби. Випробовування стабільності. Київ, 2004. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-1/st-n-mozu-42-3-3-2004/>
52. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-3.0:2011. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8). Київ, 2011. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-1/st-n-mozu-42-3-0-2011/>
53. Настанова СТ–Н МОЗУ 42–3.6:2004. Лікарські засоби. Допоміжні речовини. Київ : Моріон, 2004. 12с. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-1/st-n-mozu-42-3-6-2004/>
54. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-6.0:2008. Лікарські засоби. Належна лабораторна практика / МОЗ України. Київ, 2008. 255 с. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-2/st-n-mozu-42-6-0-2008/>
55. Настанова СТ–Н МОЗУ 42–6.0:2014. Лікарські засоби. Доклінічні дослідження безпеки як підгрунття клінічних випробувань за участю людини та реєстрації лікарських засобів (ICH M3(R2)). Київ, 2014. 55 с. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-2/st-n-mozu-42-6-0-2014/>
56. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-8.0:2013. Лікарські засоби. Подібні біологічні лікарські препарати, що містять як активні речовини протеїни, отримані біотехнологічним шляхом. Київ, 2013. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-2/st-n-mozu-42-8-0-2013/>
57. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-8.1:2013. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка біотехнологічних та біологічних продуктів. Київ, 2013. Режим

- доступу: <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-2/st-n-mozu-42-8-1-2013/>
- 58.Нові можливості зовнішнього лікування та косметологічного догляду хворих з акне і акнеформними дерматозами / О. О. Сизон та ін. *Український журнал дерматології, венерології, косметології*. 2017. № 1. С. 77-84.
- 59.Новые биотехнологии в диабетологии / В. И. Шепитько и др. *Медицина сьогодні і завтра*. 2011. № 1/2. С. 287-291.
- 60.Отримання оптимальної основи емульсійних косметичних продуктів з урахуванням поверхневих явищ у дисперсних системах / В. Г. Єфімова та ін. *Herald of Khmelnytskyi national university*. 2019. №1. Р.114-117.
- 61.Патент України №10467 А, 51. МПК С12N1/20, С12P1/04, С12R1/38 Штам *Pseudomonas* sp. PS-17-продуцент позаклітинних біоПАР і біополімеру. №95041549; заявл. 05.04.1995; опубл. 25.12.1996, Бюл. № 4.
- 62.Патент України №71792 А,15. МПК С12 N 1/02, С12 R 1:38 Поверхнево-активний біопрепарат. №200331212344; заявл.25.12.2003; опубл. 12.2004, Бюл. №12.
- 63.Пелех І. Р., Білоус С. Б. Сучасні підходи до застосування емульгаторів та консервантів у складі дерматологічних лікарських засобів. *Фармацевтичний часопис*. 2018. № 3. С. 52–57.
- 64.Пелех І. Р., Білоус С. Б. Біокомплекс PS як перспективний емульгатор у складі лікарських та косметичних засобів. *Інновації в медицині: зб. матеріалів 88-ої наук.-практ. конференції студентів та молодих вчених із міжнародною участю*. Івано-Франківськ, 2019. С. 106.
- 65.Пелех І. Р., Білоус С. Б. Дослідження емульгуючих властивостей біокомплексу PS у дерматологічних засобах. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: зб. матеріалів VII наук.-практ. інтернет-конференції з міжнародною участю*. Тернопіль, 2018. С. 117.

- 66.Пелех І. Р., Білоус С. Б. Дослідження нових допоміжних речовин мікробного походження. *Управління якістю в фармації*: зб. матеріалів XIV наук.-практ. конференції. Харків, 2020. С. 119.
- 67.Пелех І. Р., Білоус С. Б. Розробка емульсій для дослідження консервуючої активності біокомплексу PS. *Фармацевтична наука та практика: проблеми, досягнення, перспективи розвитку*: зб. матеріалів I наук.-практ. інтернет-конференції з міжнародною участю. Харків, 2016. С. 76.
- 68.Пелех І. Р., Білоус С. Б. Розробка косметичних засобів з консервантами мікробного походження. *Довкілля і здоров'я*: зб. матеріалів наук.-практ. конференції, присвяченої 30-річчю Чорнобильської катастрофи. Тернопіль, 2016, С. 89.
- 69.Пелех І. Р., Білоус С. Б. Сучасні підходи до застосування емульгаторів та консервантів у складі дерматологічних лікарських засобів. *Фармацевтичний часопис*. 2018. №3. С. 52-57.
- 70.Пелех І. Р., Білоус С. Б., Ділай Н. В. Дослідження консервуючої активності біокомплексу PS. *Сучасні досягнення фармацевтичної біотехнології*: зб. матеріалів V наук.-практ. інтернет-конференції з міжнародною участю, Харків, 2016. С. 457.
- 71.Пелех-Бондарук І. Р., Білоус С. Б. Дослідження стійкості емульсій, стабілізованих біокомплексом PS. *Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи*: зб. матеріалів наук.-практ. конференції з міжнародною участю присвячена 100-річчю Національного фармацевтичного університету, Харків, 2021. С. 99-100.
- 72.Пелех-Бондарук І. Р., Білоус С. Б., Шостак Т. А. Перспективи розвитку фармацевтичної біотехнології. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології*: зб. матер. I міжнар. наук.-практ. інтернет-конференції, Харків, 2021. С. 266.
- 73.Пелех-Бондарук І. Р., Грушка О. І., Білоус С. Б. Дослідження подразнювальної дії біосурфактанту на основі рамноліпідів *Pseudomonas* sp. PS-17. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення*

лікарських препаратів різної направленості дії: зб. матеріалів VII міжнародної наук.-практ. інтернет-конференції, Харків, 2022. С. 346.

74. Перспективи застосування поверхнево-активних речовин мікробного походження у складі лікарських та косметичних засобів / І. Р. Пелех, С. Б. Білоус, Р. І. Вільданова, О. М. Шульга. *Фармацевтичний часопис*. 2016. №1(37). С. 108-112.
75. Перцев І. М., Дмитрієвський Д. І., Рибачук В. Д. Допоміжні речовини в технології ліків: вплив на технологічні, споживчі, економічні характеристики і терапевтичну ефективність: навч. посібник для студентів вищ. фарм. навч. закладів. Харків, 2010. 600 с.
76. Пирог Т. П., Ігнатенко С. В. Мікробні поверхнево-активні речовини: проблеми промислового виробництва. *Біотехнологія*. 2008. Т. 1, № 4. С. 29-38.
77. Пирог Т. П., Конон А. Д., Скочко А. Б. Використання мікробних поверхнево-активних речовин у біології і медицині. *Біотехнологія*. 2011. Т.4, № 2. С. 24-35.
78. Підгорський В. С., Іутинська Г. О., Пирог Т. П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. К.: Наукова думка. 2010. 328 с.
79. Покинсьброда Т. Я. Біотехнологія поверхнево-активних продуктів бактерій роду *Pseudomonas*, їх властивості та застосування: дис. к.тех.н.: 03.00.20 / НАН України Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії та вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка, Національний технічний університет України "Київський політехнічний інститут ім. І. Сікорського". Львів, 2018. 207 с.
80. Попандопуло А. Г., Селезнева О. І., Гончарова Я. А. Биотехнологические особенности получения аутологичных фибробластов и перспективы их использования в современной косметологии. *Вісник невідкладної і відновної медицини*. 2012. Том 13, № 1. С. 161.
81. Попова Т. В., Кухтенко Г. П., Гладух Є. В. Аналіз консервантів, що застосовуються в технології виробництва м'яких лікарських засобів.

Науково–технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матеріали VII наук.–практ. конф. з міжнар. участю, м. Тернопіль, 27–28 верес. 2018 р. Тернопіль : Укрмедкнига, 2018. С. 122–124.

- 82.Порушення імунного статусу організму людини за дії хімічних чинників та методи їх визначення: метод. рекомендації / І. М. Трахтенберг та ін. Київ, 2007. 48 с.
- 83.Порядок проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах: Наказ Міністерства освіти, науки, молоді та спорту України від 01.03.2012 № 249. Офіційний вісник України. 2012. № 24. 82 с.
- 84.Практикум з технології лікарських косметичних засобів / Т.Г. Калинюк та ін. Київ, 2008. 184 с.
- 85.Про затвердження Порядку державної реєстрації лікарських засобів: Наказ МОЗ України №426 від 26.08.2005 року. Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1069-05#Text>
- 86.Про затвердження Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів: наказ МОЗ України № 944 від 14.12.2009. Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0053-10#Text>
- 87.Про затвердження Технічного регламенту на косметичну продукцію: Постанова Кабінету Міністрів України №65 від 20.02.2021. Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/65-2021-%D0%BF#Text>
- 88.Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України №3447-IV від 21.02.2006. Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>
- 89.Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях: Директива Європейського Парламенту та Ради ЄС 2010/63/ЄС від 22.09.2010 року
- 90.Про лікувальні препарати прогресивної терапії, що вносить зміни до Директиви 2001/83/ЄС і до Регламенту ЄС №726/2004: Регламент ЄС

- №1394/2007 Європейського Парламенту та Ради від 13.11.2007 року.
Режим доступу: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_a28#Text
- 91.Промислова технологія лікарських засобів: Підручник для студ. фармацев. спец. вищ. навч. закл. / Є.В. Гладух та ін. Харків: НФаУ, 2016. 630 с.
- 92.Розробка рецептури емульсійного косметичного продукту на основі колоїдних закономірностей / В. Єфімова, Т. Пилипенко, О. Нікора, П. Невпряга. *Технічні науки та технології*. 2018. №1(11). С. 178-187.
- 93.Руденко В. В. Методологічні підходи до розробки дерматологічних м'яких лікарських засобів. *Фармацевтичний журнал*. 2012. № 2. С. 65–68.
- 94.Синтез поверхнево-активних речовин штамом *Pseudomonas sp.* PS – 17 на змішаних субстратах / Т. Я. Покинсьброда та ін. *Вісн. Нац. ун-ту «Львівська політехніка»*. 2016. № 841. С. 210-216.
- 95.Соловйова А. В., Калюжная О. С. Дослідження стабільності м'якого препарату для нашкірного застосування «Пробіоскін» у процесі зберігання. *Annals of Mechnikov's Institute*. 2021. № 4. С. 85–90.
- 96.Соловйова А. В., Калюжная О. С. Технологічні аспекти розробки емульгелю з пробіотичним компонентом для лікування інфекційно–запальних захворювань. *Вісник фармації*. 2022. № 1. С. 73–78.
- 97.Стандарт МОЗ України «Вимоги до виготовлення нестерильних лікарських засобів в умовах аптек» СТ-Н МОЗУ42 – 4.5: 2015 / За ред. проф. О.І. Тихонова і проф. Т.Г. Ярних. Київ, 2015. 109 с. (Затверджено наказом МОЗ України № 398 от 01.07.2015).
- 98.Технологія косметичних засобів: навч. посібник для студ. фармацев. спец. вищ. навч. заклад. / О. Г. Башура, Н. П. Половко, Т. М. Ковальова та ін. Вінниця, 2007. 360 с.
- 99.Технологія ліків промислового виробництва: підручник Т 38 для студ. вищ. навч. закл. : Ч. 2. / В.І. Чуєшов та ін. Харків, 2013. 638 с.
100. Тимофеев В. А., Восканян О. С. Новые эмульсионные продукты с функциональными свойствами. *Управление торговлей: теория, практика,*

- инновации* : матер. IV Международной научно-практической конференции. М., 2011. С. 381-384.
101. Токсикологічна хімія харчових продуктів та косметичних засобів / С. А. Воронов, Ю. Б. Стецишин, Ю. В. Панченко, В. П. Васильєв. Львів: Видавництво Львівської політехніки, 2010. 316 с.
 102. Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию предельно допустимых концентраций промышленных химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы: МУ 1.1.578-9. 1997. 24 с.
 103. Чекман І. С. Нанофармакологія. Київ: Задруга, 2011. 424 с.
 104. Шрам Н. А., Мошціц В. Ф., Дмитрієвський Д. І. Дослідження стабільності та визначення умов зберігання і терміну придатності мазі "Естан". *Фармацевтичний часопис*. 2017. № 2. С. 59-63.
 105. Шухтін В. В., Гоженко О. О., Шандра А. І. Викладання курсу дерматології та венерології в ОНМедУ на сучасному етапі розвитку вищої медичної освіти. *Медична освіта*. 2015. № 1. С. 148-149.
 106. Эмульсии и НЛВ система. Режим доступу : <http://forum.aroma-vita.com.ua/index.php?showtopic=1539>
 107. Ярема О. І., Федоровська М. І. Розробка складу емульсійної основи при створенні лікарського косметичного засобу для застосування при андрогенній alopecії. *Вісник фармації*. 2014. №2 (78). С. 15-19.
 108. Ярема О. І., Федоровська М. І., Половко Н. П. Розроблення технології емульгелю з екстрактом пальми сабал та настоякою софори японської для лікування андрогенної alopecії. *Фармацевтичний журнал*. 2016. №5. С. 50-56.
 109. 10-летний опыт клинического применения биотехнологии / В. К. Гринь и др. *Вісник невідкладної і відновної медицини*. 2012. Том 13, № 1. С. 3-9.

110. Алексеева О. Г., Дуева Л. А. Аллергия к промышленным соединениям. Медицина, 1978. 272 с.
111. A Molecular Basis for Innovation in Drug Excipients / J.J. Irwin et al. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2017. Vol. 101(3). P. 320-323.
112. Aaron Tan, Mohammad S. Alavijeh, Alexander M. Seifalian Next generation stent coatings: convergence of biotechnology and nanotechnology. *Trends in Biotechnology*. 2012. Vol. 30, № 8. P. 406-409.
113. Abdel-Mawgoud A. M., Aboulwafa M. M., Hassouna N. A. H. Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate BS20. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009. Vol. 157. P. 329–345.
114. Abdel-Mawgoud A. M, Lépine F., Déziel E. Liquid chromatography / mass spectrometry for the identification and quantification of rhamnolipids. *Methods Mol. Biol.* 2014. Vol. 1149. P. 359-373.
115. Abrantes C. G, Duarte D., Reis C. P. An Overview of Pharmaceutical Excipients: Safe or Not Safe? *J. Pharm. Sci.* 2016. Vol. 105 (7). P. 2019-2026.
116. Ando S., Saito M.. Chromatography lipid, biomedical research and chemical diagnostic. Elsevier.: Amsterdames. 1987. P. 266-310.
117. Antifungal activity of flocculosin, a novel glycolipid isolated from *Pseudozyma flocculosa* / B. Mimee et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. Vol. 49, № 4. P. 1597-1599.
118. Anti-herpesvirus activities of *Pseudomonas* sp. S-17 rhamnolipid and its complex with alginate / M. Remichkova et al. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* 2008. Vol. 63 (1-2). P. 75-81.
119. Application of Sweetwater as Potential Carbon Source for Rhamnolipid Production by Marine *Pseudomonas aeruginosa* UMTKB-5. / Mohamad Azran Faris Mohamad Azemi, Noor Fazielawanie, Jasnizat Saidin, Effendy Wahid. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics.* 2016. Vol. 6 (2). P. 50-58.

120. Athanasios Kakasis, Gerasimia Panitsa. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *International journal of antimicrobial agents*. 2019. Vol. 53. P. 16-21.
121. Bader A. The biotechnology of tissue regeneration evolves from nature: how can we apply this knowledge clinically in injury and trauma as a point of care procedure? *Вісник невідкладної і відновної медицини*. 2012. Том 13, № 1. P. 10.
122. Biosurfactant production by *Pseudomonas Sp* from Soil Using Whey as Carbon Source / B. V. Praveesh et al. *New York Sci. J.* 2011. Vol. 4, №4. P. 99-103.
123. Biosurfactants: potential applications in medicine / L. Rodrigues et al. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006. Vol. 57 (4). P. 609-618.
124. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50 / M. Yakimov et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995. Vol. 61, № 5. P. 1706-1713.
125. Cho Y. S., Schiller N. L., Oh K. H. Antibacterial effects of green tea polyphenols on clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* 2008. Vol. 57, № 6. P. 542-546.
126. Chong H., Li Q. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microb. Cell. Fact.* 2017. Vol. 16 (1). P. 137.
127. Chowdhury D. K., Sarker H., Schwartz P. Regulatory Notes on Impact of Excipients on Drug Products and the Maillard Reaction. *AAPS PharmSciTech*. 2018 Vol. 19 (2). P. 965-969.
128. Chudinova N. B., Kienskaya K. I., Avramenko G. V. Control of some colloid-chemical behaviors when developing cosmetic creams. Proceedings of the XXV-th International Symposium Physicochemical Methods of Separation "Ars Separatoria". Torun, 2010. P. 254-256.
129. Cosmetic emulsion from virgin olive oil: Formulation and bio-physical evaluation / S. Smaoui et al. *African Journal of Biotechnology*. 2012. Vol. 11 (40). P. 9664-9671.

130. D'aes G., De Maeyer K., Pauwelyn E. Biosurfactants in plant – *Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol. *Environ. Microbiol. Reports*. 2010. Vol. 2, №3. P. 359-372.
131. Das P., Mukherjee S., Sen R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *J. Appl. Microbiol.* 2008. Vol. 104, № 6. P. 1675-1684.
132. Development and validation of an ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the quantitative determination of rhamnolipid congeners / M. Rudden et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. Vol. 99 (21). P. 9177-9187.
133. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. URL : <https://www.kmu.gov.ua/storage/app/sites/1/55-GOEEI/2001-83-es.pdf>
134. Dubern J. F. Regulation of the biosynthesis of novel cyclic lipopeptides from *Pseudomonas putida* strain PCL1445: PhD thesis. ISBN: 90-9020584-5. - Ridderkerk, The Netherlands, 2006. 174 p.
135. Elder D. P., Kuentz M., Holm R. Pharmaceutical excipients - quality, regulatory and biopharmaceutical considerations. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2016. Vol. 25. P. 88-99.
136. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg. 1986. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137#Text
137. European Pharmacopoeia / European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care. 10th ed. Strasbourg : Council of Europe, 2019. URL: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia>
138. Evaluation of di-rhamnolipid biosurfactants production by a novel *Pseudomonas* sp. S1WB: Optimization, characterization and effect on petroleum-hydrocarbon degradation / I. A. Phulpoto et al. *Ecotoxicol. Environ Saf.* 2022. Vol. 242. P. 113892.

139. Fermentative production of rhamnolipid and purification by adsorption chromatography / J. Jadhav, S. Dutta, S. Kale, A. Pratap. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2018. Vol. 48 (3). P. 234-241.
140. Furnback W., Wang B., Magyar A.F. Are the Biotechnology and Pharmaceutical Sectors Defensive Relative to the S&P 500? *Value in Health.* 2013. Vol. 16, № 7. P. 454-454.
141. Gajbhiye S., Sakharwade S. Silver nanoparticles in cosmetics. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications.* 2016. Vol. 6. P. 48-53.
142. Gallo R. L. Human skin is the largest epithelial surface for interaction with microbes. *Investigation Dermatology.* 2017. Vol. 137, № 6. P. 1213-1214.
143. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*--a review / R. S. Reis, A. G. Pereira, B. C. Neves, D. M. Freire. *Bioresour Technol.* 2011. Vol. 102 (11). P. 6377-84.
144. Haddad N. I., Wang J., Mu B. Isolation and characterization of a biosurfactant producing strain, *Brevibacillus brevis* HOB1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008. Vol. 35, № 12. P. 1597-1604.
145. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 8th ed. / eds. P. J. Sheskey, W. G. Cook, C. G. Cable. London: American Pharmacists Association, Pharmaceutical Press, 2017. 1216 p.
146. Hibbott H. W. Handbook of cosmetic science: an introduction to principles and applications. New York, USA: Oxford, 2016. 566 p.
147. High-throughput system-wide engineering and screening for microbial biotechnology / Yannick Vervoort et al. *Current Opinion in Biotechnology.* 2017. Vol. 46. P. 120-125.
148. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants / A. K. Koch, O. Kappeli, A. Fiechter. *Journal of Bacteriology.* 1991. Vol. 173 (3). P. 4212-4219.
149. In vitro synergistic activities of essential oils and surfactants in combination with cosmetic preservatives against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* / V. Patrone et al. *Curr. Microbiol.* 2010. Vol. 60, № 4. P. 237-241.

150. Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses / L. R. Rodrigues et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. Vol. 70, № 7. P. 4408-4410.
151. Influence of Excipients on the Structural and Mechanical Properties of Semisolid Dosage Forms / H. Kukhtenko, I. Gladukh, O. Kukhtenko, D. Soldatov. *Asian Journal of Pharmaceutics.* 2017. Vol. 11, № 3. P. 575–578.
152. Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants / L. R. Rodrigues et al. *J. Appl. Microbiol.* 2006. Vol. 100, № 3. P. 470-480.
153. Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity / S. Lee et al. *Arch. Microbiol.* 2007. Vol. 188, № 4. P. 307-312.
154. Jim C. Philp, Rachael J. Ritchie, Jacqueline E.M. Allan Biobased chemicals: the convergence of green chemistry with industrial biotechnology. *Trends in Biotechnology.* 2013. Vol.31, № 4. P. 219-222.
155. Joshi S., Bharucha C., Desai A. J. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresour. Technol.* 2008. Vol. 99, № 11. P.4603-4608.
156. Kapadia Sanket G., Yagnik B.N. Current Trend and Potential for Microbial Biosurfactants. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 2013. Vol. 4, №1. P. 1-8.
157. Liang Zhaoa, Arjun Setha, Nani Wibowoa. Nanoparticle vaccines. *Vaccine.* 2014. Vol. 32, № 3. P. 327-337.
158. Mannosylerythritol lipids: a review / J. I.Arutchelvi et al. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008. Vol. 35, № 12. P. 1559-1570.
159. Maqsood M. I., Jamal A. Factors affecting rhamnolipid biosurfactant production. *Pak. J. Biotechnol.* 2011. Vol. 8, №1. P. 1-5.
160. McClements D. J., Jafari S. M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Advances in Colloid and Interface Science.* 2018. Vol. 251. P. 55-79.
161. Microbial biosurfactants production, applications and future potential / I. Banat

- et al. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010. Vol. 87. P. 427-444.
162. Molecular and Biochemical Approaches for Characterization of Antifungal Trait of a Potent Biocontrol Agent *Bacillus subtilis* RP24 / M. Grover et al. *Current Microbiology*. 2010. Vol. 60 (2). P. 99-106.
163. Okoliegbe I. N., Agarry O. O. Application of microbial surfactant. *Scholarly J. of Biotechnol.* 2012. Vol. 1, №1. P. 5-6.
164. Palcsó B., Zelkó R. Different types, applications and limits of enabling excipients of pharmaceutical dosage forms. *Drug Discov Today Technol.* 2018. Vol. 2. P. 21-39.
165. Patel R., Barker J., ElShaer A. Pharmaceutical Excipients and Drug Metabolism: A Mini-Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21 (21). P. 8224.
166. Pelekh I. R., Bilous S. B. Development of the algorithm of stability study of semi-solid preparations and cosmetics with biocomplex PS. *Danish scientific journal.* 2020. Vol. 36 (2). P.62-65.
167. Pelekh I. R., Bilous S. B. Study of auxiliary substance of microbial origin in dermatology products. *Medicine under the modern conditions of integration development of European countries: international scientific conference.* Lublin, Republic of Poland, 2019. P. 267
168. Pelekh-Bondaruk I. R., Hrushka O. I., Bilous S. B. Study of allergenic action of biosurfactant on the basis of rhamnolipids *Pseudomonas* sp. PS-17. *Modern scientific research: achievements, innovations and development prospects: proceedings of XIII international scientific and practical conference.* Berlin, Germany, 2022. P. 139-140.
169. Pharmaceutical excipients. Adverse effects associated with inactive ingredients in drug products (Part I) / L. K. Golightly, S. S. Smolinske, M. L. Bennett, E. W. Sutherland. 3rd, Rumack BH. *Med. Toxicol. Adverse. Drug. Exp.* 1988. Vol. 3 (2). P. 128-165.
170. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes / A. Abalos et al. *Langmuir.* 2001. Vol. 17, № 5. P. 1367–1371.

171. Pornsunthorntawe O., Wongpanit P., Rujiravanit R. Rhamnolipid biosurfactants: production and their potential in environmental biotechnology. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010. Vol. 672. P. 211-21.
172. Pre-clinical formulation screening, development and stability of acetyl aspartic acid for cosmetic application / K. Cattley et al. *International Journal of Cosmetic Science.* 2015. Vol. 37. P. 28-33.
173. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain / M. Rikalovic et al. *Journal of the Serbian Chemical Society.* Vol. 77 (1). 2012. P. 27–42.
174. Recent progress and trends in the analysis and identification of rhamnolipids. / J. Jiang et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020 Vol. 104 (19). P. 8171-8186.
175. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European parliament and of the council of 30 November 2009 on cosmetic products. URL : <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:en>
176. Residual film formation after emulsion application: Understanding the role and fate of excipients on skin surface / E. Faucheux, C. Picard, M. Grisel, G. Savary. *Int. J. Pharm.* 2020. Vol. 585. P. 119453.
177. Revyatsky I.Y., Pelekh-Bondaruk I.R., Bilous S.B. Modeling of the process of emulsifiers selecting in emulsion medicines and cosmetics. *PharmacologyOnline.* 2021. Vol. 3. P.139-150.
178. Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes / P. Vatsa et al. *Int. J. Molecular Sci.* 2010. Vol. 11. P. 5095–5108.
179. Rhamnolipid biosurfactant analysis using online turbulent flow chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry / B. Behrens et al. *J. Chromatogr A.* 2016. Vol. 1465. P. 90-97.
180. Rhamnolipid biosurfactants: evolutionary implications, applications and future prospects from untapped marine resource / G .S. Kiran et al. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2016. Vol. 36 (3). P. 399-415.

181. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules / R. B. Lovaglio, F. J. Santos, M. Jr. Jafelicci, J. Contiero. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2011. Vol. 85 (2). P. 301-305.
182. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: from molecular genetics to the market / G. Soberón-Chávez, A. González-Valdez, M. P. Soto-Aceves, M. Cocotl-Yañez. *Microb. Biotechnol.* 2021 Vol. 14 (1). P. 136-146.
183. Role of excipients in successful development of self-emulsifying/microemulsifying drug delivery system (SEDDS/SMEDDS) / M. A. Rahman et al. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 2013. Vol. 39 (1). P. 1-19.
184. Saharan B. S., Sahu R. K., Sharma D. A review on Biosurfactants: Fermentation, Current developments and perspectives. *Genet. Engineer. Biotechnol. J.* 2011. Vol. 2, №1. P. 1-14.
185. Saini H., Barragan-Huerta B., Lebroan-Paler A. Efficient purification of the biosurfactant viscosin from *Pseudomonas libanensis* strain M9-3 and its physicochemical and biological properties. *J. Nat. Prod.* 2008. Vol. 71, № 6. P.1011-1015.
186. Schramm L. L. *Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005. 465 p.
187. Sekhon K. K., Khanna S., Cameotra S. S. Biosurfactant Production and Potential Correlation with Esterase Activity. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*. 2012. № 7. P. 1-10.
188. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics / S. Kokura et al. *Nanomedicine: Nanotechnol., Biology and Medicine*. 2010. Vol. 6, № 4. P. 570-574.
189. Sim L., Ward O.P., Zy Li. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1997. Vol. 19. P. 232-238.
190. Singh P., Cameotra, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology*. 2004. Vol. 22(3), p. 142–146.

191. Statistical Screening of Medium Components for Recombinant Production of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 Rhamnolipids by Nonpathogenic Cell 121 Factory *Pseudomonas putida* KT2440 / P. Setoodeh et al. *Molecular Biotechnology*. 2014. № 2. P. 175-191.
192. Study of emulsion products stabilized with surfactants based on rhamnolipids *Pseudomonas* sp. PS-17 / I. R. Pelekh-Bondaruk et al. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2022. Vol. 14 (2). P.315-318.
193. The HLB system a time-saving guide to emulsifier selection ICI Americas Inc. Wilmington, DE, 1980. URL : https://www.academia.edu/24755447/The_HLB_SYSTEM_a_time_saving_guide_to_emulsifier_selection_ANTICIPATING_NEEDS
194. Unveiling the mono-rhamnolipid and di-rhamnolipid mechanisms of action upon plasma membrane models / A. Marega Motta et al. *J. Colloid. Interface Sci.* 2022. Vol. 624. P. 579-592.
195. Vasconcelos T., Marques S., Sarmiento B. The biopharmaceutical classification system of excipients. *Ther. Deliv.* 2017. Vol. 8 (2). P. 65-78.
196. Veronica N., Heng P. W. S., Liew C. V. J. Ensuring Product. Stability - Choosing the Right Excipients. *J. Pharm. Sci.* 2022, Vol. 111 (8). P. 2158-2171.
197. Walters K. *Dermatological and transdermal formulations*: Edited by Kenneth A.Walters. NewYork-London, 2007. 565 p.
198. Walters Y. *Dermatologic, cosmeceutic and cosmetic development*: Edit. Y.Walters, 2008. 644 p.
199. Walters K. A., Roberts M. S. *Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development*. CRC Press, 2007. 648 p.
200. Ward O. P. Microbial biosurfactants andbiodegradation', *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2010. Vol. 672. P. 65-74.

ДОДАТОК А
СПИСОК ПУБЛІКАЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті (Scopus/web of science)

1. Pelekh-Bondaruk I.R., Vildanova R.I., Kobylinska L.I., Bila Y.Y., Bilous S.B. Study of emulsion products stabilized with surfactants based on rhamnolipids *Pseudomonas* sp. PS-17. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2022. № 14(2). P.315-318. *(Особистий внесок: участь у плануванні експерименту та проведенні дослідження, узагальнення результатів, підготовка статті до друку).*

Статті у вітчизняних фахових наукових виданнях:

2. Пелех І.Р., Білоус С.Б., Вільданова Р.І., Шульга О.М. Перспективи застосування поверхнево-активних речовин мікробного походження у складі лікарських та косметичних засобів. *Фармацевтичний часопис*. 2016. №1(37). С.108-112. *(Особистий внесок: пошук інформації, обробка та узагальнення одержаних даних, підготовка статті до друку).*
3. Пелех І.Р., Ділай Н.В., Білоус С.Б., Вільданова Р.І., Шульга О.М. Дослідження біокомплексу PS як перспективного консерванта у складі лікарських та косметичних засобів. *“ScienceRise: Pharmaceutical science”*. 2017. №3(7). С.814. *(Особистий внесок: планування експерименту, приготування зразків, узагальнення результатів, підготовка статті до друку).*
4. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Сучасні підходи до застосування емульгаторів та консервантів у складі дерматологічних лікарських засобів. *Фармацевтичний часопис*. 2018. №3. С.52-57. *(Особистий внесок: пошук інформації, обробка та узагальнення одержаних даних, підготовка статті до друку).*

Статті в інших іноземних виданнях за напрямком дисертації

5. Pelekh I.R., Bilous S.B. Development of the algorithm of stability study of semi-solid preparations and cosmetics with biocomplex PS. *Danish scientific journal*. 2020. №36(2). С.62-65. (*Особистий внесок: пошук інформації, узагальнення результатів, підготовка статті до друку*).
6. Revyatskyu I.U., Pelekh-Bondaruk I.R., Bilous S.B. Modeling of the process of emulsifiers selecting in emulsion medicines and cosmetics. *PharmacologyOnLine. Newsletter*. 2021. Vol. 3. P. 139-150. (*Особистий внесок: участь і плануванні та проведенні дослідження, узагальнення результатів, підготовка статті до друку*).

Тези доповідей:

7. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Розробка косметичних засобів з консервантами мікробного походження. “Довкілля і здоров’я” присвяченої 30-річчю Чорнобильської катастрофи: зб. матеріалів наук.-практ. Конференції, Тернопіль, 2016, с.89. (*Особистий внесок: проведення дослідження, написання тез*).
8. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Розробка емульсій для дослідження консервуючої активності біокомплексу PS. “Фармацевтична наука та практика: проблеми, досягнення, перспективи розвитку”: зб. матеріалів І наук.-практ. інтернет-конференції з міжнародною участю, Харків, 2016, с.76. (*Особистий внесок: проведення дослідження, написання тез*).
9. Пелех І.Р., Білоус С.Б., Ділай Н.В. Дослідження консервуючої активності біокомплексу PS. “Сучасні досягнення фармацевтичної біотехнології”: зб. матеріалів V наук.-практ. інтернет-конференції з міжнародною участю, Харків, 2016, с.457. (*Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез*).

- 10.Пелех І.Р., Білоус С.Б. Дослідження емульгуючих властивостей біокомплексу PS у дерматологічних засобах. *“Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів”*: зб. матеріалів VII наук.-практ. інтернет-конференції з міжнародною участю, Тернопіль, 2018, с.117. (Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез).
- 11.Пелех І.Р., Білоус С.Б. Біокомплекс PS як перспективний емульгатор у складі лікарських та косметичних засобів. *“Інновації в медицині”*: зб. матеріалів 88-ої наук.-практ. конференції студентів та молодих вчених із міжнародною участю, Івано-Франківськ, 2019, с.106. (Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез).
- 12.Pelekh I.R., Bilous S.B. Study of auxiliary substance of microbial origin in dermatology products. *“Medicine under the modern conditions of integration development of European countries”*: international scientific conference, Lublin, Republic of Poland, 2019, p.267. (Особистий внесок: проведення дослідження, написання тез).
- 13.Пелех І.Р., Білоус С.Б. Дослідження нових допоміжних речовин мікробного походження. *“Управління якістю в фармації”*: зб. матеріалів XIV наук.-практ. конференції, Харків, 2020, с.119. (Особистий внесок: проведення дослідження, написання тез).
- 14.Пелех-Бондарук І.Р., Білоус С.Б., Шостак Т.А. Перспективи розвитку фармацевтичної біотехнології. *“Проблеми та досягнення сучасної біотехнології”*: зб. матер. I міжнар. наук.-практ. інтернет-конференції, Харків, 2021, с.266. (Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез).
- 15.Білоус С.Б., Шостак Т.А., Пелех-Бондарук І.Р. Перший досвід викладання *“Фармацевтична біотехнологія”* для здобувачів вищої освіти спеціальності *“Фармація, промислова фармація”*. *“Проблеми та досягнення сучасної біотехнології”*: зб. матер. I міжнар. наук.-практ. інтернет-конференції,

Харків, 2021, с.90. *(Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез).*

- 16.Пелех-Бондарук І.Р., Білоус С.Б. Дослідження стійкості емульсій, стабілізованих біокомплексом PS. “Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи”: зб. матеріалів наук.-практ. конференції з міжнародною участю присвячена 100-річчю Національного фармацевтичного університету, Харків, 2021, с.99-100. *(Особистий внесок: формулювання мети, проведення дослідження, написання тез).*
- 17.Pelekh-Bondaruk I.R., Hrushka O.I., Bilous S.B. Study of allergenic action of biosurfactant on the basis of rhamnolipids Pseudomonas sp. PS-17. “Modern scientific research: achievements, innovations and development prospects”: proceedings of XIII international scientific and practical conference, Berlin, Germany, 2022, p.139-140. *(Особистий внесок: формулювання мети, обговорення результатів дослідження, написання тез).*
- 18.Пелех-Бондарук І.Р., Грушка О.І., Білоус С.Б. Дослідження подразнювальної дії біосурфактанту на основі рамноліпідів Pseudomonas sp. PS-17. “Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії”: зб. матеріалів VII міжнародної наук.-практ. інтернет-конференції, Харків, 2022, с.346. *(Особистий внесок: формулювання мети, обговорення результатів дослідження, написання тез).*

ДОДАТОК Б

ВІДОМОСТІ ПРО РЕЗУЛЬТАТИ АПРОБАЦІЇ РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Науково-практична конференція “Довкілля і здоров’я”, присвячена 30-річчю Чорнобильської катастрофи (Тернопіль, 2016);
2. I науково-практична конференція з міжнародною участю “Фармацевтична наука та практика: проблеми, досягнення, перспективи розвитку” (Харків, 2016);
3. V науково-практична інтернет конференція з міжнародною участю “Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології” (Харків, 2016);
4. VII науково-практична інтернет конференція з міжнародною участю “Науково-технічний процес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів” (Тернопіль, 2018);
5. 88-а науково-практична конференція студентів та молодих вчених із міжнародною участю “Інновації в медицині” (Івано-Франківськ, 2019);
International scientific conference “Medicine under the modern conditions of integration development of European countries” (Lublin, 2019);
6. XIV науково-практична конференція “Управління якістю в фармацевції” (Харків, 2020);
7. I міжнародна науково-практична інтернет-конференція “Проблеми та досягнення сучасної біотехнології” (Харків, 2021);
8. Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 100-річчю Національного фармацевтичного університету “Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи” (Харків, 2021);
9. XIII international scientific and practical conference “Modern scientific research: achievements, innovations and development prospects” (Berlin, 2022);
10. VII міжнародна науково-практична інтернет-конференція “Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії” (Харків, 2022).

ДОДАТОК В.1

**НАЙПОШИРЕНІШІ КОНСЕРВАНТИ, ЯКІ ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ У
КОСМЕТИЧНІЙ ПРОДУКЦІЇ (відповідно до Технічного Регламенту ЄС
№1223/2009)**

№	Хімічна назва	Інгредієнт згідно Міжнародної номенклатури косметичних інгредієнтів (INCI)	Тип продукту та частина тіла на якій застосовується	Максимально допустима концентрація	Умови застосування та застереження
1	Бензойна кислота та її натрієва сіль	Benzoic acid, Sodium benzoate	1)КЗ, що змиваються. Окрім порожнини рота 2)КЗ для порожнини рота 3)КЗ, що не змиваються	1)2,5% (кислота) 2)1,7% (кислота) 3)0,5% (кислота)	
2	Інші солі бензойної кислоти та її складні ефіри (Salts benzoic acid and other than that listed under reference number 1 and esters of benzoic acid)	Ammonium benzoate, calcium benzoate, potassium benzoate, magnesium benzoate, MEA-benzoate, methyl benzoate, ethyl benzoate, propyl benzoate, butyl benzoate, isobutyl benzoate, isopropyl benzoate, phenyl benzoate		0,5% (кислота)	
3	Саліцилова кислота та її солі	Salicylic acid, calcium salicylate,		0,5% (кислота)	Не використовувати у

	Salicylic acid and its salts	magnesium salicylate, MEA-salicylate, sodium salicylate, potassium salicylate, TEA-salicylate			продукції, призначеної для дітей молодше 3 років, окрім шампунів
4	Гекса-2,4-дієнова кислота та її солі (hexa-2,4-dienoic acid and its salts)	Sorbic acid, calcium sorbate, sodium sorbate, potassium sorbate		0,6% (кислота)	
5	Неорганічні сульфіти та гідросульфіти (Inorganic sulphites and hydrogen sulphites) (5)	Sodium sulfite, ammonium bisulfite, ammonium sulfite, potassium sulfite, potassium hydrogen sulfite, sodium bisulfite, sodium metabisulfite, potassium metabisulfite		0,2% (у перерахунку на вільний SO ₂)	
6	Хлорбутанол (Chlorobutanol)	Chlorobutanol		0,5 %	Містить хлорбутанол. Заборонено використання в аерозольних розпилювачах (спреях)
7	4-гідроксибензойна кислота та її метило- та етилові ефіри та їх солі	4-Hydroxybenzoic acid, methylparaben, potassium ethylparaben,		0,4% (кислота) для одного ефіру 0,8% (кислота)	

	(4-Hydroxybenzoic acid and its Methyl- and Ethyl-esters, and their salts)		potassium paraben, sodium methylparaben, sodium ethylparaben, ethylparaben, sodium paraben, potassium methylparaben, calcium paraben		для суміші ефірів	
8	Бутилгідроксибензоат його солі (Butyl hydroxybenzoate and its salts) Пропілгідроксибензоат його солі (Propyl hydroxybenzoate and its salts)	4- та 4- and 4- та 4- and	Butylparaben, propylparaben, sodium propylparaben, sodium butylparaben, potassium butylparaben, potassium propylparaben		0,14% (кислота) для суми окремих концентрацій 0,8% (кислота) для сумішей речовин, зазначених у пунктах 12 та 12а, де сума індивідуальних концентрацій бутил- та пропілпарабену	Заборонено застосовувати в продукції, що не змивається, та призначена для застосування на пелюшках дітям до трьох років.
9	3-Ацетил-6-метилпіран-2,4(3Н)-діон (Дегідроцтова кислота та її солі) (3-Acetyl-6-methylpyran-2,4 (3H)-dione and its salts)		Dehydroacetic acid, sodium dehydroacetate		0,6 % (кислота)	Заборонено використання в аерозольних розпилювачах(спреях)
10	Ундециленова кислота		Undecylenic acid, potassium undecylenate, sodium		0,2 % (кислота)	

	(Undec-10-enoic acid and salts)	unde-cylenate, calcium undecylenate, TEA-undecylenate, MEA-undecylenate			
11	Гексетидин 5-піримідинамін, 1,3-біс(2-етилгексил)гексагідро-5-метил- (5-Pyrimidinamine, 1,3-bis(2-ethylhexyl)hexahydro-5-metyl-)	Гексетидин Hexetidine		0,1 %	
12	Бронопол (Bronopol)	2-бром-2-нітро-пропан-1,3-диол 2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol		0,1 %	Уникати утворення нітрозамінів
13	Триклозан 5-хлор-2-(2,4-діхлорфеноксі)фенол (5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol)	Triclosan	1)Зубні пасти, Мило для рук, Мило для тіла / Гелі для душу, Дезодоранти (без розпилення), Порошки для обличчя та дефекти, Нігтьові засоби для чищення нігтів до нанесення штучних	0,3%	

			НІГТЬОВИХ СИСТЕМ		
			2)Продукція для полоскання рота	0,2 %	
14	2-Феноксіетанол (2-Phenoxyethanol)	Феноксіетанол Phenoxyethanol		1,0%	
15	Бензиловий спирт (7) (Benzyl alcohol)	Benzyl alcohol		1,0%	
16	Хлоргексидин, його диглюконат, діацетат, дигідрохлорид (N,N''-біс(4- хлорфеніл)-3,12- дііміно-2,4,11,13- тетраазатетрадекан- діамідін та його диглюконат, діацетат та дигідрохлорид (N,N''-bis(4- chlorophenyl)-3,12- diimino-2,4,11,13- tetraazatetradecanedia midine and its digluconate, dia-cetate and dihydrochloride)	Chlorhexidine, Chlorhexidine Diacetate, Chlorhexidine Digluconate, Chlorhexidine Dihydrochloride		0,3%	
17	Гідроксиметиламіно- ацетат натрію (гідроксиметил- гліцинат натрію) (Sodium hydroxyme- thylamino acetate) (Sodium	Sodium Hydroxymethylglyci- nate		0,5%	

	hydroxymethylgly- cinate)				
18	Хлорид срібла (Silver chloride deposited on titanium dioxide)	Silver chloride		0,004% у перерахунку на AgCl	20 % AgCl, нанесений на діоксиді титану (TiO ₂) Заборонено у продукції для дітей віком до 3-х років, у продукції порожни ни рота, та у продукції для очей і губ
19	Бензалконій хлорид, бромід та сахаринат (10) (Benzalkonium chloride, bromide and saccharinate)	Benzalkonium chloride, benza- lkonium bromide, benzalkonium saccharinate		0,1% у розрахунку на бензалконій хлорид	Уникати потрапляння в очі
20	1,2,3- Propanetricarboxylic acid, 2-hydroxy-, monohydrate and 1,2,3- Propanetricarboxylic acid, 2-hydroxy-, silver(1+) salt, monohydrate	Citric acid (and) Silver citrate		0,2%, відповідно 0,0024% срібла	Не використовувати у продукції для порожнини рота та у продукції для губ

ДОДАТОК Г.1



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Розробка складу, технології та дослідження емульсійних засобів з допоміжними речовинами мікробного походження для застосування у дерматології.
2. **Установа, його адреса, виконавці:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра технології ліків і біофармації, 79010, м.Львів, вул. Пекарська, 75; аспірант Пелех-Бондарук І.Р.
3. **Джерело інформації:**
 1. Пелех І.Р., Білоус С.Б., Вільданова Р.І. Шульга О.М. Перспективи застосування поверхнево-активних речовин мікробного походження у складі лікарських та косметичних засобів. *Фармацевтичний часопис*. 2016. №1(37). С.108-112.
 2. Пелех І.Р., Ділай Н.В., Білоус С.Б., Вільданова Р.І. Шульга О.М. Дослідження біокомплексу PS як перспективного консерванта у складі лікарських та косметичних засобів. *ScienceRise: Pharmaceutical science*. 2017. №3(7). С.814.
 3. Пелех-Бондарук І.Р., Білоус С.Б., Шостак Т.А. Перспективи розвитку фармацевтичної біотехнології. "Проблеми та досягнення сучасної біотехнології": зб. матер. І міжнар. наук.-практ. інтернет-конференції, Харків, 2021, с.266
 4. Study of emulsion products stabilized with surfactants based on rhamnolipids *Pseudomonas* sp. PS-17 / Pelekh-Bondaruk I.R., Vildanova R.I., Kobylynska L.I., Bila Y.Y., Bilous S.B. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2022. № 14(2). P.315-318.
4. **Впроваджено:** Фрагменти досліджень включено у навчальний процес студентів 5-го курсу фармацевтичного факультету Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького при вивченні вибіркової дисципліни «Фармацевтична біотехнологія».
5. **Термін впровадження:** 2022/2023 н.р.
6. **Ефективність впровадження:** Результати наукових досліджень включено в навчальний процес кафедри з метою вдосконалення та оптимізації навчального процесу, зокрема розширення інформації про розробку допоміжних речовин методом мікробного синтезу.

Завідувач кафедри
технології ліків і біофармації
ЛНМУ імені Данила Галицького,
д.фарм.н., професор

С.Б. Білоус

ДОДАТОК Г.2

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор ЗВО

з науково-педагогічної (навчальної) роботи

Вінницького національного медичного

університету імені М. І. Пирогова

проф. Оксана СЕРЕБРЕННИКОВА



«1» листопада 2022 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: Розробка складу, технології та дослідження емульсійних засобів з допоміжними речовинами мікробного походження для застосування у дерматології.

2. Установа-розробник: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра технології ліків і біофармації, 79010, м.Львів, вул. Пекарська, 75; аспірант Пелех-Бондарук І.Р., д.фарм.н., проф. Білоус С.Б.

Джерела інформації:

1. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Сучасні підходи до застосування емульгаторів та консервантів у складі дерматологічних лікарських засобів. Фармацевтичний часопис. 2018. №3. С.52-57.
2. Pelekh-Bondaruk I.R., Vildanova R.I., Kobylinska L.I., Bila Y.Y., Bilous S.B. Study of emulsion products stabilized with surfactants based on rhamnolipids Pseudomonas sp. PS-17. International Journal of Applied Pharmaceutics. 2022. №14(2). p.315-318.
3. Revyatskyu I.Y., Pelekh-Bondaruk I.R., Bilous S.B. Modeling of the process of emulsifiers selecting in emulsion medicines and cosmetics. PharmacologyOnLine. 2022. №1. P.44-49.
4. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Дослідження нових допоміжних речовин біотехнологічного походження. Управління якістю в фармації: матер. XIV наук.-практ. конференції, 22 травня 2020, Харків, 2020. С. 119.

Базова установа, яка проводить впровадження: Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, кафедра фармації.

3. **Результати застосування** пропозиції за період з вересень–жовтень 2022 р. Матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри фармації на практичних заняттях.
4. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3):** Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо тем «М'які лікарські засоби».
5. **Зауваження, пропозиції:** не вносилися.
6. **Затверджено** на засіданні кафедри 02. 11. 2022 р. (протокол № 3).

Відповідальна за впровадження:

завідувач кафедри фармації,
д. фарм. н., проф.

Олена КРИВОВ'ЯЗ

ДОДАТОК Г.3

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор
з наукової роботи та інновацій
Національного медичного
університету імені О. О. Богомольця,
д. мед. наук, проф. С. В. Земсков



2022 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Розробка складу технології та дослідження емульсійних засобів з допоміжними речовинами мікробного походження для застосування у дерматології.
1. **Установа, його адреса, виконавці:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра технології ліків і біофармації, 79010, м.Львів, вул. Пекарська, 75; аспірант Пелех-Бондарук І.Р., д.фарм.н., проф. Білоус С.Б.
2. **Джерело інформації:**
 1. Pelekh-Bondaruk I.R., Vildanova R.I., Kobylinska L.I., Bila Y.Y., Bilous S.B. Study of emulsion products stabilized with surfactants based on rhamnolipids Pseudomonas sp. PS-17. International Journal of Applied Pharmaceutics. 2022. №14(2). p.315-318.
 2. Пелех І.Р., Ділай Н.В., Білоус С.Б., Вільданова Р.І. Шульга О.М. Дослідження біокомплексу PS як перспективного консерванта у складі лікарських та косметичних засобів. ScienceRise: Pharmaceutical science. 2017. №3(7). С.814.
 3. Пелех-Бондарук І.Р., Білоус С.Б., Шостак Т.А. Перспективи розвитку фармацевтичної біотехнології // *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології*: матер. І міжнар. наук.-практ. інтернет-конференції, 25 березня 2021, Харків, 2021. С. 266.
 4. Revyatsky I.Yu., Pelekh-Bondaruk I.R., Bilous S.B. Modeling of the process of emulsifiers selecting in emulsion medicines and cosmetics. PharmacologyOnline. Newsletter. 2021. Vol. 3: 139-150.
3. **Впроваджено:** У навчальний процес кафедри аптечної та промислової технології ліків при вивченні теми з технології ліків «Сучасні аспекти виробництва ліків» згідно протоколу №1 засідання кафедри від 29.08.2022 р.
4. **Термін впровадження:** 2021-2022 навчальний рік
5. **Ефективність впровадження:** Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведених у джерелах інформації. Результати наукових досліджень включено в навчальний процес кафедри при вивченні дисципліни «Технологія ліків» з метою розширення інформації про сучасні аспекти виробництва лікарських засобів.

Завідувачка кафедри аптечної та
промислової технології ліків
Національного медичного університету
ім. О.О. Богомольця, д.фарм.н., проф.

Ж.М. Полова

ДОДАТОК Г.4



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Розробка складу, технології та дослідження емульсійних засобів з допоміжними речовинами мікробного походження для застосування у дерматології.
1. **Установа, його адреса, виконавці:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра технології ліків і біофармації, 79010, м.Львів, вул. Пекарська, 75; аспірант Пелех-Бондарук І.Р., д.фарм.н., проф. Білоус С.Б.
2. **Джерело інформації:**
 1. Пелех І.Р., Білоус С.Б., Вільданова Р.І. Шульга О.М. Перспективи застосування поверхнево-активних речовин мікробного походження у складі лікарських та косметичних засобів. Фармацевтичний часопис. 2016. №1(37). С.108-112.
 2. Pelekh-Bondaruk I.R., Vildanova R.I., Kobylinska L.I., Bila Y.Y., Bilous S.B. Study of emulsion products stabilized with surfactants based on rhamnolipids *Pseudomonas* sp. PS-17. International Journal of Applied Pharmaceutics. 2022. №14(2). p.315-318
 3. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Сучасні підходи до застосування емульгаторів та консервантів у складі дерматологічних лікарських засобів. Фармацевтичний часопис. 2018. №3. С.52-57.
 4. Пелех-Бондарук І.Р., Білоус С.Б. Дослідження стійкості емульсій, стабілізованих біокомплексом PS. Відкриваємо нове сторіччя: здобутки та перспективи: матер. науково-практичної конф. з міжн. участю, присвяченої 100-річчю національного фармацевтичного університету, 10 вересня 2021, Харків, 2021. С. 99-100.
3. **Впроваджено:** У навчальний процес кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології при вивченні дисципліни “Технологія і застосування лікувально-косметичних засобів ” у темі “Основні інгредієнти лікувально-косметичних засобів”.
4. **Термін впровадження:** 2022 навчальний рік
5. **Ефективність впровадження:** Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, наведених у джерелах інформації. Результати наукових досліджень включено в навчальний процес кафедри.

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри технології біологічно
активних сполук, фармації та біотехнології
Інституту хімії та хімічних технологій
д.х.н, професор

 Лубенець В.І.

ДОДАТОК Г.5

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор

з науково-педагогічної роботи

Тернопільського національного
медичного університету

ім. І.Я.Горбачевського

проф. А.Г.Шульга



2022 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Розробка складу, технології та дослідження емульсійних засобів з допоміжними речовинами мікробного походження для застосування у дерматології.
2. **Установа, його адреса, виконавці:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра технології ліків і біофармації, 79010, м.Львів, вул. Пекарська, 75; аспірант Пелех-Бондарук І.Р., д.фарм.н., проф. Білоус С.Б.
3. **Джерело інформації:**
 1. Пелех І.Р., Білоус С.Б., Вільданова Р.І. Шульга О.М. Перспективи застосування поверхнево-активних речовин мікробного походження у складі лікарських та косметичних засобів. Фармацевтичний часопис. 2016. №1(37). С.108-112.
 2. Пелех І.Р., Ділай Н.В., Білоус С.Б., Вільданова Р.І. Шульга О.М. Дослідження біокомплексу PS як перспективного консерванта у складі лікарських та косметичних засобів. ScienceRise: Pharmaceutical science. 2017. №3(7). С.814.
 3. Пелех І.Р., Білоус С.Б. Сучасні підходи до застосування емульгаторів та консервантів у складі дерматологічних лікарських засобів. Фармацевтичний часопис. 2018. №3. С.52-57.
 4. Pelekh-Bondaruk I.R., Vildanova R.I., Kobylinska L.I., Bila Y.Y., Bilous S.B. Study of emulsion products stabilized with surfactants based on rhamnolipids Pseudomonas sp. PS-17. International Journal of Applied Pharmaceutics. 2022. №14(2). p.315-318.
4. **Впроваджено:** У навчальний процес кафедри управління та економіки фармації з технологією ліків при вивченні теми з промислової технології лікарських засобів “Виробництво новітніх лікарських засобів”.
5. **Термін впровадження:** 2022 рік.
6. **Ефективність впровадження:** Результати наукових досліджень включено в навчальний процес кафедри з метою вдосконалення та оптимізації навчального процесу, зокрема розширення інформації про розробку лікарських засобів з допоміжними речовинами мікробного походження.

Завідувач кафедри
управління та економіки фармації
з технологією ліків
Тернопільського національного
медичного університету
ім. І.Я.Горбачевського,
д.фарм.н., професор

Т. А. Грошовий

ДОДАТОК Г.6

“ЗАТВЕРДЖУЮ”
 Директор ТОВ Е.Д.Косметікс
 “16” грудня 2022 року



**Акт апробації технології емульсійних засобів
 стабілізованих біокомплексом PS**

За результатами проведених експериментів шляхом включення біокомплексу PS як співемульгатора та консерванта до складу дослідних зразків основ для кремів типу масло/вода, встановлено повну відповідність результатів досліджень, проведених аспірантом Пелех-Бондарук І.Р. і проф. Білоус С.Б. у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького, щодо емульгуючих концентрацій та консервуючої здатності біокомплексу PS.

Джерела інформації:

1. Пелех І.Р., Ділай Н.В., Білоус С.Б., Вільданова Р.І. Шульга О.М. Дослідження біокомплексу PS як перспективного консерванта у складі лікарських та косметичних засобів. ScienceRise: Pharmaceutical science. 2017. №3(7). С.814.
2. Pelekh-Bondaruk I.R., Vildanova R.I., Kobylynska L.I., Bila Y.Y., Bilous S.B. Study of emulsion products stabilized with surfactants based on rhamnolipids Pseudomonas sp. PS-17. International Journal of Applied Pharmaceutics. 2022. №14(2). p.315-318.

Результати апробації визначають можливість застосування нового допоміжного інгредієнта біокомплексу PS у складі засобів натуральної доглядової косметики марки ED Cosmetics та доцільність включення у перспективний план розвитку виробництва.

Від EDCosmetics:

Менеджер (управитель) зі збуту



Кулакевич Т.С.

Від ЛНМУ імені Данила Галицького:

Завідувач кафедри технології ліків і біофармації



Білоус С.Б.

Аспірант

Пелех-Бондарук І.Р.