



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102426** (13) **C2**  
(51) МПК (2013.01)  
**A61K 31/196** (2006.01)  
**A61K 31/352** (2006.01)  
**A61P 29/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2011 10319**  
(22) Дата подання заявки: **23.08.2011**  
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.07.2013**  
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.02.2013, Бюл.№ 4**  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.07.2013, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):  
**Безпалько Людмила Василівна (UA),**  
**Тищенко Руслан Олексійович (UA),**  
**Кобилінська Валентина Іванівна (UA),**  
**Сова Євген Олександрович (UA),**  
**Зупанець Ігор Альбертович (UA),**  
**Шебеко Сергій Костянтинович (UA),**  
**Русскін Олександр Сергійович (UA),**  
**Макітрук Василь Лукич (UA),**  
**Шаламай Анатолій Севастьянович (UA)**

(73) Власник(и):  
**Безпалько Людмила Василівна,**  
вул. Суворова, 23, кв. 1, м. Ірпінь, Київська  
обл., 08200 (UA),  
**Шаламай Анатолій Севастьянович,**  
вул. Васильківська, 6-а, Новосілки, м. Київ,  
03027 (UA)

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
UA 52461 A, 16.12.2002  
UA 3083 U, 15.10.2004  
Модуляція антиоксидантної активності диклофенаку натрію при його комбінації з гастропротекторними препаратами in vitro / Н.Г. Чорноіван, Г. І. Степанюк, Т. А. Бухтіарова, І. Ф. Бєленічев, С. В. Павлов, В. В. Гриб // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2010. – 16, N 3. – С. 55-60  
UA 79072 C2, 25.05.2007

**(54) ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ З ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ, КАРДІО- ТА ХОНДРОПРОТЕКТНОЮ АКТИВНІСТЮ ТА ДІЄЮ ПРОТИ НПЗП-ГАСТРОПАТІЙ****(57) Реферат:**

Винахід стосується фармацевтичної композиції з протизапальною, кардіо- та хондропротекторною активністю, дією проти гастропатій, що викликаються нестероїдними протизапальними засобами, яка містить диклофенак натрію в кількості 5-25 %, кверцетин у формі дигідрату або безводної субстанції в кількості 10-40 %, полівінілпіролідон в кількості 10-50 %, лаурилсульфат натрію в кількості 0,25-10 %, мікрокристалічну целюлозу в кількості 20-40 %, кроскармелози натрієву сіль в кількості 1-15 % та стеарат магнію в кількості 0,25-5,0 % у розрахунку на загальну масу композиції.

**UA 102426 C2**



Винахід належить до фармації та медицини і стосується фармацевтичної композиції з протизапальною, кардіо- та хондропротекторною активністю, дією проти гастропатій, які викликаються нестероїдними протизапальними препаратами (НПЗП), та способів її отримання, яка може бути використана для профілактики й лікування запально-деструктивних захворювань різних систем та органів.

Відомо, що НПЗП на фармацевтичному ринку України є найчисельнішою фармако-терапевтичною групою, яка охоплює більше 250 препаратів в різних лікарських формах [1] При визнаній терапевтичній ефективності НПЗП, їх застосування має ряд обмежень, які пов'язані з частими проявами побічної дії. Для прикладу, навіть нетривале лікування цими препаратами може привести до 25 % випадків побічної дії і, в тому числі, до 5 % - серйозної загрози для життя [2].

Незважаючи на значний асортимент НПЗП фармакологічна та фармацевтична наука продовжує інтенсивний пошук зі створення нових більш ефективніших та значно безпечніших лікарських засобів цієї фармако-терапевтичної групи. В цих дослідженнях часто за мету ставляться розробки оригінальних субстанцій з принципово новими механізмами фармакологічної дії, модифікації структури молекул відомих нестероїдних протизапальних субстанцій або розробка їх готових лікарських форм з новими фармацевтичними властивостями. Досить перспективними є пошуки зі створення комбінованих лікарських форм НПЗП з іншими фармакологічно активними сполуками [1].

Відкриття основних факторів фармакологічної дії НПЗП - двох ізоформ циклооксигенази (ЦОГ), а саме ЦОГ-1 та ЦОГ-2, в свій час, ініціювало створення препаратів нового покоління - селективних та специфічних інгібіторів ЦОГ-2 [2, 3]. Однак, сучасна медична практика з різних причин все ж таки віддає перевагу відомих препаратів цієї фармако-терапевтичної групи. Тому найбільш визнаними НПЗП залишаються лікарські форми диклофенака, індометацина, ібупрофена та інших, які є добре вивченими за своєю терапевтичною ефективністю та побічною дією.

З метою розширення терапевтичних можливостей відомих НПЗП та запобігання побічних ефектів важливим є пошук шляхів модифікації їх лікарських форм. Широкого терапевтичного застосування в медичній практиці при лікуванні багатьох хвороб знайшли препарати диклофенака натрію (ДН), які при значній лікувальній ефективності, на жаль, супроводжуються побічною дією, насамперед, проявами алергічних реакцій та, так званими, НПЗП-гастропатіями, що сумарно можуть складати до 85 % випадків. Навіть нетривале застосування невеликих доз препаратів НПЗП і, в тому числі ДН, може приводити до серйозних загрозливих порушень стану здоров'я. В таких випадках необхідно припинити застосування НПЗП та проводити корегуючу терапію. Препарати ДН створювались з метою зменшення проявів НПЗП-гастропатій у різних лікарських формах, проте це не вирішило проблему усунення їх гастротоксичності. Протизапальна дія ДН пов'язана з пригніченням синтезу простагландинів (ПГ) шляхом блокади ключового ферменту метаболізму арахідонової кислоти циклооксигенази (ЦОГ). Відомі ізоформи ЦОГ: ЦОГ-1, ЦОГ-2 та ЦОГ-3 виконують різну регуляторну роль в синтезі ПГ. Так, ЦОГ-1 контролює напрацювання ПГ, який забезпечує нормальне функціонування активних молекул клітини, синтез тромбоцитами тромбосану А2, ендотеліальними клітинами та клітинами слизової оболонки шлунку простациклінів, ПГ Е2 та ін. ЦОГ-2 приймає участь в напрацюванні ПГ, які відповідають за процеси запалення, клітинної проліферації, деструкції клітин, мітогенезу та ін. У більшості клітин базальний рівень ЦОГ-2 досить незначний, проте експресія гена ЦОГ-2 здатна різко збільшуватися (більше ніж у 50 разів) внаслідок розвитку запалення. Протизапальна активність НПЗП має прямий зв'язок з інгібуванням ЦОГ-2, тоді як пригнічення ЦОГ-1 зумовлює розвиток побічних ефектів. Наведений узагальнений механізм дії всіх НПЗП стосується і зокрема ДН, протизапальні ефекти та побічна дія якого описуються тими ж складовими та принципово схожими механізмами.

Відомими "класичними брендовими" препаратами диклофенака є лікарські засоби з торговою назвою Вольтарен® концерну Novartis Pharma в різних дозах та в різних лікарських формах. [4]. Препаратом швидкої дії є Вольтарен® рапід, таблетки вкриті цукровою оболонкою, 25 та 50 мг, №30, з активною речовиною диклофенака калію. Швидке досягнення препаратом анальгезії, зниження запалення та жару настає завдяки достатньо високої розчинності калієвої солі, позаяк забезпечується швидке створення достатньої терапевтичної концентрації активної речовини в крові. При досить високих терапевтичних показниках ефективності засобу Вольтарен® рапід в застереженнях до застосування увага акцентується на можливих випадках гастропатій, тобто виникнення шлунково-кишкових кровотеч або розвитку виразок в органах ШКТ навіть при відсутності в анамнезі пептичних виразок.

Відома також фармацевтична композиція, що містить нестероїдний протизапальний засіб, сполуку для посилення його фармакологічної дії, зниження токсичності і побічних ефектів, та цільові добавки (Патент України № 79072, МПК: А61 К31/35, А61 К 31/616, А61 Р 29/00, 2007). Як агенти, що посилюють фармакологічну дію НПЗП і знижують їх токсичність і побічні ефекти використано, зокрема поліфенольні сполуки рослинного, навіть кверцетин, або тваринного походження вибрані із групи двохосновних карбонових кислот чи їх солей або амінокислот чи їх солей. Ці сполуки входять до складу фармацевтичної композиції разом з НПЗП, . Проте зазначена композиція не забезпечує високої протизапальної, кардіо-, хондропротекторної активності в поєднанні з мінімальним впливом на НПЗП-гастропатії.

Відомий спосіб отримання фармацевтичної композиції, що містить диклофенак (патент РФ № 2424793, МПК А61К9/70, А61К31/195, А61Р29/00, 2011), полягає у включенні ДН в композитну полімерну плівку. ДН попередньо рівномірно диспергують в суміші з набором допоміжних речовин, включаючи гідроксипропілметилцелюлозу, яка виконує функції харчової полімерної плівки. Фармацевтична композиція, одержувана таким способом у вигляді жувальної плівки сприяє швидкому вивільненню дисперсії ДН в порожнині рота пацієнта. Фармако-терапевтичні можливості фармацевтичної композиції ДН у вигляді харчової плівки досить обмежені, оскільки вона призначена виключно тільки для зручного перорального застосування і ніяк не вирішує проблеми НПЗП-гастропатій.

Відомий також спосіб лікування ерозивно-виразкових ускладнень шлунку та дванадцятипалої кишки, викликаних ДН у хворих на остеатроз, що включає введення препарату ДН та як протекторного засобу препарату Гранул кверцетину (Патент України №3903, МПК:, 2009 р.). Препарат Гранули кверцетину (виробництва НВЦ "Борщагівський хімфармзавод") містить 40 мг активної речовини - кверцетину, в 1г гранул і його призначають додатково після введення ДН у дозі 1-2 г тричі на день до прийому їжі тим же курсом, що й ДН.

Відомі фармацевтичні композиції, спосіб їх отримання та спосіб лікування, на жаль, не забезпечують високої протизапальної, кардіо- та хондропротекторної дії, не виявляють суттєвого впливу на НПЗП-гастропатії.

В основу винаходу покладено задачу створення такої фармацевтичної композиції з протизапальною, кардіо - та хондропротекторною активністю, дією проти НПЗП-гастропатій та способу її отримання, в якому з введенням нових інгредієнтів та нового їх кількісного складу в фармацевтичній композиції, при застосуванні нових технологічних операцій в способі її отримання, забезпечувалась би висока протизапальна, кардіо-, хондропротекторна дія та максимальний вплив проти НПЗП-гастропатій.

Поставлена задача досягається тим, що фармацевтична композиція з протизапальною, кардіо- та хондропротекторною активністю, а також з дією проти НПЗП-гастропатій, містить НПЗП та сполуку для посилення його фармакологічної дії, зниження його токсичності і побічних ефектів - кверцетин, а також цільові добавки. Згідно з винаходом, НПЗП ДН, додатковим протизапальним агентом є кверцетин та як цільові добавки солюбілізатор полівінілпіролідон та поверхнево-активна речовина - лаурилсульфат натрію являються основними компонентами фармацевтичної композиції та при певних технологічних операціях внаслідок механо-хімічної взаємодії утворюють комплекс з встановленими фармацевтичними та фармакологічними властивостями.

При цьому у фармацевтичній композиції ДН міститься в кількості від 10,0 до 25,0 %.

При цьому кверцетин, як дигідрат чи безводна субстанція, міститься в кількості від 10,0 до 40,0 %

Крім того, як цільові добавки як солюбілізатор вибрано полівінілпіролідон в кількості 10,0-50,0 % та поверхнево-активна речовина - лаурилсульфат натрію 0,25-5,0 % в розрахунку на загальну масу композиції.

При цьому фармацевтична композиція додатково містить один або декілька фармацевтично прийнятних наповнювачів.

При цьому наповнювач містить щонайменше один зв'язуючий агент, один розпушувач, один змащуючий агент та один поверхнево активний агент.

При цьому як зв'язуючий агент вибрано мікрокристалічну целюлозу в загальній кількості 10,0-65,0 %.

При цьому як розпушувач вибрано кроскармелози натрієву сіль в загальній кількості 1,0-15,0 %.

При цьому як змащуючий агент вибрано стеарат магнію в загальній кількості 0,25-5,0 %.

Крім того фармацевтична композиція виконана у формі таблеток або капсул.

Поставлена задача досягається також тим, що в способі отримання фармацевтичної композиції з протизапальною, кардіо- та хондропротекторною дією, а також з дією проти НПЗП-

гастропатій, згідно з винаходом, попередньо ДН, кверцетин та цільові добавки змішують, компактують, розмелюють, отриману суміш змішують з фармацевтично прийнятними наповнювачами, або проводять суху або вологу грануляцію суміші, після того гранулятом наповнюють тверді желатинові капсули чи пресують і таблетки покривають полімерною плівкою.

5 Згідно з винаходом розроблений спосіб дозволяє отримувати фармацевтичною композицією в лікарських формах таблеток вкритих плівковою оболонкою або капсули, що містять її складові компоненти у таких кількісних межах, в %:

Диклофенак натрію	10,0-25,0
Кверцетин	10,0-40,0
Наповнювачі	до 100.

Обидві активні речовини нового лікарського засобу поєднувались у ньому з урахуванням знань про їх фармакологічні та лікувальні властивості, отриманні при застосуванні монопрепаратів на основі їх субстанцій.

10 Підібрані цільові добавки, в силу своїх фізико-хімічних властивостей, сприяють солюбілізації активних субстанцій та їх досить високому розчиненню у водному фізіологічному середовищі шлунково-кишкового тракту.

Протизапальна дія кверцетину має дещо нетрадиційний механізм, в основі якого лежить виражена антилейкотрієнова активність. Разом з тим слід зазначити, що фармакологічна дія кверцетину має багато інших позитивних властивостей, що дозволяє прогнозувати його незамінність в корекції запального процесу та доречність в складі композиційного препарату з ДН. Доцільність застосування кверцетину, з врахуванням його фармакодинаміки, в такому новому лікарському засобі - очевидна.

20 Механізм протизапальної дії кверцетину схематично зводиться до інгібування 5-ліпоксигенази (ЛОГ-5) - ключового ферменту біотрансформації арахідонової кислоти за ліпоксигеназним шляхом метаболізму. Біохімічна трансформація арахідонової кислоти закінчується утворенням кінцевих продуктів - лейкотрієнів, які і обумовлюють виникнення запальних процесів. Таким чином, блокування кверцетином подальшої стадії синтезу лейкотрієнів забезпечує гальмування цих негативних процесів. Разом з тим, для лейкотрієнів характерними є зниження інтенсивності кровопостачання органів, активація процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та ін. [5,6].

25 Кверцетину властива ангіопротекторна, судинорозширююча, протизапальна, гепатопротекторна, жовчогінна дія. Він здатний знижувати інтенсивність процесів вільнорадикального окислення ліпідів, протеїнурії, гіперглікемії і також проявляти гіпоазотемічну та діуретичну дію [7-9].

Кверцетин завдяки антилейкотрієновій активності упереджує ушкодження ендотелію судин ішемізованої ділянки та зменшує постішемичні порушення мікроциркуляції - патологічні стани, які мають місце з участю лейкотрієнів [10-12].

35 Кверцетин, на відміну від традиційних НПЗП, не тільки не проявляє ульцерогенної дію, але й навпаки, створює гастропротектний ефект завдяки здатності пригнічувати функціонування H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-АТФ-ази (зниження синтезу соляної кислоти). Він також здатний стимулювати напрацювання клітинами слизової оболонки шлунку цитопротекторного простагландину E<sub>2</sub> та зменшувати кількість активних форм кисню в тканині шлункової стінки [6].

40 Комбінований препарат ДН з кверцетином - невідомий. Поєднання в лікарській формі цих двох активних речовин з різними фізико-хімічними властивостями є досить складним завданням для фармації. Вирішення поставленої задачі в технічному плані здійснювалось послідовними операціями розробки технології виготовлення фармацевтичної композиції та у відповідності з фармакопейними методами її дослідження.

45 Насамперед, фармацевтична розробка фармацевтичної композиції розпочиналась з оцінки фізико-хімічних властивостей ДН та кверцетину і, насамперед, орієнтуючись на їх здатність розчинятись у водних середовищах з тим, щоб ці активні речовини мали максимальну біодоступність при пероральному застосуванні лікарського засобу у фізіологічних умовах шлунку.

50 Досягти високої розчинності обох субстанцій можливо тільки при застосуванні допоміжних речовин з властивостями солюбілізаторів. Такими модуляторами розчинності є полівінілпіролідони (повідони, ПВП) та лаурилсульфат натрію (ЛСН), кількісні величини їх введення в фармацевтичну композицію було визначено при фармацевтичній розробці складу, орієнтуючись на профілі розчинності зразків, виконуючи тест "Розчинність". Досліджуючи кінетику розчинення зразків фармацевтичної композиції, як грануляту в капсулі так і таблеток, при змінних масових величинах ПВП та ЛСН було встановлено оптимальне їх співвідношення з кверцетином. Відомо, що в силу особливості кристалічної структури кверцетину розчинність

його субстанції дуже низька (1 мг в 100 мл води). Комплексування його з ПВП шляхом механо-хімічної взаємодії, тобто пресуванням початкового грануляту (компактування) дозволило підвищити розчинність біофлаваноїда до 200 мг в 100 мл води. Таким чином, отриманий комплекс кверцетину з ПВП практично однаково розчиняється у водних розчинах з різними показниками рН, які за фармацевтичними вимогами імітують фізіологічне середовище організму. Результати співрозчинності кверцетину з різними марка ПВП представлено графіком 1 (фіг.1).

Для забезпечення фізико-хімічної стабільності комплексу вагове співвідношення між кверцетином та ПВП має знаходитись в межах 1:1-1:3. Слід зазначити, що ці масові величини ПВП також є достатніми для підвищення розчинності субстанції ДН внаслідок утворення відповідної комплексної сполуки. Ці повідони за молекулярними масами відрізняються таким чином: K90-1 000 000; K25-30 000; C17-10 000.

Враховуючи характеристики кінетики розчинення комплексу кверцетину з ПВП була підібрана достатня кількість ЛСН - поверхнево-активної речовини, яка сприяє швидкому та рівномірному змочуванню поверхні комплексного грануляту. Це сприяє прискоренню розчинення комплексу в початковий час і, таким чином, дозволяє створити оптимальні умови для всмоктування стінками шлунку розчинної форми кверцетину. При значній гідрофобності поверхні кристалів ДН ці вибрані допоміжні речовини - ПВП та ЛСН, також сприяють розчинності цієї субстанції, а тим самим підвищенню біодоступності цього НПЗП. Розчинність кверцетину та його композитів з ПВП та ЛСН з часом наведено на графіку 2 (фіг.2).

Всі зразки фармацевтичної композиції, починаючи з комплексу активних речовин - кверцетину і ДН з ПВП і ЛСН, отримували в умовах послідовних технологічних операцій шляхом сухою або вологою грануляції інгредієнтів комплексу та допоміжних речовин. Приготовані гранули застосовувалися для наповнення капсул або їх таблетували і досліджували розчинність цих лікарських форм відповідно до фармакопейним тестом "Розчинення". Характеристики розчинності ДН та кверцетину у фармацевтичній композиції свідчили про значно більш високу розчинність цих активних інгредієнтів порівняно з розчинністю індивідуальних субстанцій. Таким чином, в ході фармацевтичної розробки був виготовлений зразок фармацевтичної композиції, визначеного складу (див. Табл. 1), названий авторами "Диклокор", який знайшов застосування в дослідженнях фармакологічних властивостей.

Характеристики розчинності ДН та кверцетину у фармацевтичній композиції свідчили про значно більш високу розчинність комплексу активних інгредієнтів порівняно з розчинністю індивідуальних субстанцій. Таким чином, в ході фармацевтичної розробки був виготовлений зразок фармацевтичної композиції, названий авторами винаходу "Диклокор", який знайшов, як препарат певного складу, застосування в дослідженнях токсико-фармакологічних властивостей.

Таблиця 1

Склад і співвідношення інгредієнтів на одну капсулу фармацевтичної композиції Диклокор чи таблетку

№ п/п	Найменування інгредієнтів	мг	%
1	2	3	4
1.	Кверцетин	40,00	20,00
2.	Полівінілпіролідон K-25	40,00	20,00
3.	Диклофенак натрію	25,00	12,50
4.	Целюлоза мікрокристалічна	80,00	40,00
5.	Кроскармелоза натрію	10,00	5,00
6.	Лаурилсульфат натрію	3,00	1,50
7.	Магнію стеарат	2,00	1,00
Вміст капсули чи ядра таблетки:		200,00	100,00

Фармацевтична композиція наведеного складу отримується за технологією сухої грануляції, яка включає змішування активних речовин з наповнювачами, гранулюванням суміші на компактері або брикетуванням, змішування грануляту з наповнювачами та пресування суміші у таблетки або наповнення нею твердих желатинових капсул; або технологією вологої грануляції, яка відрізняється стадією гранулювання суміші, де замість компактера або преса використовується обладнання для вологої грануляції та сушарка, таке як гранулятор - змішувач з мішалками або гранулятор-сушарка псевдокиплячого шару.

Наводимо конкретні приклади здійснення винаходу, які ілюструють аспекти даного винаходу, але не повинні розглядатися як такі, що мають обмежувальне значення.

Приклад 1. Наважки субстанцій кверцетину, диклофенаку натрію, полівінілпіролідону (поліпласдон К-25) та лаурилсульфату натрію змішують в грануляторі і пресують за допомогою компактеру, отриману брикетовану суміш розмелюють в млині, просіюють і до отриманого грануляту в грануляторозмішувачі додають раніш приготовану суміш з целюлози мікрокристалічної та кроскармелози натрієвої солі, після 2-3-х годин змішування гранулят опудрюють магнію стеаратом протягом 30 хвилин. Отриманий гранулят передають на наповнення желатинових капсул чи на таблетування. Таким чином отримують зразок фармацевтичної композиції наведений в таблиці 2. Ядра таблеток вкривають готовою сумішшю Colorcon Opadry II.

Таблиця 2

Склад і співвідношення інгредієнтів  
фармацевтичної композиції на одну капсулу чи таблетку

№ п/п	Найменування інгредієнтів	мг	%
1	2	3	4
1.	Кверцетин	40,00	17,02
2.	Полівінілпіролідон К-25	80,00	34,04
3.	Диклофенак натрію	25,00	10,63
4.	Целюлоза мікрокристалічна	71,85	30,57
5.	Кроскармелози натрієва сіль	13,00	5,53
6.	Лаурилсульфат натрію	3,0	1,27
7.	Магнію стеарат	2,15	0,91
Вага капсули чи ядра таблетки:		235,00	100,00

Тести "Розпадання", "Розчинення" та "Рівномірність дозування" виконуються у відповідності до ДФУ.

Приклад 2. Субстанції кверцетину, диклофенаку натрію, полівінілпіролідону (поліпласдон К-25) та лаурилсульфат натрію переносять в гранулятор-змішувач типу Rota P, додають целюлозу мікрокристалічну та кроскармелози натрієву сіль, суміш перемішують протягом 30 хвилин, до неї поступово при перемішуванні додають достатню кількість води очищеної, вологий гранулят перемішують протягом 2-х годин при кімнатній температурі. Сушка грануляту здійснюється в вакуумі, включивши обігрів протягом 3-4 години. Сухий гранулят опудрюють магнію стеаратом протягом 40 хвилин. Готовий гранулят далі застосовують для виготовлення готових лікарських форм. Таким чином, отримують зразок фармацевтичної композиції, склад якої наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Склад і співвідношення інгредієнтів  
фармацевтичної композиції на одну капсулу чи таблетку

№ п/п	Найменування інгредієнтів	мг	%
1	2	3	4
1.	Кверцетин	40,00	13,33
2.	Полівінілпіролідон К-25	140,00	46,67
3.	Диклофенак натрію	25,00	8,33
4.	Целюлоза мікрокристалічна*	65,50	21,83
5.	Кроскармелоза натрію	21,00	7,00
6.	Лаурилсульфат натрію	5,00	1,67
7.	Магнію стеарат	3,50	1,17
Вага капсули чи ядра таблетки		300,00	100,00

Приклад 3. Суміш субстанцій кверцетину, диклофенаку натрію, полівінілпіролідону (поліпласдон К-25) та лаурилсульфату натрію переносять в гранулятор-сушарку псевдокиплячого шару типу Huttling. Суміш за допомогою стисненого очищеного повітря

- перемішують протягом 30 хвилин, потім додають целюлозу мікрокристалічну та кроскармелози натрієву сіль і перемішують протягом 30 хвилин. Сухий гранулят зволожують при інтенсивному перемішуванні з поступовим розбризкуванням достатньої кількості води очищеної. Подаючи підігріте повітря гранулят перемішують протягом 2-х годин і потім опудрюють магнію стеаратом при перемішуванні протягом 30 хвилин. Отриманий гранулят далі застосовують за призначенням. Таким чином, отримують зразок фармацевтичної композиції наведений в таблиці 4.

Таблиця 4

Склад зразку фармацевтичної композиції отриманий за прикладом 3

№п/п	Найменування інгредієнтів	мг	%
1.	Кверцетин	40,00	16,67
2.	Полівінілпіролідон К-25	40,00	16,67
3.	Диклофенак натрію	50,00	20,83
4.	Целюлоза мікрокристалічна	92,00	38,33
5.	Кроскармелози натрієва сіль	15,00	6,25
6.	Магнія стеарат	2,00	0,83
7.	Лаурилсульфат натрію	6,00	2,50
Вага капсули чи ядра таблетки		245,0	100,0

- Приклад 4. До отриманого за прикладом 1 компактованого грануляту субстанцій кверцетину, диклофенаку натрію, полівінілпіролідону та лаурилсульфату натрію в гранулятор-сушарці псевдокиплячого шару типу Huttling додають з інтервалом 30-40 хвилин послідовно з інтенсивним перемішуванням кроскармелози натрієву сіль та целюлозу мікрокристалічну, а в кінці магнію стеарат. Отриманий гранулят передають на виготовлення капсул чи таблеток.

Таблиця 5

Склад зразку фармацевтичної композиції отриманий за прикладом 4

№ п/п	Найменування інгредієнтів	мг	%
1	2	3	4
1	Кверцетин	60,00	24,00
2	Полівінілпіролідон К-25	50,00	20,00
3	Диклофенак натрію	25,00	10,00
4	Целюлоза мікрокристалічна	92,00	36,80
5	Кроскармелози натрієва сіль	16,00	6,40
6	Магнія стеарат	2,00	0,80
7	Лаурилсульфат натрію	5,00	2,00
Вага капсули чи ядра таблетки		250,0	100,0

- Доклінічне вивчення фармацевтичної композиції здійснювалось при застосуванні зразка Диклокора в тестах дослідження з метою встановлення в повному об'ємі токсико-фармакологічних властивостей як майбутнього препарату, який може стати перспективним лікарським засобом.

- Приклад 5. Дослідження гострої токсичності Диклокору при пероральному введенні. Експериментальні дослідження проводились за методом В. Б. Прозоровського [13] в діапазоні доз 500-1500 мг/кг за сумою діючих речовин при внутрішньошлунковому введенні Диклокору мишам та щурам. Спостереження за тваринами проводились протягом двох тижнів після введення препарату. Результати дослідження наведені у таблиці 6.



Таблиця 6

Показники летальності при вивченні гострої токсичності Диклокору (n=72)

Доза мг/кг	Летальний ефект, загибель тварин/кількість тварин		Середня летальність, %	
	миші	щурі	миші	щурі
500	0/6	0/6	0	0
700	1/6	1/6	16,7	16,7
900	2/6	3/6	33,3	50,0
1100	3/6	4/6	50,0	66,6
1300	4/6	5/6	66,7	83,3
1500	6/6	6/6	100	100

Середньолетальну дозу Диклокору розраховували на підставі залежності рівня летальності від використаної дози методом пробіт-аналізу [13]. У результаті розрахунків було визначено, що  $LD_{50}$  Диклокору для мишей складає  $1051,3 \pm 52,5$  мг/кг ( $404,2$  мг/кг за ДН), та для щурів -  $952,5 \pm 45,2$  мг/кг ( $366,5$  мг/кг за ДН). З урахуванням того, що згідно даних літератури показник гострої токсичності ДН для мишей при пероральному введенні складає  $172-370$  мг/кг [14-16], а для щурів  $53-95$  мг/кг [17-19], отримані дані свідчать про виражене зниження токсичності ДН досліджуваного препарату завдяки його поєднанню з кверцетином в одній лікарській формі. Таким чином, результати вивчення токсикологічних характеристик Диклокору у мишей та щурів дозволяють віднести даний засіб згідно загальноприйнятої класифікації токсичності К. К. Сидорова до класу малотоксичних речовин ( $501$  мг/кг  $< LD_{50} < 5000$  мг/кг).

Приклад 6. Дослідження середньоелементарних доз Диклокору в умовах розвитку експериментального запалення.

Вивчення середньоелементарних доз Диклокору проводили на моделі карагенінового набряку кінцівок у щурів [14], з використанням препарату у дозах  $5$ ,  $10$  та  $20$  мг/кг за сумою діючих речовин, що відповідає приблизно  $1/200$ ,  $1/100$  та  $1/50$  показнику  $LD_{50}$ . Показник  $ED_{50}$  визначали методом пробіт-аналізу залежності "активність-доза" станом на  $3$  години після введення флогогену [13]. Результати дослідження наведено в таблиці 7.

Таблиця 7

Вплив Диклокору на перебіг карагенінового набряку стопи у щурів через  $3$  години після введення флогогену (n=40)

Дослідна група	Доза, мг/кг	Приріст об'єму стопи, у.о.	Антиексудативна активність, %
Контрольна патологія	-	$36,8 \pm 2,1$	-
Диклокор	$5,0$	$33,4 \pm 1,6$	$9,2 \pm 0,4$
Диклокор	$10,0$	$23,5 \pm 0,9^*$	$36,1 \pm 1,3$
Диклокор	$20,0$	$17,6 \pm 0,7^*$	$52,2 \pm 2,2$

Примітка. \* -  $p < 0,05$  відносно групи контрольної патології.

В ході проведених розрахунків було визначено  $ED_{50}$  Диклокору за антиексудативною активністю, яка склала  $18,24 \pm 2,06$  мг/кг за сумою діючих речовин, що відповідає  $7,02 \pm 0,79$  мг/кг за ДН.

За результатами вивчення гострої токсичності та середньоелементарних доз Диклокору був розрахований терапевтичний індекс (ТІ), що характеризує широту терапевтичної дії препарату (табл. 8).

Таблиця 8

Характеристика широти терапевтичної дії Диклокору

Препарат	ЕД <sub>50</sub> , мг/кг	ЛД <sub>50</sub> , мг/кг	ТІ	Відносний ТІ за ДН
Диклокор	18,2 (7,0 за ДН)	952,5 (366,5 за ДН)	52,3	4,4
ДН	8,0 [14,16]	95,0 [17]	11,9	1

Результати розрахунків свідчать про значно більшу широту терапевтичної дії дослідного засобу у порівнянні з ДН, що обумовлено як зниженням токсичності, так і підвищенням активності даного НПЗП, яке, в свою чергу, обумовлено сумацією фармакологічних ефектів субстанцій і підтверджує доцільність створення комбінованої лікарської форми на їх основі.

Приклад 1. Дослідження ульцерогенних властивостей Диклокору при пероральному введенні.

Доклінічне вивчення ульцерогенних властивостей Диклокору було проведено при пероральному введенні у щурів у діапазоні доз 18,2-145,6 мг/кг за сумою діючих речовин, що відповідає 1 ЕД<sub>50</sub>-8 ЕД<sub>50</sub> препарату у порівнянні з ДН у дозі 48,0 мг/кг (середня ульцерогенна доза (УД<sub>50</sub>)) [16] згідно рекомендацій ДЕЦ МОЗ України [14]. Рівень ульцерогенної активності Диклокору у залежності від дози розраховували на підставі значень медіан у кожній групі та 50 % рівня активності під впливом Вольтарену у дозі УД<sub>50</sub> (табл. 9).

Таблиця 9

Ульцерогенна активність Диклокору у щурів (n=60)

Дослідна група	Ульцерогенна активність, %
Диклокор 18,2 мг/кг	1,7
Диклокор 36,4 мг/кг	3,3
Диклокор 72,8 мг/кг	16,7
Диклокор 145,6 мг/кг	41,7
Вольтарен 48,0 мг/кг	50,0

Після цього розраховували показник УД<sub>50</sub> за допомогою пробіт-аналізу [13] та індекс переносимості (ІП), як співвідношення УД<sub>50</sub>/ЕД<sub>50</sub>, що характеризує безпеку при застосуванні препарату з боку органів травної системи [20] (табл. 10).

Таблиця 10

Порівняльні показники індексу переносимості Диклокору та ДН

Препарат	УД <sub>50</sub> , мг/кг	ЕД <sub>50</sub> , мг/кг	ІП	Відносний ІП за ДН
Диклокор	156,2 (60,1 за ДН)	18,2 (7,0 за ДН)	8,6	1,4
ДН	48,0 [16]	8,0 [14,16]	6,0	1

За результатами проведених досліджень можна зробити висновок про виражене зниження гастротоксичності ДН при сумісному застосуванні з кверцетином у одній лікарській формі, що підтверджується збільшенням показників УД<sub>50</sub> Диклокору в 1,3 рази та ІП в 1,4 рази у порівнянні з ДН.

Приклад 8. Дослідження антиальтеративної активності Диклокору на моделі скарифікованих ран у щурів.

Вивчення антиальтеративних властивостей Диклокору проводили на моделі стандартних скарифікованих ран у щурів [14] у порівнянні з монокомпонентами композиції - Кверцетином та ДН. Антиальтеративну активність препаратів оцінювали за показниками інтенсивності зменшення площ ран під їх впливом. Результати дослідження наведено в таблиці 11.

Таблиця 11

Антиальтеративна активність Диклокоору, % (n=40)

Дослідний препарат	Доза, мг/кг	7 доба	9 доба	11 доба	13 доба	15 доба
Диклокор	18,2	32,75±0,87*	52,09±1,39*	58,06±1,55*	79,26±2,11*	100,0
Кверцетин	11,2	16,52±0,44	17,87±0,48	27,96±0,75	31,85±0,85	48,86±1,30
ДН	7,0	10,72±0,29	12,17±0,32	15,05±0,40	14,81±0,4	4,55±0,12

Примітка. \*- p&lt;0,05 відносно тварин, що отримували референс-препарати.

Отримані результати свідчать про значно вищий рівень активності Диклокоору порівняно з його монокомпонентами, оскільки повне ранозагоєння і, відповідно, стовідсотковий рівень антиальтеративної дії дослідного засобу було зареєстровано на 15 добу експерименту. За рівнем показників антиальтеративної активності Диклокор вірогідно перевищував Кверцетин та ДН у 2,0-2,9 та 2,2-5,4 рази відповідно. Таким чином, Диклокор чинить позитивний вплив на альтеративне запалення на моделі скарифікованих ран у щурів, сприяючи прискоренню швидкості загоєння ран, зменшенню площі ран та виявляючи вірогідно вищі показники антиальтеративної активності в порівнянні з Кверцетином та ДН.

Приклад 9. Поглиблене вивчення антиальтеративних властивостей Диклокоору на моделі фуразолідон-ізадринного міокардиту у щурів.

Антиальтеративні властивості Диклокоору вивчали у дозі 18,2 мг/кг на моделі фуразолідон-ізадринного міокардиту у щурів [14], викликаючи патологію сумісним введенням 200 мг/кг фуразолідону та з інтервалом у годину -40 мг/кг ізадрину, у порівнянні з дією ДН у еквівалентній дозі. В ході експерименту станом на 5 добу оцінювали вплив Диклокоору та референтного препарату на функціональний стан міокарду за результатами ЕКГ-дослідження (табл. 12).

Таблиця 12

Вплив Диклокоору на показники функціонального стану міокарду щурів з ізадрин-фуразолідоновим міокардитом (n=40)

Показники		Інтактний контроль	Контрольна патологія	Диклокор, 18,2 мг/кг	ДН, 7,0 мг/кг
Тривалість	інтервалу RR, с	0,140±0,006	0,108±0,004*	0,127±0,005**/ˆ	0,112±0,004*
	інтервалу PQ, с	0,046±0,002	0,036±0,001*	0,042±0,002**	0,040±0,002*
	інтервалу QT, с	0,077±0,003	0,056±0,002*	0,066±0,003*/**	0,064±0,003*/**
	комплексу QRS, с	0,024±0,001	0,018±0,001*	0,023±0,001**/ˆ	0,019±0,001*
Вольтаж	зубця Р, mV	0,087±0,003	0,061±0,002*	0,084±0,003**/ˆ	0,069±0,003*
	зубця Т, mV	0,158±0,006	0,084±0,003*	0,109±0,004*/**/ˆ	0,097±0,004*/**
	зубця R, mV	0,430±0,017	0,320±0,013*	0,390±0,016**/ˆ	0,339±0,014*
Зміщення ST від ізолінії, мм		0,20±0,08	1,90±0,12*	0,65±0,17**/ˆ	1,40±0,12**

Примітки:

- 1) \* - p≤ 0,05 відносно інтактних тварин;
- 2) \*\* - p≤ 0,05 відносно групи контрольної патології;
- 3) ˆ - p≤ 0,05 відносно тварин, що отримували ДН.

Дані, наведені у таблиці, свідчать про те, що за інтенсивністю ураження та дестабілізації функціонального стану міокарду досліджувані групи тварин можна розмістити наступним чином: контрольна патологія → ДН → Диклокор → інтактний контроль. Відмічено, що на фоні застосування Диклокоору відбувалася нормалізація показників функціонального стану міокарду

(тривалості інтервалів RR, PQ, QT, комплексу QRS, вольтажу зубців P, T, R), яка мала вірогідний характер не тільки по відношенню до групи контрольної патології, а й до тварин, що отримували ДН. Таким чином, в умовах розвитку фуразолідон-ізадринного ураження міокарду у щурів Диклокор має достовірний кардіопротекторний вплив, в основі якого лежить зниження інтенсивності альтеративних процесів, вірогідно перевищуючи при цьому рівень активності ДН.

Приклад 10. Дослідження антиексудативних властивостей Диклокоору на моделях асептичного запалення, викликаних різними флогогенами.

Дослідження антиексудативних властивостей Диклокоору проведено на моделях асептичного запалення стопи у щурів, викликаних наступними флогогенами:  $\lambda$ -карагеніном, гістаміном, серотоніном, зимозаном та простагландином  $E_2$  [14]. Антиексудативну активність дослідного засобу оцінювали станом на 3 годину після відтворення запалення за ступенем зменшення набряку стопи відносно групи контрольної патології та порівнювали з ефективністю монокомпонентів комбінації. Результати дослідження наведено у таблиці 13.

Таблиця 13

Антиексудативна активність (%) Диклокоору в умовах розвитку асептичного запалення, викликаного різними флогогенами (n=200)

Об'єкт дослідження	Доза, мг/кг	Флогоген				
		Х-карагенін	гістамін	серотонін	зимозан	простагландин $E_2$
Диклокор	18,2	61,7 $\pm$ 2,7*	323 $\pm$ 1,9*	27,0 $\pm$ 1,6*	24,4 $\pm$ 1,5*	31,9 $\pm$ 1,9*
Кверцетин	11,2	15,8 $\pm$ 0,4	17,9 $\pm$ 1,1	12,4 $\pm$ 0,7	19,6 $\pm$ 1,2	7,7 $\pm$ 0,5
ДН	7,0	52,2 $\pm$ 1,7	21,8 $\pm$ 1,0	25,9 $\pm$ 1,2	10,1 $\pm$ 0,5	34,0 $\pm$ 1,6

Примітки:

1) \* -  $p < 0,05$  відносно тварин, що отримували Кверцетин;

2) • -  $p < 0,05$  відносно тварин, що отримували ДН.

Отримані дані свідчать про високий рівень протизапальної дії Диклокоору на моделях карагенінового та простагландинного запалення обумовлених, наявністю у його складі ДН та його антициклооксигеназною активністю [14, 16]. В той же час, вплив на зимозанове запалення реалізується завдяки антилейкотриєновій дії Кверцетину [21]. Активність Диклокоору на моделях гістамінового та серотонінового набряків у рівній мірі обумовлена обома вищезазначеними механізмами. Таким чином, Диклокор має комплексний механізм протизапальної дії, здійснюючи інгібуючий вплив практично на весь відомий спектр медіаторів запалення, та перевершуючи при цьому рівень активності референтних засобів, що пов'язано із синергічним впливом монокомпонентів на протизапальні властивості один одного та реалізується шляхом адитивної дії.

Приклад 11. Поглиблене вивчення антиексудативних властивостей Диклокоору на моделі токсичного набряку легень у щурів.

Поглиблене вивчення антиексудативних властивостей Диклокоору проведено на моделі токсичного набряку легень у щурів, викликаного внутрішньоочеревинним введенням 6 % розчину хлориду амонію у дозі 400 мг/кг [14]. У ході дослідження активність Диклокоору оцінювали за динамікою масового коефіцієнту легень (МКЛ) у порівнянні з монокомпонентами композиції. Результати дослідження представлені в таблиці 14.

Таблиця 14

Вплив Диклокору на перебіг токсичного набряку легень у щурів (n=50)

Дослідна група	Доза, мг/кг	МКЛ, %	Активність, %
Інтактний контроль	-	0,71±0,03	-
Контрольна патологія	-	1,52±0,05*	0
Диклокор	18,2	0,91±0,03**/~/	75,4±2,7~/
Кверцетин	11,2	1,31±0,05*/~/	25,3±0,9
ДН	7,0	1,02±0,04*/**	61,7±2,2

Примітки:

- 1) \* -  $p \leq 0,05$  відносно інтактних тварин;
- 2) \*\* -  $p \leq 0,05$  відносно контрольної патології;
- 3) ~ -  $p \leq 0,05$  відносно тварин, що отримували Кверцетин;
- 4) - -  $p \leq 0,05$  відносно тварин, що отримували ДН.

Аналіз результатів дослідження свідчить про те, що під впливом Диклокору відбувається вірогідне зменшення МКЛ тварин та відповідне збільшення антиексудативної активності не тільки у порівнянні з групою контрольної патології, а й з дією монокомпонентів композиції. Активність Диклокору у групі тварин, ним лікованих, перевищувала показники для групи, де застосовували Кверцетин, в 3,0 рази та ДН - в 1,2 разу. Таким чином, встановлено позитивний лікувально-профілактичний вплив Диклокору на перебіг токсичного набряку легень, що підтверджувалося високими показниками антиексудативної активності даного засобу.

Приклад 12. Дослідження антипроліферативних властивостей Диклокору на моделі "ватної" гранульоми у щурів

Антипроліферативну активність Диклокору досліджували на моделі "ватної" гранульоми у щурів [14] у порівнянні з дією монокомпонентів дослідного засобу. Результати вивчення дослідження представлені в таблиці 15.

Таблиця 15

Антипроліферативна активність  
Диклокору на моделі "ватної" гранульоми у щурів (n=40)

Дослідна група	Доза, мг/кг	Кількість грануляційної тканини, мг	Активність, %
Контрольна патологія	-	45,2±1,7	-
Диклокор	18,2	34,3±1,3 */	24,12±0,88 **/
Кверцетин	11,2	37,0±1,4 *	18,14±0,66
ДН	7,0	39,1±1,4 *	13,50±0,49

Примітки:

- 1) \* -  $p \leq 0,05$  відносно контрольної патології;
- 2) \*\* -  $p \leq 0,05$  відносно тварин, що отримували Кверцетин;
- 3) - -  $p \leq 0,05$  відносно тварин, що отримували ДН.

Дані проведених досліджень показали, що за ступенем антипроліферативної активності Диклокор вірогідно перевищує дію Кверцетину у 1,3 разу та ДН у 1,8 разу. Таким чином, в умовах розвитку проліферативного запалення Диклокор чинить виражений антипроліферативний вплив, що є корисним у плані лікування запально-деструктивних захворювань паренхіматозних органів, таких як печінка, нирки, серце, та ін., оскільки сприятиме пригніченню розвитку у них склеротичних процесів.

Приклад 13. Поглиблене вивчення антипроліферативних властивостей Диклокору на моделі доксорубіцинової кардіоміопатії у щурів.

Поглиблене вивчення антипроліферативних властивостей Диклокору проведено в умовах розвитку доксорубіцин-індукованої пластичної недостатності міокарду у щурів, яку відтворювали шляхом внутрішньочеревинного введення доксорубіцину в дозі 20 мг/кг [14]. В ході

експерименту станом на 10 добу оцінювали вплив Диклокору на деякі біохімічні показники лабораторних тварин у порівнянні з активністю ДН в еквівалентній дозі (табл. 16).

Таблиця 16

Вплив Диклокору на деякі біохімічні показники щурів з доксорубіциновою кардіоміопатією (n=31)

Дослідна група	АсАТ крові, ммоль/год.*л	ЛДГ крові, ммоль/год.*л	ТБК-реактанти крові, мкмоль/л	ТБК-реактанти міокарда, мкмоль/г
Інтактний контроль (n=12)	0,67±0,03	5,13±0,23	2,28±0,07	63,62±1,88
Контрольна патологія (n=4)	1,53±0,14*	7,77±0,72*	4,21±0,24*	151,61±8,62*
Диклокор 18,2 мг/кг (n=9)	0,81±0,04*/*/*	5,98±0,31*/*/*	3,55±0,13*/*/*	97,23±3,44*/*/*
ДН 7,0 мг/кг (n=6)	1,33±0,08*	6,85±0,43*	4,02±0,20*	136,63±6,74*

Примітки:

- 1) \* -  $p \leq 0,05$  відносно інтактних тварин;
- 2) \*\* -  $p \leq 0,05$  відносно групи контрольної патології;
- 3) -  $p \leq 0,05$  відносно тварин, що отримували ДН.

5 Результати біохімічних досліджень показали інгібуючий вплив з боку дослідних засобів на накопичення продуктів перекисного окиснення ліпідів та ріст ферментемії в умовах розвитку кардіоміопатії. Найбільш значущу лікувальну дію проявив Диклокор, що підтверджено вірогідною динамікою зазначених показників стосовно контрольної патології. При цьому активність АсАТ та вміст ТБК-реактантів в тканині міокарду були вірогідно нижчими, ніж у тварин, які лікувались ДН, у 1,7 та 1,4 разу відповідно. Таким чином, отримані дані свідчать про наявність у Диклокору, окрім протизапальних, ще й кардіопротекторних властивостей, що обумовлює доцільність його застосування у лікуванні запально-деструктивних захворювань міокарду.

10 Приклад 14. Дослідження впливу Диклокору на перебіг експериментального аутоімунного артриту.

15 Дослідження проведено на моделі колаген-індукованого артриту у щурів, який відтворювали шляхом підшкірного дворазового введення (з інтервалом у тиждень) емульгованої суміші бичачого колагену II типу та повного ад'юванта Фрейнда (1:1) в дозі 2 мг/кг за колагеном [22]. В ході дослідження у сироватці крові тварин станом на 28 добу оцінювали динаміку вмісту ейкозаноїдів (простагландину  $E_2$  ( $PGE_2$ ), 6-кето-простагландину  $F_{1\alpha}$  (6-кето-  $PGF_{1\alpha}$ ), тромбоксану  $B_2$  ( $ThB_2$ ) та лейкотриєну  $B_4$  ( $LTB_4$ )) за допомогою наборів для імуноферментного аналізу виробництва "Neogen Corporation" (США). Ефективність Диклокору вивчали у порівнянні з дією його монокомпонентів у еквівалентних дозах. Результати дослідження наведено в таблиці 17.

25

Таблиця 17

Вплив Диклокору на вміст ейкозаноїдів  
в сироватці крові щурів з колаген-індукованим артритом (n=50)

Дослідна група	PGE <sub>2</sub> , пг/мл	6-keto-PGF <sub>1α</sub> , пг/мл	TxB <sub>2</sub> , пг/мл	LTB <sub>4</sub> , пг/мл
Інтактний контроль	879,8±12,5	261,6±4,2	242,6±9,5	261,4±6,3
Контрольна патологія	1248,4±26,1*	294,3±4,1*	493,2±4,8*	421,3±4,7*
Диклокор 18,2 мг/кг	901,5±17,5**/	272,5±6,7**	256,6±8,9**/	345,6±3,1*/**//
Кверцетин 11,2 мг/кг	1198,7±22,1*	286,8±7,4*	472,7±6,7*/**	282,9±8,4**
ДН 7,0 мг/кг	925,5±13,6*/**	279,2±5,4*/**	265,4±5,9**	398,3±6,5*/**

Примітки:

- 1) \* -  $p \leq 0,05$  відносно інтактних тварин;
- 2) \*\* -  $p \leq 0,05$  відносно контрольних тварин;
- 3) / -  $p \leq 0,05$  відносно тварин, що отримували Кверцетин;
- 4) // -  $p \leq 0,05$  відносно тварин, що отримували ДН.

У ході дослідження було виявлено, що застосування Диклокору на тлі розвитку колаген-індукованого артриту сприяє вірогідній нормалізації вмісту ейкозаноїдів в сироватці крові щурів. Так, рівень PGE<sub>2</sub> знижувався в 1,4 разу; вміст 6-keto-PGF<sub>1α</sub> - в 1,1 разу; TxB<sub>2</sub> - в 1,9 разу та рівень LTB<sub>4</sub> - в 1,2 разу. При цьому за ступенем фармакологічного впливу на більшість досліджених показників Диклокор перевершував препарати порівняння Кверцетин та ДН. Отримані результати свідчать, що препарат Диклокор має комплексний механізм дії із впливом як на циклооксигеназний (завдяки вмісту ДН), так і ліпооксигеназний (наявність кверцетину) шляхи метаболізму арахідонової кислоти.

Таким чином, Диклокор є перспективним коректором запально-деструктивних захворювань суглобів з аутоімунним компонентом, наприклад, таких як ревматоїдний артрит.

Приклад 15. Дослідження впливу Диклокору на структуру суглобового хряща в умовах розвитку експериментального остеоартрозу.

Вплив Диклокору на морфоструктуру суглобових тканин на тлі розвитку експериментального остеоартрозу вивчали у порівнянні з дією його моно-компонентів в еквівалентних дозах. Дослідження проводили на моделі системного стероїдного артрозу у щурів [23], яку відтворювали шляхом триразового внутрішньом'язевого введення дексаметазону у дозі 7 мг/кг з інтервалом в один тиждень [24]. Дослідні засоби вводили щоденно протягом 1 місяця, починаючи після другого тижня від останньої ін'єкції дексаметазону. В ході морфологічного дослідження мікропрепаратів суглобового хряща станом на 56 добу експерименту проводили морфометричне визначення його товщини, щільності розташування хондроцитів та напівкількісну оцінку стану основних його структур (табл. 18).

Таблиця 18

Морфометричні показники суглобового хряща щурів з експериментальним остеоартрозом під впливом Диклокору (n=50)

Дослідна група	Товщина хряща, умов. од.	Клітинна щільність на умов. од. площі	Сума балів за системою оцінки стану хряща
Інтактний контроль	15,33±1,15	42,40±5,64	24,46±0,22
Контрольна патологія	12,62±0,58*	28,63±1,85*	12,68±0,85*
Диклокор 18,2 мг/кг	15,73±0,59**/	35,83±4,31**/	20,19±0,93**/
Кверцетин 11,2 мг/кг	15,66±1,35	32,67±2,48*	18,09±0,94**/
ДН 7,0 мг/кг	13,77±0,52	32,20±3,02*	14,66±0,95*

Примітки:

- 1) \* -  $p \leq 0,05$  відносно інтактних тварин;
- 2) \*\* -  $p \leq 0,05$  відносно групи контрольної патології;
- 3) -  $p \leq 0,05$  відносно тварин, що отримували ДН.

Результати проведених досліджень свідчать про те, що в умовах розвитку експериментального остеоартрозу під впливом Диклокору відбувається вірогідне збільшення товщини суглобового хряща та щільності розташування хондроцитів в середньому на 20 %, а також суми балів за напівкількісною системою оцінки стану хрящової тканини в 1,6 разу. Слід відмітити, що за більшістю даних параметрів Диклокор вірогідно перевищував активність ДН та без достовірних відмінностей - Кверцетину. Все вищевикладене свідчить про наявність у Диклокору певних хондропротекторних властивостей, які обумовлені вмістом у його складі Кверцетину. Наявність даного флавоноїду у складі Диклокору дозволяє позитивно модифікувати вплив ДН на хрящову тканину і значно розширити можливості його застосування на тлі розвитку дегенеративно-дистрофічних уражень суглобів.

Приклад 16. Дослідження процесів апоптозу під впливом Диклокору в умовах розвитку експериментального остеоартрозу.

Дослідження антиапоптотичних властивостей Диклокору проведено аналогічно прикладу 11. Ідентифікацію апоптотичних клітин у тканинах суглобового хряща проводили на 56 добу експерименту імуногістохімічно на напівтонких парафінових зрізах методом TUNEL-реакції за допомогою наборів "In Situ Cell Death Detection Kit, AP" виробництва "Roche Diagnostics" (Німеччина) [25, 26]. В ході дослідження проводили кількісно узагальнену морфометричну оцінку стану суглобового хряща за результатами TUNEL-реакції під впливом Диклокору та його монокомпонентів у еквівалентних дозах (табл. 19).

Таблиця 19

Морфометрична характеристика суглобового хряща щурів за результатами TUNEL-реакції (n=50)

Дослідна група	TUNEL-позитивні клітини, %
Інтактний контроль	1,1±1,0
Контрольна патологія	61,8±5,8 *
Диклокор 18,2 мг/кг	11,8±3,7**/
Кверцетин 11,2 мг/кг	16,3±4,0 */**/
ДН 7,0 мг/кг	40,7±5,7 */**

Примітки:

- 1) \* -  $p \leq 0,05$  відносно інтактних тварин;
- 2) \*\* -  $p \leq 0,05$  відносно групи контрольної патології;
- 3) -  $p \leq 0,05$  відносно тварин, що отримували ДН.

Дані, наведені у таблиці свідчать про те, що під впливом Диклокору на тлі розвитку остеоартрозу у щурів відбувається виражене зниження (у 5,2 разу) інтенсивності процесів



апоптозу у хрящовій тканині, яке є невірогідно вищим за рівень Кверцетину, та достовірно перевершує активність ДН. Таким чином, в основі механізму хондропротекторної дії Диклокору лежить позитивний вплив на запобігання процесів апоптозу хондроцитів, що виявляється у зменшенні кількості TUNEL-позитивних клітин. Отримані результати дозволяють вважати

5 Диклокор перспективним засобом терапії дегенеративно-дистрофічних захворювань суглобів, таких як остеоартроз, особливо вторинної етіології.

Приклад 17. Дослідження впливу Диклокору на перебіг експериментального аутоімунного артриту.

10 Дослідження проведено на моделі колаген-індукованого артриту у щурів, який відтворювали шляхом підшкірного дворазового введення (з інтервалом у тиждень) емульгованої суміші бичачого колагену II типу та повного ад'юванта Фрейнда (1:1) в дозі 2 мг/кг за колагеном [22]. В ході дослідження у сироватці крові тварин станом на 28 добу оцінювали динаміку вмісту

15 ейкозаноїдів (простагландину  $E_2$  ( $PGE_2$ ), 6-кето-простагландину  $F_{1\alpha}$  (6-кето-PG  $F_{1\alpha}$ ), тромбоксану  $B_2$  ( $TxB_2$ ) та лейкотриєну  $B_4$  ( $LTB_4$ )) за допомогою наборів для імуноферментного аналізу виробництва "Neogen Corporation" (США). Ефективність Диклокору вивчали у порівнянні з дією його монокомпонентів у еквівалентних дозах. Результати дослідження наведено в таблиці 20.

Таблиця 20

Вплив Диклокору на вміст ейкозаноїдів в сироватці крові щурів з артритом (n=50) колаген-індукованим

Дослідна група	$PGE_2$ , пг/мл	6-keto-PGF $_{1\alpha}$ , пг/мл	$TxB_2$ , пг/мл	$LTB_4$ , пг/мл
Інтактний контроль	879,8±12,5	261,6±4,2	242,6±9,5	261,4±6,3
Контрольна патологія	1248,4±26,1*	294,3±4,1*	493,2±4,8*	421,3±4,7*
Диклокор 18,2 мг/кг	901,5±7,5**/	272,5±6,7**	256,6±8,9**/	345,6±3,1*/**/
Кверцетин 11,2 мг/кг	1198,7±22,1*	286,8±7,4*	472,7±6,7*/**	282,9±8,4**
ДН 7,0 мг/кг	925,5±13,6*/**	279,2±5,4*/**	265,4±5,9**	398,3±6,5*/**

Примітки:

1)\* -p<0,05 відносно інтактних тварин;

2)\*\*-p<0,05 відносно контрольних тварин;

3) -p<0,05 відносно тварин, що отримували Кверцетин;

4) -p<0,05 відносно тварин, що отримували ДН.

20 У ході дослідження було виявлено, що застосування Диклокору на тлі розвитку колаген-індукованого артриту сприяє вірогідній нормалізації вмісту ейкозаноїдів в сироватці крові щурів. Так, рівень  $PGE_2$  знижувався в 1,4 разу; вміст 6-keto-PGF $_{1\alpha}$  - в 1,1 разу;  $TxB_2$  - в 1,9 разу та рівень  $LTB_4$  - в 1,2 разу. При цьому за ступенем фармакологічного впливу на більшість досліджених показників Диклокор перевершував препарати порівняння Кверцетин та ДН.

25 Отримані результати свідчать, що препарат Диклокор має комплексний механізм дії із впливом як на циклооксигеназний (завдяки вмісту ДН), так і ліпооксигеназний (кверцетину) шляхи метаболізму арахідонової кислоти. Таким чином, Диклокор є перспективним коректором запально-деструктивних захворювань суглобів з аутоімунним компонентом, наприклад, таких як ревматоїдний артрит.

30 Приклад 18. Дослідження впливу Диклокору на структуру суглобового хряща в умовах розвитку експериментального остеоартрозу.

Вплив Диклокору на морфоструктуру суглобових тканин на тлі розвитку експериментального остеоартрозу вивчали у порівнянні з дією його моно-компонентів в еквівалентних дозах. Дослідження проводили на моделі системного стероїдного артрозу у щурів [23], яку відтворювали шляхом триразового внутрішньом'язового введення дексаметазону у дозі 7 мг/кг з інтервалом в один тиждень [24]. Досліджувані препарати вводили щоденно протягом 1 місяця,

35 починаючи через 2 тижня після останньої ін'єкції дексаметазону. В ході морфологічного дослідження мікропрепаратів суглобового хряща станом на 56 добу експерименту проводили

морфометричне визначення його товщини, щільності розташування хондроцитів та напівкількісну оцінку стану основних його структур (табл. 21).

Таблиця 21

Морфометричні показники суглобового хряща  
щурів з експериментальним остеоартрозом під впливом Диклокору (n=50)

Дослідна група	Товщина хряща, умов. од.	Клітинна щільність на умов. од. площі	Сума балів за системою оцінки стану хряща
Інтактний контроль	15,33±1,15	42,40±5,64	24,46±0,22
Контрольна патологія	12,62±0,58*	28,63±1,85*	12,68±0,85*
Диклокор 18,2 мг/кг	15,73±0,59**/	35,83±4,31**/	20,19±0,93**/
Кверцетин 11,2 мг/кг	15,66±1,35	32,67±2,48*	18,09±0,94**/
ДН 7,0 мг/кг	13,77±0,52	32,20±3,02*	14,66±0,95*

Примітки:

- 1) \* -  $p \leq 0,05$  відносно інтактних тварин;
- 2) \*\* -  $p \leq 0,05$  відносно групи контрольної патології;
- 3) -  $p \leq 0,05$  відносно тварин, що отримували ДН.

5 Результати проведених досліджень свідчать, що в умовах розвитку експериментального остеоартрозу під впливом Диклокору відбувається вірогідне збільшення товщини суглобового хряща та щільності розташування хондроцитів в середньому на 20 %, а також суми балів за напівкількісною системою оцінки стану хрящової тканини в 1,6 разу. Слід відмітити, що за більшістю даних параметрів Диклокор вірогідно перевищував активність ДН та без достовірних відмінностей - Кверцетину. Все вищевикладене свідчить про наявність у Диклокору певних хондропротекторних властивостей, які обумовлені вмістом у його складі Кверцетину. Застосування даного флавоноїду у складі Диклокору дозволяє позитивно модифікувати вплив ДН на хрящову тканину і значно розширити можливості його застосування на тлі розвитку дегенеративно-дистрофічних уражень суглобів.

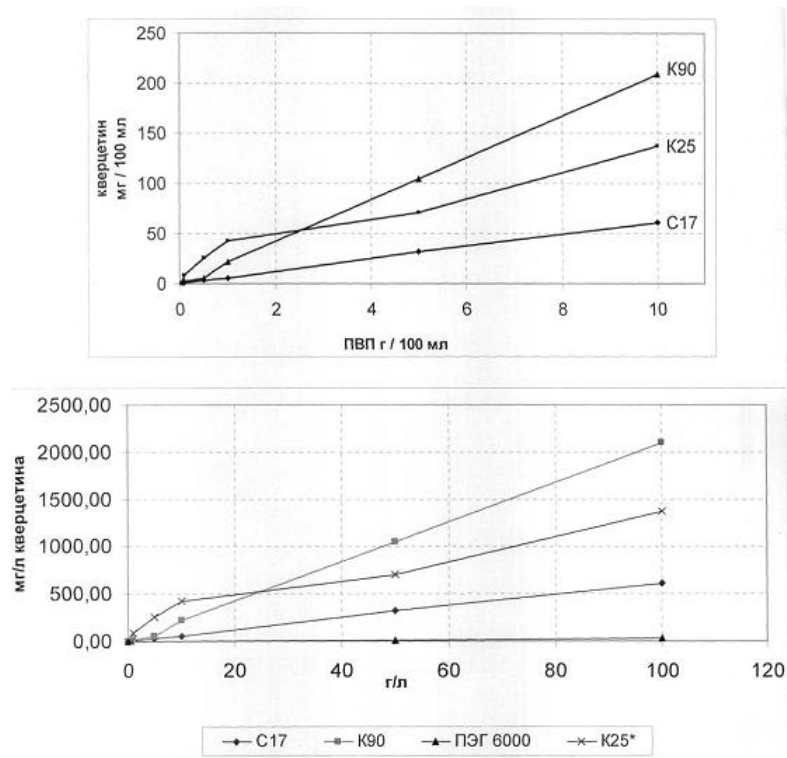
15 Джерела інформації:

1. Модифікація фармакологічних властивостей нестероїдних протизапальних препаратів аміноцукром глюкозаміну гідрохлоридом: Методичні рекомендації / С. Б. Попов, С. К. Шебеко, К. О. Зупанець, І. А. Отрішко, Н. П. Безугла. - Харків, 2007.-24 с
2. Коваленко В. М., Борткевич О. П., Проценко Г. О. Нестероїдні протизапальні препарати: роль і місце в сучасній ревматологічній практиці на основі даних доказової медицини // Український ревматологічний журнал.-2006.-№1 (23).-С 17-29.
3. Вікторов О. П., Дмитрієва Т. Ю., Бази́ка О. Є., Деяк С. І. Нестероїдні протизапальні препарати у ХХ сторіччі: користь/ризик // Україн. ревматол журнал.-2005. - №2(24). - С 3-7.
4. Компендіум 2009 - Лекарственные препараты / Под ред. В.Н. Коваленко, А. П. Викторова. - К.: МОРИОН, 2009.-2224 с.
5. Ковалев В. Б., Ковган В. В., Колчина Е. Ю. Механизмы лечебного действия биофлавоноида кверцетина (обзор литературы) // Український медичний альманах.-1999. - Т. 2, № 4. - С. 176-182.
6. Morales A. I., Vicente-Sanchez C, Jerkic M. et al. Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats // Toxicology and Applied Pharmacology.-2006. -Vol. 210 (1-2). -P. 128-135.
7. Actis-Goretta L., Ottaviani J. I., Fraga C G. et al. Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods // Journal of Agricultural and Food Chemistry.-2006. - Vol. 54 (1). - P. 229-234.
8. Duarte J., Perez-Palencia R., Vargas F. et al. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats // British Journal of Pharmacology.-2001.-Vol. 133 (I).-P. 117-124.
- 9 Garcia-Saura M. F., Galisteo M., Villar I. C. et al. Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension // Molecular And Cellular Biochemistry.-2005. - Vol. 270 (1-2). - P. 147-155.
10. Mojzis J., Hviscova K., Germanova D. et al.: Protective effect of quercetin on ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. Physiol. Res. 2001, V 50, P.501-506.

11. Alarcon de la Lastra C, Martin M.J., Motilva V. Antiulcer and gastro-protective effect of quercetin: A gross and histologic study. *Pharmacology* 1994. V. 48. P.56-62./
12. Guerrero J. A., Lozano M. L., Castillo J. et al. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*.-2005. - Vol. 3. - P. 369-376.
13. Прозоровский В.Б. Практическое пособие по ускоренному определению средних эффективных доз и концентрации биологически активных веществ. - СПб, 1992.-42 с.
14. Доклинические исследования лекарственных средств: Методические рекомендации / Под ред. А.В. Стефанова. - К: Авиценна, 2002.-528 с.
15. Даукшас В. К., Гайдялис П. Г., Удренайте Э. Б. и др. Синтез, противовоспалительная активность и метаболизм алкиларилкетонов и их производных // *Химико-фармацевтический журнал*.-1989. - Т. 23, № 12. - С. 1466-1470.
16. Лекарственная терапия воспалительного процесса: экспериментальная и клиническая фармакология противовоспалительных препаратов / Я. А. Сигидин, Г. Я. Шварц, А. П. Арзамасцев, С. С. Либерман - М.: Медицина, 1988.-240 с.
17. Арбузов Б. А., Федотова Н. Р., Зобова Н. Н. и др. Синтез, противовоспалительная и анальгетическая активность N-ацилмочевин // *Химико-фармацевтический журнал*.-1989. - Т. 23, № 6. - С. 682-683.
18. Зупанец И. А. Экспериментальное обоснование использования глюкозамина и его производных в медицине: Дис. в форме научного доклада.... докт. мед. наук. - Купавна, 1993.-90 с.
19. Yamashita S., Numoto T., Takenaga K. et al. A new anti-inflammatory agent, N-(2-methyl-3-chlorophenyl)-anthranilic acid (GEA 6114) <1-2>. Analgesic, antipyretic action and safety (including ulcerogenicity) // *Journal of the Medical Society of Toho University*.-1981. - Vol. 28, No. 1-2. - P. 99-105.
20. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р. У. Хабриева.-2-е изд., пере-раб. и доп. - М.: ОАО "Издательство "Медицина", 2005.-832 с.
21. Chi Y. S., Jong H. G., Son K. H. et al. Effects of Naturally Occurring Prenylated Flavonoids on Enzymes Metabolizing Arachidonic Acid: Cyclooxygenases and Lipoxygenases // *Biochemistry and Pharmacology*.-2001. - № 62. -P. 1185-1191.
22. Remmers E. F., Joe B., Griffiths M. M. et al. Modulation of Multiple Experimental Arthritis Models by Collagen-Induced Arthritis Quantitative Trait Loci Isolated in Congenic Rat Lines // *Arthritis & Rheumatism*.-2002. - Vol. 46, No. 8.-P. 2225-2234.
23. Методические рекомендации по экспериментальному исследованию и клиническому изучению противоартрозных (хондромодулирующих) лекарственных средств / И. А. Зупанец, Н. А. Корж, Н.В. Дедух и др. - К., 1999.-56 с.
24. Зупанець К. О., Шебеко С. К., Отрішко І. А. Дослідження впливу композиції на основі кверцетину та похідних глюкозаміну на процеси апоптозу хондроцитів в умовах розвитку експериментального остеоартриту // *Ліки України плюс*.-2010 - №3 (12). - С. 47-50.
25. Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation / Ed. H.J. Rode.-4-th edition. - Mannheim: Roche Diagnostics GmbH, 2008.-180 p.
26. Redman S.N., Khan I.M., Tew S.R., Archer C.W. In Situ Detection of Cell Death in Articular Cartilage. - In: *Arthritis Research: Methods and Protocols*, Volume 1 / Ed. A.P. Cope. - Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2007. - P. 183-199. /]

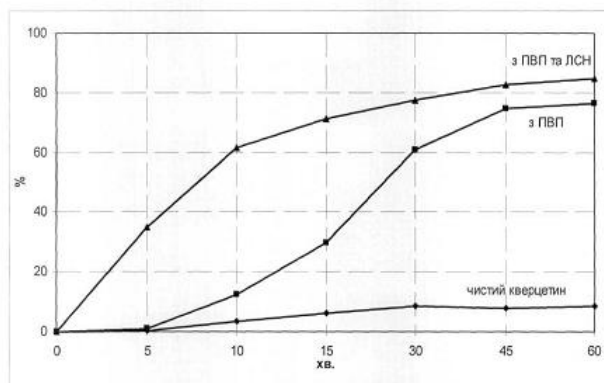
#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Фармацевтична композиція з протизапальною, кардіо- та хондропротекторною активністю, дією проти гастропатій, що викликаються нестероїдними протизапальними засобами, яка містить нестероїдний протизапальний препарат (НПЗП), речовину для посилення його фармакологічної дії і корекції побічних ефектів і цільові добавки, яка **відрізняється** тим, що як НПЗП вибрано диклофенак натрію в кількості 5-25 %, як речовину для посилення його фармакологічної дії і корекції побічних ефектів вибраний кверцетин в формі дигідрату або безводної субстанції в кількості 10-40 %, а як цільові добавки вибрані полівінілпіролідон в кількості 10-50 % і лаурилсульфат натрію в кількості 0,25-10 %, мікрокристалічна целюлоза в кількості 20-40 %, кроскармелози натрієва сіль в кількості 1-15 % та стеарат магнію в кількості 0,25-5,0 % у розрахунку на загальну масу композиції.
2. Фармацевтична композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що виконана в лікарських формах таблеток або капсул.



Розчинність композитів кверцетину з різними марка ПВП

Фіг. 1



Розчинність кверцетину та його композитів з ПВП та ЛСН з часом.

Фіг. 2

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601