

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

**Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю
Кафедра Біотехнології і мікробіології**

«До захисту в ЕК»
Директор інституту(декан факультету)
Наталія ГРЕГІРЧАК
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» ____ 2024 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри
Віктор СТАБНІКОВ
(підпис) (прізвище та ініціали)

«__» ____ 2024 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ БАКАЛАВРА**
зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми «Фармацевтична біотехнологія»

на тему: **«Гриби роду *Aspergillus* як продуценти речовин з
антимікробними властивостями»**

Виконала: здобувачка 2 курсу, групи 2

МИЧКОДАН Марія Іванівна
(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

(підпис)

Керівник СТАБНІКОВ Віктор Петрович
(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

(підпис)

Консультанти

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Рецензент

(прізвище та ініціали)

(підпис)

Я, як здобувачка Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавала і не одержувала недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Здобувач _____
(підпис)

Київ – 2024 р

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра біотехнології і мікробіології

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»
(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології
і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ
« 01 » листопада 2022 року

З А В Д А Н Н Я

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Мичкодан Марії Іванівни
(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи «Гриби роду *Aspergillus* як продуценти речовин з антимікробними властивостями»

керівник роботи СТАБНИКОВ Віктор Петрович, проф., зав. каф.,
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 780-кс

2. Строк подання здобувачем роботи 03.02.2023

3. Вихідні дані до роботи *Aspergillus favipes* HN4-13, об'єм ферментеру 36 м³, коефіцієнт заповнення 0,6

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)

Розділ 1. *Aspergillus* spp, як джерело вторинних метаболітів з антибактеріальною активністю. **Розділ 2.** Емодин: властивості та перспективи використання у фармацевтичній галузі. **Розділ 3.** Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу. **Розділ 4.** Обґрунтування та підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків. **Розділ 5.** Специфікація обладнання. **Розділ 6.** Опис технологічної схеми після ферментаційного виділення та очищення субстанції для одержання ЛЗ. **Розділ 7.** Виробництво субстанції для ЛЗ. **Розділ 8.** Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання ЛЗ. **Розділ 9.** Специфікація обладнання. **Розділ 10.** Опис технологічної схеми. **Розділ 11.** Опис лікарського засобу згідно АНД

5. Перелік графічного матеріалу

Технологічна схема ділянка виділення та очищення – 1 аркуш (формат А3)

Апаратурна схема ділянка виділення та очищення – 1 аркуш (формат А1)

Технологічна схема отримання емодину – 1 аркуш (формат А1)

Апаратурна схема отримання емодину – 1 аркуш (формат А1)

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада Консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 01 листопада 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1	Розділ 1. <i>Aspergillus</i> spp, як джерело вторинних метаболітів з антибактеріальною активністю	01.11.23 р. – 13.11.23 р	
2	Розділ 2. Емодин: властивості та перспективи використання у фармацевтичній галузі	13.11.23р.- 16.11.23р.	
3	Розділ 3. Техніко-економічне обґрунтування виробництва лікарського засобу	16.11.23 р. – 22.11.23 р.	
4	Розділ 4. Обґрунтування та підбір технологічного обладнання з врахуванням матеріальних потоків	22.11.23 р. – 25.11.23 р.	
5	Розділ 5. Специфікація обладнання	25.11.23 р. – 31.11.23 р.	
6	Розділ 6. Опис технологічної схеми після ферментаційного виділення та очищення субстанції для одержання ЛЗ	31.11.23 р.- 04.12.23 р.	
7	Розділ 7. Виробництво субстанції для ЛЗ	04.12.23 р. – 11.12.23 р.	
8	Розділ 8. Обґрунтування вибору технологічної схеми одержання ЛЗ	11.12.23 р. – 15.12.23 р.	
9	Розділ 9. Специфікація обладнання	15.12.23 р. – 20.12.23 р.	
10	Розділ 10. Опис технологічної схеми	20.12.23 р. – 27.12.23 р.	
11	Розділ 11. Опис лікарського засобу згідно АНД	27.12.23 р. – 05.01.24 р.	
12	Оформлення апаратурних та технологічних схем	05.01.24 р. – 10.01.24 р.	
13	Оформлення вступу та реферату	10.01.24 р. – 15.01.24 р.	

Здобувач

_____ (підпис)

Керівник роботи

_____ (підпис)

Марія МИЧКОДАН

(ім'я та прізвище)

Віктор СТАБНІКОВ

(ім'я та прізвище)

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота присвячена розробленню технологічної та апаратурної схем виділення та очищення емодину, який синтезований *Aspergillus favipes* HN4-13(0,1327 г/л). Розрахована потужність виробництва субстанції становить 89,576 кг на рік. Технологічна схема виділення та очищення емодину включає наступні технологічні процеси: відділення біомаси біологічного агента від культуральної рідини, звільнення фільтрату від домішок, виділення та очищення емодину, випарювання, сушіння.

Технологічна схема виготовлення розчину для інфузій, що містить емодин, включає допоміжні роботи (підготовка вентиляційного повітря, підготовка води для ін'єкцій та підготовка первинного пакування) та технологічний процес (приготування розчину для інфузій, фільтрація розчину та розлив у флакони, стерилізація розчину у первинному пакуванні, а також пакування та маркування у вторинну упаковку).

Кваліфікаційна робота складається з вступу, 11 розділів, списку використаних джерел (170 найменувань), апаратурної та технологічної схем (формат А1 і А3). Загальний обсяг роботи – 135 сторінки, містить 16 рисунків та 12 таблиць.

Ключові слова: емодин, виділення та очищення субстанції, *Aspergillus favipes* HN4-13.

ABSTRACT

The qualification work is devoted to the development of technological and apparatus schemes for the isolation and purification of emodin, which is synthesized by *Aspergillus favipes* HN4-13 (0.1327 g/l). The estimated production capacity of the substance is 89,576 kg per year. The technological scheme for the isolation and purification of emodin includes the following technological processes: separation of the biomass of the biological agent from the culture liquid, freeing the filtrate from impurities, isolation and purification of emodin, evaporation, drying.

The technological scheme for the production of a solution for infusions containing emodin includes auxiliary works (preparation of ventilation air, preparation of water for injections and preparation of primary packaging) and a technological process (preparation of a solution for infusions, filtration of the solution and bottling, sterilization of the solution in the primary packaging, as well as packaging and labeling in secondary packaging).

The qualification work consists of an introduction, 11 chapters, a list of used sources (170 items), hardware and technological schemes (format A1 and A3). The total volume of the work is 135 pages, contains 16 figures and 12 tables.

Key words: emodin, isolation and purification of the substance, *Aspergillus favipes* HN4-13.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1. <i>ASPERGILLUS</i> SPP, ЯК ДЖЕРЕЛО ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ З АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЮ АКТИВНІСТЮ.....	12
1.1. Методики оцінки антибактеріальної активності метаболітів грибів	12
1.2. Антибактеріальні метаболіти з наземних <i>Aspergillus spp</i>	13
1.3. Антибактеріальні властивості екстрактів з наземних <i>Aspergillus spp</i>	20
РОЗДІЛ 2. ЕМОДИН: ВЛАСТИВОСТІ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ У ФАРМАЦЕВТИЧНІЙ ГАЛУЗІ.....	28
2.1. Фармакологія.....	28
2.1.1. Протиракова активність.....	28
2.1.2. Протизапальна активність.....	29
2.1.3. Протівірусна активність.....	32
2.1.4. Антибактеріальна активність.....	33
2.1.5. Протиалергічна активність.....	34
2.1.6. Антидіабетична активність.....	35
2.1.7. Гепатопротекторна активність.....	36
2.1.8. Нейропротекторна активність.....	37
2.2. Фармакокінетика.....	38
2.3. Майбутні перспективи у використанні.....	39
РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ (ЛЗ).....	43
3.1.1. Передумови виробництва ЛЗ.....	43
3.1.1.1. Епідеміологія та патогенез інфекції <i>S.aureus</i>	43
3.1.1.2. Чутливість <i>S.aureus</i> до антибіотиків.....	47
3.1.1.3. Діагностика клінічних варіантів інфекції <i>S.aureus</i>	51
3.1.2. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання.....	52

3.1.3. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку.....	54
3.1.4. Перелік виробників (постачальників) субстанції.....	59
3.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу (ЛЗ).....	59
3.3. Обґрунтування вибору біологічного агенту для отримання субстанції для інженерної частини роботи.....	61
3.4. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції.....	66
РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ТА ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ.....	74
4.1. Стадія відділення біомаси.....	74
4.2. Стадія звільнення від домішок отриманого супернатанту.....	75
4.3. Стадія виділення та очищення емодину.....	76
4.4. Стадія концентрування розчину емодину.....	77
4.5. Стадія сушіння.....	79
РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ.....	77
РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ.....	83
РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛЗ (ПІДБІР СУЧАСНИХ МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ВИРОБНИЦТВА).....	88
РОЗДІЛ 8. ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ.....	93
8.1. Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік.....	93
8.2. Обґрунтування класів чистоти виробничих приміщень.....	94
8.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки.....	95
8.4. Обґрунтування вибору підготовки води для ін'єкцій.....	96

8.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання.....	98
РОЗДІЛ 9. СПЕЦИФІКА ОБЛАДНАННЯ.....	102
РОЗДІЛ 10. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ (ОТРИМАННЯ ЛЗ).....	106
РОЗДІЛ 11. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДГО АНД (ПРОЕКТ АНД).....	112
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	120

ВСТУП

Гриби є одними з найдавніших організмів відкритих людством, які в свою чергу відповідають за виробництво деяких промислових (наприклад, алкоголь), поживних (наприклад, хліб) і медичних (наприклад, пеніцилін) продуктів [1]. З самого початку і дотепер людство завжди стикалося з проблемою поширення бактеріальних інфекцій. Царство грибів (*Mycetae*) добре відоме як цінне джерело різноманітних біологічно активних сполук терапевтичного значення з моменту відкриття пеніциліну в 1928 році Олександром Флемінгом з *Penicillium notatum*. Лікування бактеріальних інфекцій дедалі більше ускладнюється здатністю бактерій розвивати резистентність до антибактеріальних засобів. Таким чином, необхідна нагальна потреба у використанні нових класів антибактеріальних агентів з новим механізмом дії. Зростаюча потреба в нових антибактеріальних агентах, здатних контролювати нові захворювання або стійкі штами бактерій, надихнула низку дослідницьких груп досліджувати наземне та морське середовище для пошуку нових антибактеріальних сполук [2].

Нитчасті гриби представляють важливу групу мікроорганізмів, які, як відомо, синтезують величезну різноманітність біоактивних молекул, які традиційно називають вторинними метаболітами або природними продуктами [3]. Вторинні метаболіти — це біологічно активні органічні сполуки, які не потрібні для нормального росту, розвитку чи розмноження, але забезпечують конкурентну перевагу організму-продуцента. Вторинні метаболіти використовуються як ліки, ароматизатори, або пігменти. Відкриття пеніциліну стало справжньою революцією в медицині, і дослідницький інтерес до вивчення нових антибактеріальних засобів з мікроорганізмів продовжується. Багато інтенсивних досліджень, головним

					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	ВСТУП	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Мичкодан М. І.					8	135
Керівник		Стабніков В. П.						9
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						

чином наземних і морських грибів, показали, що гриби є багатим джерелом унікальних біоактивних речовин. Велика кількість антибактеріальних метаболітів ідентифікована в багатьох видах грибів у всьому світі, і деякі з них були схвалені як ліки, такі як цефалоспорины та фузидова кислота. Більшість фармацевтичних препаратів, отриманих із грибів, були отримані з аскоміцетних грибів, таких як *Aspergillus*, *Penicillium* тощо, тоді як, можливо, менше фармацевтичних препаратів, звичайно в промисловому контексті, було отримано з базидіоміцетних грибів та інших. Проте більше 30% ізольованих метаболітів з грибів походять з *Aspergillus* і *Penicillium* [4].

Види *Aspergillus* були найрізноманітнішими та найпоширенішими видами грибів, які зустрічаються в навколишньому середовищі. Одне з пояснень великої кількості сполук, про які повідомляють із цього роду, полягає в тому, що *Aspergillus spp.* є солостійкими, видами, які швидко ростуть, і їх легко отримати з багатьох субстратів. Вторинні метаболіти, виділені з видів роду *Aspergillus*, постійно привертають інтерес фармакологів через їх широкий спектр біологічної активності та структурну різноманітність [5]. Доведено, що *Aspergillus* є потужним джерелом вторинних метаболітів з цікавою біологічною активністю, включаючи антибактеріальну активність [6].

РОЗДІЛ 1. *ASPERGILLUS* SPP, ЯК ДЖЕРЕЛО ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ З АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЮ АКТИВНІСТЮ

1.1. Методики оцінки антибактеріальної активності метаболітів грибів.

Для оцінки антибактеріальної активності грибкових екстрактів або чистих антимікробних сполук застосовуються добре відомі та широко використовувані кілька біоаналізів, наприклад агаровий диско-дифузійний метод, метод дифузії в агарових лунках, метод мікророзведення та метод із включенням екстракту в культуральне середовище та наступне визначення кількості бактеріальних колоній. Таким чином, результати антибактеріальної активності виражаються в різних одиницях. У агаровому диско-дифузійному методі екстракт вводять у диски в різних концентраціях. Далі вимірюється зона інгібування навколо кожного диска, а антибактеріальну активність представляють як діаметр зони інгібування (IZD)[7]. Принцип методу дифузії в агарових лунках такий самий, як і агаровий диско-дифузійний метод, але екстракт у фіксованих об'ємах вносять у лунки, а не вводять у диски[8].

Метод мікророзведення включає мікророзведення екстракту в рідкому середовищі за допомогою мікропланшетів для визначення значень мінімальної інгібуючої концентрації (MIC), мінімальної бактерицидної концентрації (MBC), яка також відома як мінімальна летальна концентрація (MLC), або концентрації, яка інгібує 50% бактеріального росту (IC50) [9]. Щодо четвертого методу, екстракт додають у культуральне середовище та визначають отримані колонієутворюючі одиниці (КУО). Інші біологічні аналізи, такі як проточна цитофлуориметрія та біолюмінесцентні методи, не використовуються широко, оскільки вони вимагають спеціального обладнання та подальшої оцінки відтворюваності та стандартизації[10].

					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. <i>ASPERGILLUS</i> SPP, ЯК ДЖЕРЕЛО ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ З АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЮ АКТИВНІСТЮ	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Мичкодан М. І.					10	135
Керівник		Стабніков В. П.				11		
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						

1.2. Антибактеріальні метаболіти з наземних *Aspergillus* spp.

Багато видів *Aspergillus* є активними продуцентами багатьох метаболітів промислового та фармацевтичного значення[11,12].Останнім часом зростає кількість грибів роду *Aspergillus*, які продукують нові біологічно активні сполуки, такі як похідні бутеноліду (як протизапальні засоби)[13], аурасперон Н (як протипухлинний засіб) [14], асперхондоли А і В (як антибактеріальні засоби) [15], аспергівони А і В (з протираковою та антибактеріальною активністю) [16]і аспохалазин В і D(як антибактеріальні засоби) [17].

Сполуку, названу CJ-17,665 (рис. 1.1), було виділено з ферментаційного бульйону *A. ochraceus* (CL41582), який виділено із зразка ґрунту, зібраного у Венесуелі. Ця сполука продемонструвала інгібуючий ефект проти мультирезистентних *S. aureus* (MDRSA), *S. pyogenes* і *E. faecalis* зі значеннями МІС 12,5, 12,5 і 25 мкг/мл відповідно [18]. Хімічна структура цієї сполуки містить дикетопіперазин і N-оксидний фрагмент індолу.

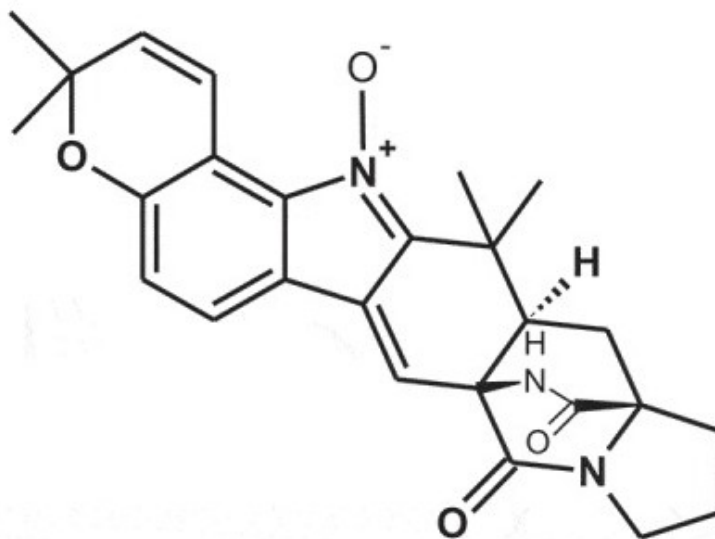


Рис. 1.1. Структурна формула сполуки CJ-17,665.

Хлороформні екстракти *A. fumigatus*, виділені із зразка ґрунту, зібраного в Пантаналі, Бразилія, показали антибактеріальну активність проти *S. aureus* і *M. luteus*, з IZD 20,7 і 39,3 мм відповідно. Антибактеріальна активність, виявлена для хлороформного екстракту культурального бульйону,

інкубованого без пулу бактерій, була нижчою, ніж виявлена для екстракту з пулом. Бензатин пеніцилін G використовувався як позитивний контроль із IZD 33 і >40 мм для *S. aureus* і *M. luteus* відповідно. Активні сполуки були виділені з бульйону культури, вирощеної в присутності об'єднаних бактерій, і ідентифіковані як 3,4-диметоксифенол (рис. 1.2) і 1,3,5-триметоксибензол (рис. 1.3) [19].

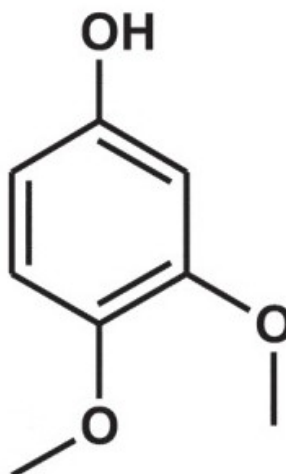


Рис. 1.2. Структурна формула сполуки 3,4-диметоксифенол.

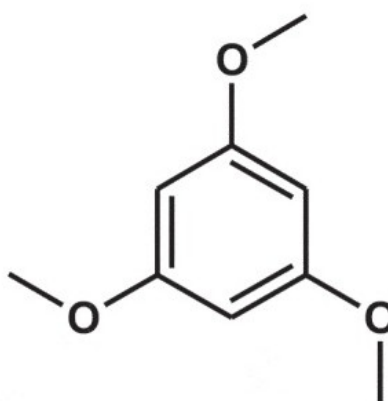


Рис. 1.3. Структурна формула сполуки 1,3,5-триметоксибензол.

Фракціонування екстракту *A. niger* (IFB-E003), ендofіта *Cyndon dactylon* (*Poaceae*), призвело до виділення нафто-γ-піронів: руброфузарин В, фонсецинон А, асперпірон В і аурасперон А (рис. 1.4). Чотири сполуки продемонстрували пригнічення росту флуоресценції *B. subtilis*, *E. coli* та *P. fluorescence* з МІК у діапазоні від 1,9 до 31,2 мкг/мл. Пеніцилін і амікацину

сульфат використовували як позитивний контроль (МІК = 0,45–3,9 мкг/мл)[20].

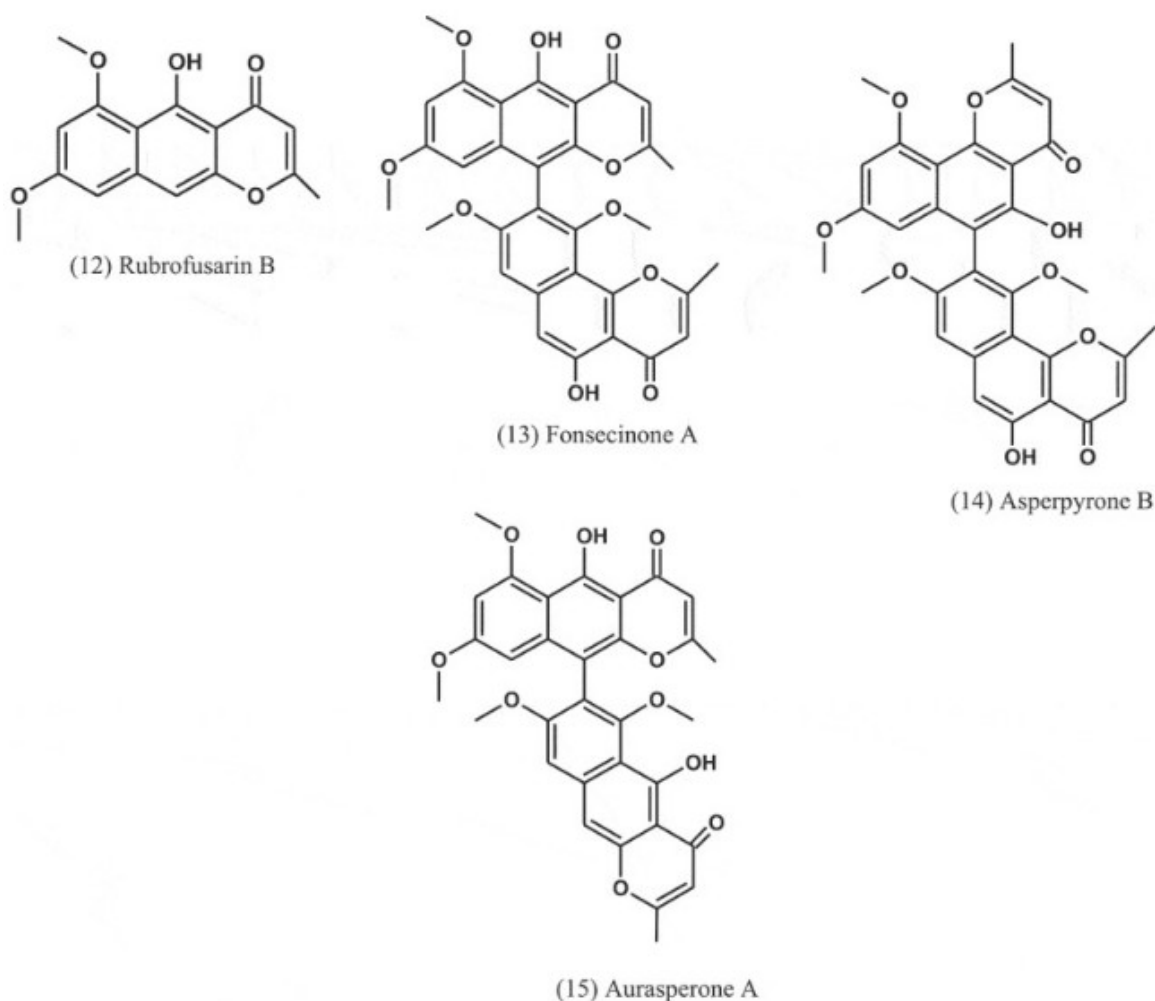


Рис. 1.4. Структурні формули сполук руброфузарин В, фонсецинон А, асперпірон В і аурасперон А.

Aspergillus ssp. (CY 725) було виділено з листя *C. dactylon* (*Poaceae*). За допомогою фракціонування етилацетатного екстракту цього гриба під контролем біоаналізу було виділено чотири вторинні метаболіти. Ці метаболіти були ідентифіковані як гел्वолінова кислота (рис. 1.5), монометилсулохрин, ергостерин і 3 β -гідрокси-5 α ,8 α -епідіокси-ергоста-6,22-дієн (рис. 1.6). Ці сполуки показали антибактеріальну активність проти *Helicobacter pylori*, але найактивнішою була гел्वолова кислота зі значенням МІК 8 мкг/мл[21].

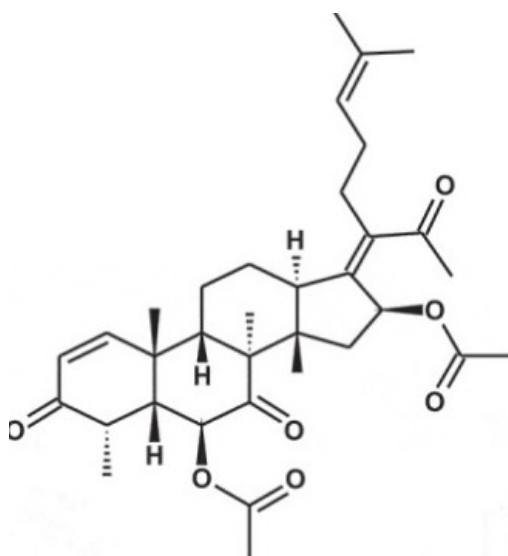


Рис. 1.5. Структурна формула гельволінової кислоти

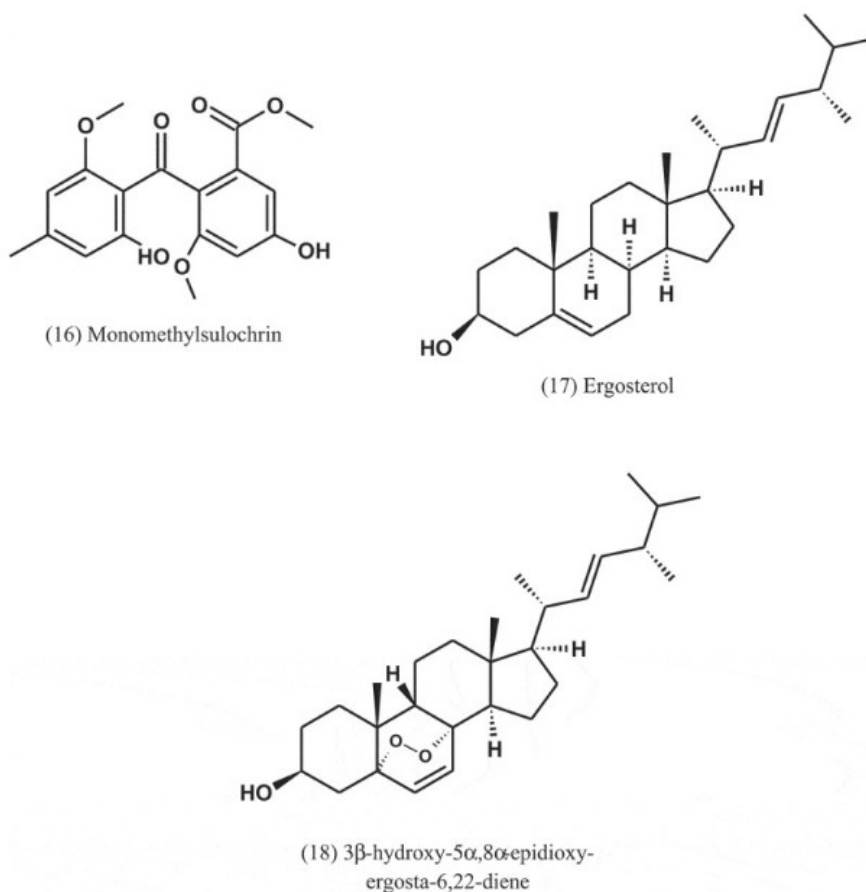


Рис. 1.6. Структурні формули сполук монометилсулохрин, ергостерин і 3β-гідрокси-5α,8α-епідіокси-ергоста-6,22-дієн.

Неочищений екстракт *A. fumigatus* (AF3-093A), ендofіта бурої водорості *Fucus vesiculosus* (*Fucaceae*), продемонстрував значну антибактеріальну активність у початкових тестах біоактивності. Фракціонування екстракту під контролем біоаналізу призвело до виділення флавіпіну, хетоглобозину А і

хетоглобозину В (рис. 1.7). Ці сполуки пригнічували ріст *S. aureus*, MRSA (метицилін-резистентний *Staphylococcus aureus*) та *M. tuberculosis* (H37Ra)[22].

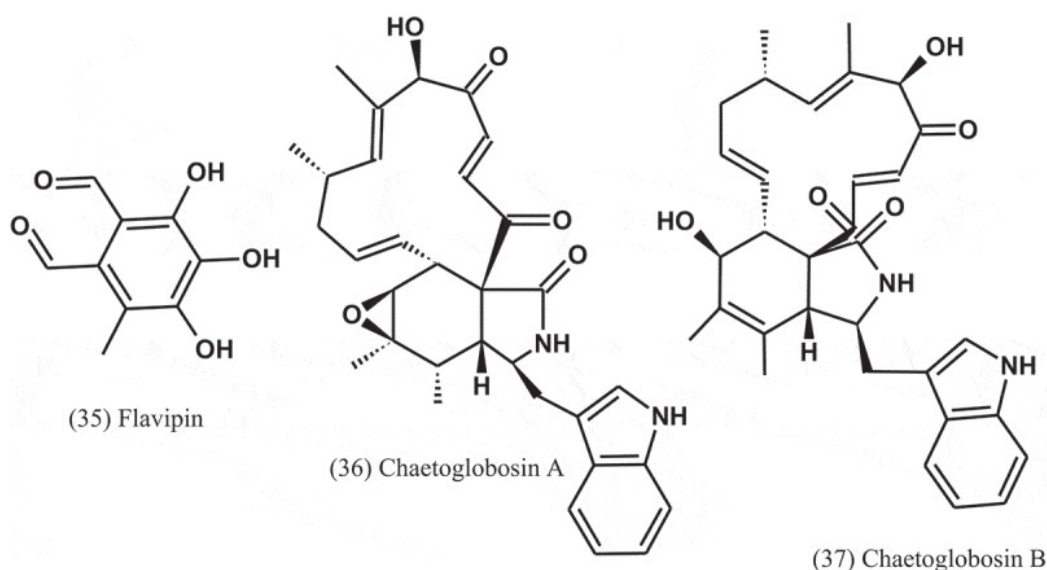


Рис. 1.7. Структурні формули сполук флавіпіну, хетоглобозину А і хетоглобозину В.

Вісім сполук було виділено з ендofітного гриба *A. terreus*, виділеного з коренів *Carthamus lanatus* (*Asteraceae*) [23]. Сполука (22E,24R)-стигмаста-5,7,22-трієн-3- β -ол (рис. 1.8), похідна стигмастерину, продемонструвала потужну активність проти MRSA зі значенням IC₅₀ 0,96 мкг/мл порівняно з ципрофлоксацином (IC₅₀ = 0,07 мкг/мл).

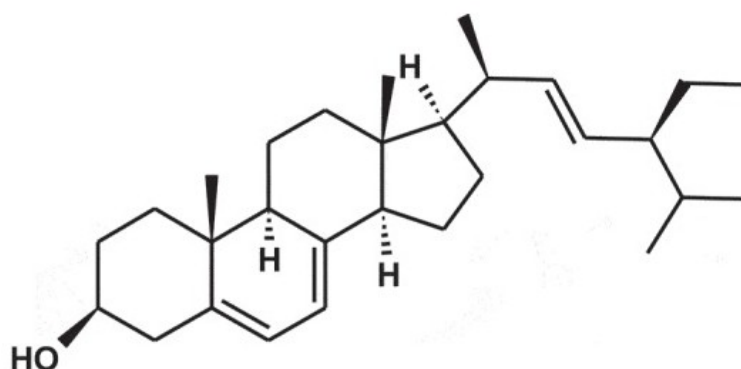


Рис. 1.8. Структурна формула (22E,24R)-стигмаста-5,7,22-трієн-3- β -ол.

Насіннєвий гриб *A. persii*(EML-HPB1-11), виділений із насіння ячменю (*Poaceae*), продукував пеніцилову кислоту (3-метокси-5-метил-4-оксо-2,5-гексادیєнова кислота) (рис. 1.9), який протестовано проти 12 фітопатогенних

бактерій. Усі протестовані бактеріальні патогени були сильно інгібовані цією сполукою, зі значеннями МІК 12,3–111,1 мкг/мл [24]. Хоча пеніцилова кислота має антибактеріальну дію, вона токсична для клітин людини, а галогенований фуранон має канцерогенну токсичність.

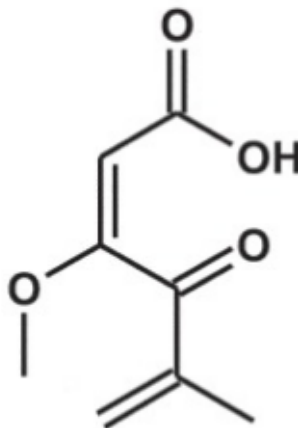


Рис. 1.9. Структурна формула пеніцилової кислоти.

У дослідженні, проведеному Ismaiel та ін. [25], емодин (рис. 1.10) був виділений з *A. awamori* (WAIR120; LC032125), який був виділений із зразка зерна пшениці, що зберігався, отриманого місцево з роздрібного супермаркету (Загайг, Єгипет). Ця сполука виявила антибактеріальну активність проти *E. faecalis* (AHR7) з МІК 125 мкг/мл. Було виявлено, що емодин викликає морфогенні ефекти, включаючи набряк і подовження бактеріальної клітини, як показано за допомогою світлової мікроскопії. Крім того, також спостерігалися клітинні ефекти, в яких емодин викликав значні зміни в природі клітинної мембрани та субмікроскопічній структурі бактеріальної клітини, як показано за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії.

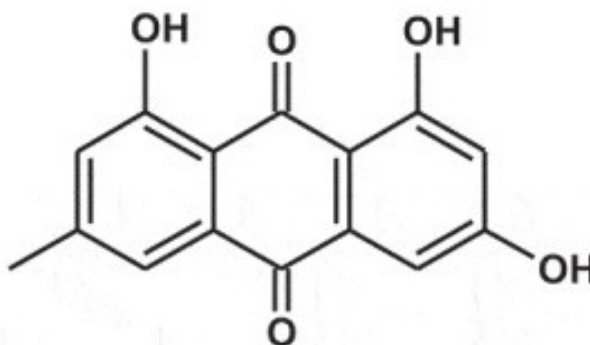


Рис. 1.10. Структурна формула сполуки емодин.

Етилацетатні екстракти грибів *A. flavus*, *A. fumigatus* і *A. niger*, виділені з ґрунту Байєрського університету Кано, були досліджені на їх антибактеріальну активність за допомогою дискового дифузійного аналізу. Екстракти показали інгібіторну активність проти *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli* та *P. aeruginosa*. Найвищу активність спостерігали метаболіти *A. fumigatus* на всіх досліджуваних бактеріях зі значеннями МІК 250 мкг/мл. Дослідження на хроматограмі виявило багато біологічно активних сполук, таких як олеїнова кислота і п-гексадеканова кислота, які, як відомо, мають антибактеріальну дію проти ряду бактерій [26].

Phainuphong та ін. [27] виявили, що пеніцилова кислота, виділена з гриба *A. sclerotiorum* (PSU-RSPG178), отриманого із зразка ґрунту з провінції Сураттані, Таїланд, має антибактеріальну активність проти *S. aureus* і *E. coli* з однаковою МІК значення 128 мкг/мл.

Багато штамів *Aspergillus* *ssp.* були виділені та культивовані з квітів етнолікарської рослини *Mitrephorawangii* (*Annonaceae*). Екстракт штаму *Aspergillus* *ssp.* (MFLUCC16-0845) продемонстрував широку активність проти багатьох бактеріальних патогенів, включаючи *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. agalactiae* (ATCC13813), *Bacillus subtilis* (ATCC 19659), *B. cereus* (ATCC 11778), *E. coli* (ATCC 25922), *S. typhi* (ATCC 14028), *K. pneumoniae* (ATCC 700603), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) і *S. flexneri* (ATCC 12022), із значеннями ІЗД та МІС 8,3 –13,4 мм та 15,62–500 мкг/мл відповідно. Пеніцилін використовувався як позитивний контроль і показав ІЗД та МІС 9,2–15,2 мм та 15,62–250 мкг/мл відповідно. Результати газової хромато-мас-спектрометрії свідчать про наявність багатьох грибкових метаболітів, але β-туяпліцин (рис. 1.11) мав найвищий вихід [28].

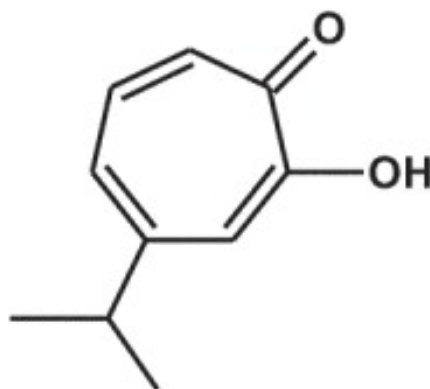


Рис. 1.11. Структурна формула сполуки β-туяпліцин.

Чотири сполуки, а саме ізOVERSICOLORIN C, ІЗОСЕКОСТЕРІГМАТОЦИСТИН, ГЛУЛІЗИН і ВЕРСІКОЛОРИН C, були виділені з ендofітного гриба *A. nidulans* (MA-143), отриманого з листя рослини, що походить з мангрових рослин *P. stylosa*. За допомогою аналізу на мікропланшеті ці сполуки перевірили на антибактеріальну дію проти трьох патогенів людини (*E. coli*, *M. luteus* і *Vibriovulnificus*) і чотирьох водних бактерій (*Edwardsiella ictaluri*, *Vibrioalginolyticus*, *V. anguillarum* і *V. parahaemolyticus*). Сполука ізOVERSICOLORIN C виявила потужну антибактеріальну активність проти *V. alginolyticus* і *E. ictaluri* зі значеннями МІК 1 і 4 мкг/мл відповідно, тоді як сполука ІЗОСЕКОСТЕРІГМАТОЦИСТИН виявила активність проти *E. coli*, *M. luteus*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, і *E. ictaluri*, зі значеннями МІК в діапазоні від 1 до 8 мкг/мл. Хлорамфенікол використовувався як позитивний контроль і демонстрував значення МІК у діапазоні від 0,5 до 8 мкг/мл[29].

З ендofітного гриба *A. versicolor*, отриманого з листя *Elaeocarpus decipiens* (*Elaeocarpaceae*), виділено 12 похідних сесквітерпеноїду бісаболану. Активність цих сполук перевіряли проти ентеробактеріального збудника рослин *E. carotovora* subsp. *carotovora*, і результати показали, що всі сполуки виявляли антибактеріальну активність із значеннями МІК у діапазоні від 15,2 до 85,2 мкг/мл [30].

У специфічних умовах культивування ендofіт *A. fumigatus* (CBA2743), отриманий з рослини *Copaifera multijuga* (*Fabaceae*), вивільняв метаболіти у ферментаційний бульйон. Фракції ферментаційного бульйону були отримані

різними хроматографічними методами та перевірені на *Mycobacteriumsmegmatis* і *M. tuberculosis*. Результати показали, що фракція F4 мала позитивну антимікобактеріальну активність із значенням МІК 256 мкг/мл [31].

1.3. Антибактеріальні властивості екстрактів з наземних *Aspergillus* spp.

Неочищений етилацетатний екстракт *A. fumigatus*, виділений з рослини *Garciniaspp.* (*Clusiaceae*), перевіряли на антибактеріальну активність. Він продемонстрував антибактеріальну активність проти *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Shigella flexneri* та *S. aureus* із IZD 16, 18, 20, 11 та 16 мм відповідно [32].

Al-Shaibani та ін. [33] вивчали інгібуючу дію культурального фільтрату *A. niger*, отриманого із запалених очей пацієнтів, проти *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* та *Bacillus* spp., виділених від пацієнтів із мікробним кератитом, які навчався в лікарні IbnAl-Haitham Eye Teaching Hospital, Багдад, Ірак. Результати показали, що *A. niger* має інгібуючу дію проти *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* і *Bacillus* spp., з IZD 15, 25, 30 і 32 мм відповідно.

Aspergillus spp. був виділений з коренів і листя *Triticum durum* (*Poaceae*), зібраних з регіону Бордж-Бу-Арперідж (Алжир). Антибактеріальну активність свіжого етилацетатного екстракту цього гриба оцінювали за допомогою агарового дифузійного аналізу проти 12 патогенних бактерій. За винятком *Enterobacter agglomerans*, *P. aeruginosa* та *Citrobacter freundii*, результати виявили інгібіторну активність проти досліджуваних бактерій із IZD 11,3–21,7 мм, а найбільша зона становила 21,7 мм щодо *E. coli* [34].

З листків і стебел рослин *Suaeda maritima* і *S. monoica* (*Amaranthaceae*) виділено багато ендоефітних грибів. Серед цих грибів виділено *A. terreus* (SM-EF 3) та *A. flavus* (SM-EF 2). Культури цих грибів екстрагували етилацетатом і використовували як неочищений екстракт для перевірки їх антибактеріальної активності методом дифузії вагарових лунках. Екстракт *A. terreus* показав антибактеріальну активність із IZD 11,6, 10,3, 10, 9,3, 9, 8,6 і

5,6 мм проти *S. typhi*, *S. aureus*, *V. cholera*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. paratyphi* і *Klebsiella oxytoca* відповідно. Екстракт *A. flavus* продемонстрував антибактеріальну активність проти *S. paratyphi*, *P. mirabilis* і *S. aureus* з IZD 7, 5,3 і 5,6 мм відповідно [35].

Неочищений екстракт ендofітного гриба *A. niger*, виділеного з листя *Opuntia dillenii* (*Cactaceae*), був досліджений на його антибактеріальний потенціал проти п'яти видів бактерій. Екстракт грибів виявив активність проти *S. aureus*, *B. subtilis* і *E. coli* з IZD 9, 15 і 7 мм відповідно [36].

Неочищений екстракт, отриманий з ендofітного гриба *A. tubingensis*, виділеного з поверхнево стерилізованого талому лишайника *Parmeliacapitata* (*Parmeliaceae*), аналізували проти шести клінічно значущих бактеріальних патогенів. Екстракт виявив значну антибактеріальну активність проти *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *S. flexneri* та *K. pneumoniae*, з IZD 20,3, 16,5, 18,0, 15,7, 13,0 та 15,6 мм відповідно [37].

Досліджено антибактеріальну активність ендofітного гриба *A. tamarii* (SRRC 108818S), виділеного з гриба *Lycoperdonumbrinum* (*Agaricaceae*). У концентрації 200 мг/мл етилацетатний екстракт цього гриба виявив активність проти *S. typhi* (ATCC33458), *S. aureus* (ATCC6538), *B. subtilis* (ATCC6633) і *E. coli* (ATCC25922), з IZD 15,5, 14,5, 14 і 23 мм відповідно. Гентаміцин використовувався як позитивний контроль із IZD 16–18 мм [38].

Здатність *A. fumigatus*, виділеного з корінного ґрунту Судану, синтезувати антибактеріальні сполуки перевірили HassantaBakhiet [39]. Неочищений екстракт (5%) гриба виявляв активність проти *Salmonellatyphimurium*, *Listeriamonocytogenes* і *P. aeruginosa* з IZD 8, 19 і 25 мм відповідно.

За допомогою методу дифузії в агар досліджено антибактеріальну активність екстрактів міцелію ендofітів грибів *A. fumigatus* і *A. niger*, виділених з різних лікарських рослин, щодо деяких видів бактерій. *A. fumigatus* продемонстрував інгібування з IZD 9, 9, 6, 13, 8 і 6,5 мм проти *Proteus mirabilis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* і *P.*

fluorescense відповідно, тоді як *A. niger* показав найнижче інгібування, з IZD в діапазоні від 2 до 6 мм. Тетрациклін використовувався як позитивний контроль із IZD у діапазоні від 13 до 21 мм [40].

Mishra та ін. [41] помітили, що етилацетатний екстракт ендоефітного гриба *A. clavatonanicus* (MJ31), виділеного з коренів *Mirabilisjalapa* (*Nyctaginaceae*), демонструє антибактеріальний потенціал проти *B. subtilis*, *M. luteus* і *S. aureus* з MIC 0,078 0,156 та 0,312 мг/мл відповідно.

У різних концентраціях грибковий екстракт *A. niger* (MTCC-961), отриманий з MicrobialTypeCultureCollection, Чандігарх, Індія, був перевірений на його антибактеріальну активність проти восьми видів бактерій за допомогою методу дифузії в агарі. Результати показали антибактеріальну активність із діапазоном IZD від 11 до 18 мм при концентрації 100 мкг/мл. Також було виявлено, що активність залежить від концентрації. Гентаміцин використовувався як позитивний контроль і демонстрував IZD від 15 до 19 мм [42].

A. oryzae (DBM4336), отриманий з кафедри біохімії та мікробіології (DBM), Хіміко-технологічного університету (Прага, ЧеськаРеспубліка), був перевірений на його антибактеріальну активність. При екстракції різними розчинниками антибактеріальні властивості екстрактів грибів перевіряли проти семи видів бактерій методом дискової дифузії. За результатами дослідження було виявлено, що різні розчинники, використані для приготування екстрактів міцелію, дають різний ступінь інгібуючої активності. Для цього було встановлено, що етанольний екстракт був активним проти всіх семи використаних досліджуваних бактерій, з IZD в діапазоні від 1 до 10 мм, тоді як водний екстракт виявився неактивним [43].

Екстракти різних ендоефітних грибів *A. nomius*, *A. oryzae*, *A. niger*, *A. terrus* та *A. nidulans*, виділених із різних частин (листя, стеблатакореня) *Calotropisprocera* (Аросупасеае), оцінювали на їх антибактеріальний потенціал проти дев'яти штамів бактерій. Випробувані екстракти показали

активність проти всіх досліджених штамів бактерій, з IZD в діапазоні від 10 до 17,3 мм і MIC в діапазоні від 15,6 до 250 мкг/мл [44].

Десять видів *Aspergillus* були виділені із зразків ґрунту, отриманих із двох різних регіонів Алжиру, а саме: Лагуаті Телегма. Десять видів були ідентифіковані як *A. fumigatus*, *A. niveus*, *A. goesii*, *A. fumigatiaffinis*, *A. quadrilineatus*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. sclerotiorum* і *A. niger*. Використовуючи метод дискової дифузії, екстракти цих грибів виявляли активність проти *S. aureus* (ATCC 25923), *B. subtilis* (ATCC 6633) і *E. coli* (ATCC 25922), з IZD в діапазоні від 7 до 31,7 мм і найвищою активністю була *A. Fumigates* проти *S. aureus*, з IZD 31,7 мм. Екстракти всіх видів не виявляли активності на *P. aeruginosa* (ATCC 9027), за винятком екстрактів *A. Niveus* і *A. goesii*, з IZD 8 і 7 мм відповідно [45].

Екстрактети лацетату *A. niger*, виділений із коренів шипшини *Rhizophora apiculata* (*Rhizophoraceae*) уздовж Південного Андаманського узбережжя, Індія, досліджували на біоактивність проти п'яти патогенних штамів бактерій: *S. aureus* (MTCC96), *M. luteus* (MTCC106), *P. aeruginosa* (MTCC326), *E. faecalis* (MTCC439) та *P. mirabilis* (MTCC1429) методом дискової дифузії. Чутливість штамів варіювалася від *P. mirabilis*, який був найбільш чутливим, за ним йшли *P. aeruginosa*, *M. leuteus*, *S. Aureus* і *E. Faecalis* у порядку зменшення, з IZD коливався від 15 до 23 мм [46].

Далі наведена узагальнююча таблиця (табл. 1.1) антибактеріальних засобів, отриманих з наземних *Aspergillus* spp.

Таблиця 1.1

Антибактеріальні засоби, отримані з наземних *Aspergillus* spp.

Вид грибів	Антибактеріальна речовина	Чутливі бактерії (MIC, IZD або IC50)	Літ-ра
<i>Aspergillus</i> sp.	Етилацетатний екстракт міцелію та культуральний фільтрат	Екстракт міцелію: (<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , та <i>P. aeruginosa</i> ; IZD = 8.6–12 мм) Культуральний фільтрат: (<i>P. aeruginosa</i> та <i>K. pneumoniae</i> ; IZD = 13 та 15 мм).	[47]

<i>A. fumigatus</i>	Етилацетатний екстракт міцелію	<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Shigella flexneri</i> , та <i>S. aureus</i> (IZD = 16, 18, 20, 11, та 16 мм, відповідно).	[32]
<i>Aspergillus</i> sp. (EJC08)	Фумігаклавін С і псевдотин А	Фумігаклавін С: (<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> та <i>S. aureus</i> (MIC = 7,81, 62,5, 31,25 та 15,62 мкг/мл відповідно). Псевротин А: (<i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> та <i>S. aureus</i> (MIC = 15,6, 31,3, 31,3 та 15,6 мкг/мл відповідно).	[48]
<i>A. niger</i>	Культуральний фільтрат	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> і <i>Bacillus</i> sp. (IZD = 15, 25, 30 і 32 мм відповідно).	[33]
<i>Aspergillus</i> sp.	Етилацетатний екстракт міцелію	Грамположитивні та грамнегативні бактерії (IZD = 0–21,7 мм).	[34]
<i>Aspergillus</i> sp. (KJ-9)	Діангідро-аурасперон С, фонсецінон А, асперазин, руброфузарин В і (R)-3-гідроксибутанонітрил	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , та <i>S. aureus</i> (MIC = 25–50 мкМ).	[49]
<i>A. fumigatiaffinis</i>	Неосарторін	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> і більшість стрептококів (MIC = 4–8 мкг/мл).	[50]
<i>Aspergillus</i> sp.	Ергостерол, церевістерол, 5-гідроксиметилфуран-3-карбонова кислота, алантоїн, трипацідин і монометилсулохрин	Алантоїн виявив найбільшу активність з MIC 1 мкг/мл проти <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhimurium</i> та 2 мкг/мл проти <i>B. subtilis</i> , <i>Staphylococcus faecalis</i> та <i>E. coli</i> .	[51]
<i>A. terreus</i> (SM-EF 3)	Етилацетатний екстракт міцелію	<i>S. typhi</i> , <i>S. aureus</i> , <i>V. cholera</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. paratyphi</i> та <i>Klebsiella oxytoca</i> (IZD = 11,6, 10,3, 10, 9,3, 9, 8,6 і 5,6 мм відповідно)	[35]
<i>A. flavus</i> (SM-EF 2)	Етилацетатний екстракт міцелію	<i>S. paratyphi</i> , <i>P. mirabilis</i> і <i>S. aureus</i> (IZD = 7, 5,3 і 5,6 мм відповідно).	[35]
<i>Aspergillus</i> sp. (IFB-YXS)	Ксантоасцин	<i>Clavibacter michiganense</i> subsp. <i>sepedonicus</i> (MIC = 0,31 мкг/мл).	[52]
<i>A. niger</i>	Етилацетатний екстракт міцелію	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> і <i>E. coli</i> (IZD = 9, 15 і 7 мм відповідно).	[36]

Продовження таблиці 1.1

<i>A. fumigatus</i> (AF 3-093A)	Флавіпін, хетоглобозин А і хетоглобозин В	<i>S. aureus</i> , MRSA, та <i>M. tuberculosis</i> (H37Ra).	[22]
<i>A. terreus</i>	(22E,24R)-стигмаста- 5,7,22-трієн-3-β-ол	MRSA (IC ₅₀ = 0,96 мкг/мл).	[23]
<i>A. persii</i> (EML-HPB1-11)	Пеніцилова кислота	Дванадцять фітопатогенних бактерій (MIC = 12,3–111,1 мкг/мл).	[24]
<i>A. awamori</i> (WA IR120; LC032 125)	Емодин	<i>E. faecalis</i> (AHR7) (MIC = 125 мкг/мл).	[25]
<i>A. tubingensis</i>	Етилацетатний екстракт культурального фільтрату	<i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. flexneri</i> і <i>K. pneumonia</i> (IZD = 20,3, 16,5, 18, 15,7, 13 і 15,6 мм відповідно).	[37]
<i>A. tamarii</i> (SRR C 108818S)	Етилацетатний екстракт міцелію	<i>S. typhi</i> (ATCC33458), <i>S. aureus</i> (ATCC6538), <i>B. subtilis</i> (ATCC6633), <i>E. coli</i> (ATCC25922) (IZD = 15,5, 14,5, 14 і 23 мм відповідно)	[38]
<i>A. fumigatus</i>	Ацетонітрильний екстракт культурального фільтрату	<i>S. typhimurium</i> , <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> і <i>P. aeruginosa</i> (IZD = 8, 19 і 25 мм відповідно).	[39]
<i>A. fumigatus</i> та <i>A. niger</i>	Етилацетатний екстракт міцелію	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> і <i>P. fluorescense</i> (IZD <i>A. fumigatus</i> = 9, 9, 6, 13, 8 і 6,5 мм відповідно, тоді як IZD <i>A. niger</i> = 2–6 мм).	[40]
<i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , та <i>A. niger</i>	Етилацетатний екстракт культурального фільтрату	<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> та <i>P. aeruginosa</i> (найвищу активність мав <i>A. fumigatus</i> , з MIC 250 мкг/мл).	[26]
<i>A. clavatonanicus</i> (MJ31)	Етилацетатні екстракти міцелію та культуральний фільтрат	<i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> і <i>S. aureus</i> (MIC = 0,078, 0,156 і 0,312 мг/мл відповідно).	[41]

<i>A. niger</i> (MTCC-961)	Етилацетатний екстракт культурального фільтрату	Грампозитивні та грамнегативні бактерії (IZD = 11–18 мм).	[42]
<i>A. oryzae</i> (DBM4 336)	Етилацетатний і спиртовий екстракти міцелію	Грампозитивні та грамнегативні бактерії (IZD = 1–10 мм за етанолом).	[43]
<i>Aspergillus</i> spp.	Хлороформний екстракт культурального фільтрату	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923), <i>B. subtilis</i> (ATCC 6633) і <i>E. coli</i> (ATCC 25922) (IZD = 7–31,67 мм).	[45]
<i>A. sclerotiorum</i> (PSU-RSPG178)	Пеніцилова кислота	<i>S. aureus</i> і <i>E. coli</i> (MIC = 128 мкг/мл для кожного).	[27]
<i>A. niger</i>	Етилацетатний екстракт міцелію	<i>S. aureus</i> (MTCC96), <i>M. luteus</i> (MTCC106), <i>P. aeruginosa</i> (MTCC326), <i>E. faecalis</i> (MTCC439), та <i>P. mirabilis</i> (MTCC1429) (IZD = 15–23 мм).	[46]
<i>Aspergillus</i> sp.	Етилацетатний екстракт культурального фільтрату	Грампозитивні та грамнегативні бактерії (IZD = 9,2–15,2 мм і MIC = 15,62–250 мкг/мл).	[28]

РОЗДІЛ 2. ЕМОДИН: ВЛАСТИВОСТІ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ У ФАРМАЦЕВТИЧНІЙ ГАЛУЗІ

2.1. Фармакологія.

2.1.1. Протиракова активність. Індукція апоптозу емодином істотно пригнічувало клітинний ріст чотирьох клітинних ліній раку сечового міхура шляхом модуляції епігенетичних модифікацій залежно від дози та часу [53]. В іншому дослідженні було показано, що емодин ($IC_{50} = 3,70$ мкм) модулює експресію пов'язаних з апоптозом генів, щоб індукувати пригнічення росту та апоптозу клітинах A549. Лікування емодином допомогло підвищити апоптоз у клітинах A549 шляхом посилення експресії гена ліганду Fas (FASL) і призупинити відновлення пошкоджень у клітинах A549 через зниження експресії гена C-MYC [54]. Емодин може індукувати пригнічення росту та апоптоз у клітинах MCF-7 через модуляцію експресії пов'язаних з апоптозом генів. Експресія гена FASL регулювалася вгору, хоча рівні експресії MCL1, CCND1 і C-MYC були знижені [55].

Емодин ефективно блокував активність самовідновлення стовбурових клітин гліоми шляхом пригнічення ключових сигнальних шляхів стовбурових клітин, що включають Notch-1, b-катеніні STAT3. Емодин індукував протеосомну деградацію EGFR/EGFRvIII, перешкоджаючи його асоціації з Hsp90, що призводило до часткової індукції апоптозу та сенсibiliзації стовбурових клітин гліоми до іонізуючого випромінювання [56]. Wang та ін. повідомили, що емодин пригнічує проліферацію клітин HeLa раку шийки матки людини, індукуючи апоптоз через внутрішні мітохондріальні та зовнішні шляхи рецепторі в смерті [57]. Крім того, повідомлялося, що емодин посилює пов'язаний з TNF апоптоз, індукований лігандом, шляхом індукції рецепторів смерті та зниження регуляції білків

					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. ЕМОДИН: ВЛАСТИВОСТІ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ У ФАРМАЦЕВТИЧНІЙ ГАЛУЗІ				Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.	Мичкодан М. І.										26	27 ¹³⁵
Керівник	Стабніков В. П.											
Реценз.												
Н. Контр.												
Затверд.	Стабніков В. П.											
					Кафедра БТМ							

виживання клітину клітинах гепатоцелюлярної карциноми [58].

Емодин істотно пригнічував проліферацію клітин раку молочної залози шляхом зниження рівня білка ER α . Хіетайн. продемонстрували, що спровокований емодином окислювальний стресс індукує апоптозу клітинах HCT116 раку товстої кишки людини за допомогою p53-мітохондріального апоптотичного шляху [59]. Подібне дослідження показало, що емодин може пригнічувати ріст клітин колоректального раку LOVO через регуляцію співвідношення Bcl-2/Bax і впливаючи на шлях мітохондріального апоптозу.

Передача сигналів Wnt бере участь у регуляції клітинної проліферації, диференціації та апоптозу. Емодин пригнічував сигнальний шлях Wnt у клітинах колоректального раку людини (SW480 і SW620) шляхом зниження транскрипційної активності T-клітинного фактора/лімфоїдного енансерного фактора [60].

Ліа та ін. вперше продемонстрували, що емодин пригнічує легеневі метастази раку молочної залози шляхом інгібування рекрутингу макрофагів і поляризації M2 у легенях шляхом зменшення фосфорилування STAT6 і експресії ССААТ/енхансер-зв'язуючого білка β [61]. В іншому дослідженні лікування комбінацією емодину (10, 20, 40 і 80 мкм) і куркуміну (10 мкм) пригнічувало проліферацію та інвазію клітин раку молочної залози шляхом збільшення експресії miR-34a. Було показано, що емодин пригнічує інвазивність клітин раку молочної залози людини *in vitro* та *in vivo* шляхом антагонізації P2X7R. Крім того, емодин залежно від дози пригнічував міграцію та інвазію клітин MDA-MB-231 раку молочної залози людини шляхом понижувальної регуляції експресії MMP-2, MMP-9, uPA і uPAR і шляхом зниження активності p38 і позаклітинних регульованих протеїнкіназ. (ERK).

Лікування емодином значно пригнічувало метастази в легенях в ортотопічній моделі гепатоцелюлярної карциноми мишей і експресію CXCR4 в пухлинних тканинах. Way та ін. продемонстрували, що емодин суттєво

пригнічує міграцію та інвазію клітин, спричинену TWIST1, шляхом інгібування шляхів β -катеніну та Akt [62].

Зупинка клітинного циклу. Для дослідження інгібуючої дії емодину на лінію клітин гепатоми людини SMMC-7721 використовували МТТ-аналіз, проточну цитометрію та електронну мікроскопію. Результати показали, що проліферація клітин SMMC-7721 пригнічувалася залежно від часу та концентрації, що клітини у фазі G2/M значно зросли, а частка клітин у фазі S поступово зменшувалася [63].

Реверсія мультирезистентності. Надмірна експресія множинної лікарської стійкості (MDR) у пухлинних клітинах створює серйозну перешкоду для успішної хіміотерапії. Дослідження показують, що емодин може сенсифілізувати пухлинні клітини до хіміотерапевтичних агентів за допомогою інгібуючих шляхів. Одночасне лікування емодином/цисплатином пригнічувало ріст клітин карциноми яєчників людини та клітин карциноми жовчного міхура *in vivo*. Цей механізм може включати зниження експресії MRP1 і експресії ABCG2. Крім того, комбінація емодину (25 мкм) і цисплатину (3,0 мкм) викликала відносно більший інгібуючий ефект на клітини раку шлунка, ніж індивідуальне лікування емодином або цисплатином шляхом індукції апоптозу та зупинки клітинного циклу [64].

Chen та ін. показали синергічний ефект інгібування росту азидотимідину та емодину в клітинах K562/ADM. Цей ефект може бути опосередкований зупинкою S-клітинного циклу та зниженням експресії mPDK/p-gr білка MDR1. Крім того, рівні експресії гена та білка ядерного фактора- κ B (NF- κ B), X-зв'язаного інгібітора апоптозу та сурвівіну були пригнічені в клітинах Vxrc-3/Gem, оброблених комбінацією емодину та гемцитабіну [65].

Емодин пригнічує клітинний ріст кількох типів ракових клітин і регулює гени та білки, пов'язані з контролем клітинного апоптозу, клітинної інвазії, метастазування та зупинки клітинного циклу. Крім того, синергетичне посилення апоптозу є важливим у комбінації хіміотерапевтичних засобів для лікування раку і привернуло увагу як багатообіцяючий шлях лікування.

2.1.2. Протизапальна активність. Ядерний фактор-кВ бере участь у транскрипції різних прозапальних генів, які беруть участь у прогресуванні захворювання. Протизапальну дію емодину пов'язують із пригніченням прозапального фактора транскрипції NF-кВ. З'ясовано, що протизапальні активні компоненти мазі для видалення рубців Jiashitang, включаючи сафіомін, емодин, сальвіанолову кислоту, таншинон і похідні тритерпеноїдного сапоніну. Серед цих активних інгредієнтів було передбачено, що емодин справлятиме інгібуючі ефекти NF-кВ через мітоген-активовану протеїнкіназу (МАРК), шляхи PI3K/АКТ і NIK-IKK. У мишачої моделі артриту, індукованого колагеном, емодин продемонстрував свою антиартритну дію через інгібування шляху NF-кВ і прозапальних медіаторів. Крім того, емодин може покращити структуру рогівки та зменшити пошкодження рогівки шляхом пригнічення активації NF-кВ, c-JunN-терміналкинази (JNK) та експресії ICAM-1. У групі моделі важкого гострого панкреатиту (SAP) лікування емодином суттєво зменшувало експресію Вір, інозитол-вимагаючого-1α (IRE1α), фактора 2, пов'язаного з рецептором TNF, і ASK1 та пригнічувало фосфорилювання JNK і p38 МАРК шляхом інгібування датчиків стресу ER IRE1α та його нижчі молекули. Jia та ін. виявили, що емодин може зупинити перехід від простого стеатозу до неалкогольного стеатогепатиту шляхом пригнічення передачі сигналів Erk1/2 і p38 в експериментах *in vitro*[66].

Звіти також показали, що емодин відіграє захисну роль у щурів із гострим некротичним панкреатитом, підвищуючи рівні експресії mCD14 та пригнічуючи рівні експресії TNF-α, IL-6 та IL-1β [67]. У мишачому маститі, спричиненому ліпополісахаридом (ЛПС), емодин може зменшити спричинене ЛПС ушкодження молочної залози та запальну клітинну інфільтрацію, зменшити активацію мієлопероксидази (МПО) у молочній залозі, знизити експресію TNF-α, IL-6 та IL-1β і активують PPAR-γ залежно від дози. Подібне дослідження показало, що емодин значно знизив рівні TNF-α, IL-6, МПО, малонового діальдегіду (MDA), CINC-1, MIP-2 та ICAM-1.

Однак рівні оксиду азоту та індукцйбельної синтази оксиду азоту були помітно підвищені.

Емодин може послабити набряк легень і запалення, посилити функцію альвеолярного епітелію та сприяти експресії клаудину-4, клаудину-5 і окклюдину в легеневиx тканинах. Крім того, лікування емодином ефективно пригнічувало спричинене алергеном запалення шляхом зниження імунної відповіді Th2, пригнічення експресії MMP-9 та індукції експресії HO-1 у мишачій моделі астми [68]. Вважається, що LT, синтезовані за допомогою реакції 5-LOX, відіграють важливу роль у розвитку atopічного дерматиту, і продемонстрували, що емодин має інгібіторну дію на 5-LOX.

Результати дослідження свідчать про те, що емодин здатний пригнічувати активацію NF-κB, JNK, p38 MAPK, Erk1/2 і 5-LOX, пригнічуючи експресію TNF-α, IL-6, IL-1β, MPO, MDA, CINC-1, MIP-2, ICAM-1 і MMP-9 і підвищення рівнів mCD14, оксиду азоту та індукцйбельної синтази оксиду азоту. Було показано, що емодин демонструє потенційний терапевтичний ефект при лікуванні та профілактиці різних запальних захворювань.

2.1.3. Протівірусна активність. Важкий гострий респіраторний синдром (SARS) — це інфекційне захворювання, що розвивається, та спричинене новим коронавірусом. У моделі ооцитів Xeporus емодин міг пригнічувати іонний канал коронавірусів SARS-CoV і HCoV-OC43 і пригнічувати вивільнення вірусу з HCoV-OC43 зі значенням K_{1/2} приблизно 20 мкм [63]. Крім того, емодин значною мірою блокував взаємодію S-білка та ACE2 залежно від дози та пригнічував інфекційність ретровірусу з псевдотипованим S-білком для клітин VeroE6. Результати свідчать про те, що емодин можна розглядати як потенційний провідний терапевтичний засіб у лікуванні SARS. Вперше продемонстровано, що емодин має слабкий, але тривалий інгібуючий ефект на реплікацію HBV *in vivo*. Експерименти *in vitro* показали, що дія емодину на клітини HepG-2 призвела до залежного від часу та концентрації інгібування реплікації ДНК вірусу гепатиту В та секреції

поверхневого антигену гепатиту В. Подібним чином емодин зменшив проникнення та реплікацію вірусу Коксакі В4 у клітинах HepG-2 залежно від концентрації та часу. Результати показали, що емодин може діяти як інгібітор біологічного синтезу проти інфекції, спричиненої вірусом Коксакі В4, а не безпосередньо інактивувати віруси або блокувати їх поглинання чутливими клітинами [64]. У біохімічному аналізі емодин специфічно інгібував нуклеазну активність лужної нуклеази UL12 вірусу простого герпесу-1. Крім того, емодин має протівірусну дію через руйнування подвійного фосфоліпідного шару та інгібування СК2.

Таким чином, ці результати свідчать про те, що емодин може бути потужним вірусним інгібітором із широким спектром протівірусної дії, що вказує на те, що емодин може діяти як протівірусний препарат, блокуючи вірусну інфекцію та реплікацію залежно від часу та концентрації.

2.1.4. Антибактеріальна активність. Емодин продемонстрував помітну бактеріостатичну дію на досліджувані грампозитивні бактерії, особливо *Bacillus subtilis* і *Staphylococcus aureus*. Значення біологічно активної мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) емодину становили 28,9 і 14,4 мкм. Однак емодин не був активним проти двох грамнегативних бактерій (*Klebsiella pneumoniae* та *Escherichia coli*) у найвищій дослідженій концентрації (1851,9 мкм). Подібним чином повідомлялося, що емодин виявляє антимікобактеріальну дію та антибактеріальну дію широкого спектру, зокрема проти *M. tuberculosis* (найнижча МІК = 0,9 мкм) та грампозитивних бактерій (найнижча МІК < 14,8 мкм) клінічного походження [65]. Сао та ін. досліджували антиметицилінрезистентну активність *S. aureus* (анти-MRSA) і хімічний склад ефірних екстрактів з *RhizomaPolygoniCuspidati* (ET-RPC). Результати показали, що ET-RPC може значно пригнічувати ріст бактерій штамів MRSA. Крім того, емодин було ідентифіковано як основну сполуку з активністю проти MRSA, яка була пов'язана з руйнуванням цілісності клітинної стінки та клітинної мембрани [66].

Емодин також значно пригнічував ріст, утворення кислоти та синтез нерозчинного глюкану *Streptococcus mutans* *in vitro* та пригнічував розвиток карієсу зубів у щурів. Результати показали, що природна сполука емодин може бути новим фармакологічним засобом для профілактики та лікування карієсу [67].

Загалом, як і багато рослинних мономерів, емодин має потенційні антимікробні властивості. Сам емодин може бути використаний як потенційна провідна сполука для подальшого відкриття антибактеріальних ліків.

2.1.5. Протиалергічна активність. Алергічні реакції запускаються, коли алергени з'єднуються з високоафінним рецептором IgE (FcεRI) на тучних клітинах. Для оцінки протиалергічної активності емодину використовували тваринну модель пасивної анафілаксії *in vivo* та тучні клітини кісткового мозку миші *in vitro*, щоб дослідити механізм його дії на тучні клітини. Результати показали, що емодин послаблював залежну від мастоцитів пасивну анафілактичну реакцію у мишей, сенсibilізованих до IgE. Таким чином, емодин інгібував активацію тучних клітин і, таким чином, анафілактичну реакцію через пригнічення рецептор-проксимальних Syk-залежних сигнальних шляхів [68].

Збільшення внутрішньоклітинної концентрації кальцію (Ca^{2+}) також запускає дегрануляцію, минаючи активацію рецепторів. Емодин суттєво пригнічував продукцію та дегрануляцію TNF-α через регуляцію активації IKK2 і PKC, що свідчить про те, що емодин пригнічує активацію тучних клітин через проксимальний сигнальний шлях, опосередкований FcεRI, і через сигнальний шлях, опосередкований припливом Ca^{2+} [69]. У клітинах базофільного лейкозу щурів (RBL-2H3) Wang та ін. оцінили інгібуючі ефекти емодину на опосередковану IgE алергічну відповідь шляхом вимірювання вивільнення гранул і цитокінів. Емодин пригнічував дегрануляцію та вироблення цитокінів шляхом підвищення стабільності клітинної мембрани та інгібування позаклітинного надходження Ca^{2+} [70].

Емодин суттєво пригнічує дегрануляцію тучних клітин за допомогою FcεRI або стимуляції кальцієвим іонофором, що свідчить про те, що емодин може бути розроблений як терапевтичний засіб для негайних і хронічних алергічних захворювань.

2.1.6. Антидіабетична активність. Останні дослідження показали, що емодин має активуючий ефект PPAR γ . Внутрішньоочеревинні ін'єкції емодину протягом 3 тижнів помітно полегшили симптоми у хворих на цукровий діабет тварин, і цей ефект, ймовірно, був пов'язаний із регуляцією шляху PPAR γ [71]. Подібне дослідження показало, що емодин ефективно зменшує надмірну активацію p38 і гіпоскоротність у мезангіальних клітинах, індукованих високим вмістом глюкози, шляхом активації PPAR γ . У диференційованих адипоцитах 3 T3-L1 емодин демонстрував високу афінність зв'язування з PPAR γ шляхом індукції збільшення поглинання глюкози та збільшення експресії мРНК GLUT1 і GLUT4.

Повідомлялося, що емодин є новим активатором протеїнкінази (AMPK), що активується АМФ. Емодин позитивно вплинув на метаболізм глюкози в адипоцитах 3 T3-L1, головним чином завдяки посиленню гліколізу та міг бути опосередкований сигнальним шляхом AMPK [72]. Chen та ін. також продемонстрували, що емодин регулює утилізацію глюкози шляхом активації сигнального шляху AMPK [73]. Крім того, емодин продемонстрував інгібуючу дію на високий рівень індукованого глюкозою фосфорилування ERK 1/2 і p38 MAPK [74]. Також тривале введення емодину (3 мкм) покращувало толерантність до глюкози та полегшувало інші метаболічні розлади у мишей шляхом пригнічення активності 11 β -HSD1 у жировій тканині. Повідомлялося, що емодин демонструє захисну дію проти діабетичної кардіоміопатії, регулюючи сигнальний шлях АКТ/GSK-3 β .

Діабетична нефропатія (ДН) є основною причиною термінальної ниркової недостатності. Емодин (40 мг/кг/день) був ефективним для полегшення ниркової дисфункції у щурів з DN, ймовірно, завдяки пригніченню активації шляху p38 MAPK і зниженню експресії фібронектину.

Також повідомлено, що емодин значно зменшив NF- κ B-опосередковану експресію TGF- β 1 і фібронектину. Крім того, емодин (20 мг/кг/день) пригнічував ниркову експресію пов'язаної з інтегрином кінази та десміну, зберігав експресію нефрину та покращував альбумінурію у стрептозотоцин-індукованих діабетичних щурів [75]. У мезангіальних клітинах щурів, культивованих під високим вмістом глюкози, емодин пригнічував проліферацію клітин, спричинену гіперглікемією, і експресію фібронектину шляхом інгібування шляху p38MAPK і клітинного білка-інгібітора FLICE (сFLIP), що свідчить про потенційну роль емодину в лікуванні ДН.

Підводячи підсумок, результати показують, що емодин полегшує симптоми діабетичних тварин, і цей ефект, ймовірно, пов'язаний з активацією сигнальних шляхів PPAR γ і AMPK. Тому емодин має великі перспективи для можливого використання терапевтичного засобу для лікування цукрового діабету та його ускладнень.

2.1.7. Гепатопротекторна активність. Було встановлено, що емодин полегшує стеатоз печінки, спричинений етанолом, і знижує рівень аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази та печінкових тригліцеридів. Крім того, емодин значно знижував α -актин гладких м'язів печінки та колаген типу I, тоді як він підвищував рівні мРНК PPAR- γ [76]. В іншому експерименті було показано, що емодин послаблює спричинену етанолом цитотоксичність клітин HepG2/CYP2E1 шляхом пригнічення активності гамма-глутамілтрансферази (GGT) і експресії білка CYP2E1 залежно від дози, що вказує на те, що емодин може бути корисним для пацієнтів із алкогольною хворобою печінки. У моделі щурів із фіброгенезом печінки, індукованим CCl₄, активність сироваткової АЛТ і аспартатамінотрансферази та вміст гідроксипроліну в печінці були значно знижені введенням емодину. Рівні мРНК і білка TGF- β 1, Smad4 і α -SMA також були знижені в тканинах печінки. Продемонструвано, що емодин може бути цінним для захисту від пошкодження печінки, викликаного CCl₄, шляхом зменшення перекисного окислення ліпідів і позитивної модуляції

запалення. Емодин також мав здатність запобігати пошкодженню печінки, спричиненому CCl₄, шляхом усунення окислювальних порушень печінки, ферментативної активності CYP та ультраструктурних змін. Крім того, емодин у дозі 30 мг/кг (перорально) мав оптимальну гепатопротекторну здатність проти токсичності, спричиненої ацетамінофеном (APAP), шляхом зменшення окисного стресу.

Yin та ін. показали, що емодин може ефективно запобігти фульмінантній печінковій недостатності, спричиненій ЛПС, і цей сприятливий ефект може виникнути через блокування експресії комплексу TLR4/MD2 на клітинній поверхні макрофагів, що може призвести до дезактивації сигналів p38 MAPK і NF-κB шляхи та інгібування продукції TNF-α. Подібним чином лікування емодином захищало від пошкодження печінки, спричиненого конканаваліном А, шляхом пригнічення активації сигнальних шляхів p38 MAPK і NF-κB у CD4⁺ Т-клітинах і макрофагах, що вказує на те, що емодин можна застосовувати як потенційного кандидата для профілактики та лікування клінічних захворювань фульмінантної печінкової недостатності [77].

Отже, емодин демонструє гепатопротекторну дію при гепатостеатозі, індукованому етанолом, і пошкодженні печінки, спричиненому CCl₄ або APAP, що вказує на те, що емодин може мати терапевтичне застосування для профілактики фульмінантного гепатиту.

2.1.8. Нейропротекторна активність.

Накопичення β-амілоїдного білка (Aβ) у мозку відіграє важливу роль у патогенезі хвороба Альцгеймера (AD). Емодин підвищував регуляцію Bcl-2, а також блокував спричинену амілоїдом β25–35 аутофагію через активацію шляху ER/PI3K/Akt і шляху фосфатидилінозитол-3-кінази класу III/Беклін-1/В-клітинної лімфоми 2 відповідно. Результати дали підтверджуючі докази для застосування емодину в профілактиці та лікуванні AD. Крім того, емодин підвищив рівень виживання нейроноподібних клітин, позбавлених кисню-глюкози, збільшив експресію активіну А та знизив експресію каспази-3, що

вказує на те, що емодин може пригнічувати апоптоз нейронів і полегшувати пошкодження нервових клітин після дефіциту кисню-глюкози через активін А шляху [78]. Yang та ін. спостерігали інтервенційні ефекти емодину у щурів з епілепсією та з'ясували можливий механізм дії. Отримані дані свідчать про те, що емодин може впливати на ефекти циклооксигенази-2 у тканинах головного мозку та блокувати опосередковану N-метил-d-аспартатом надмірну експресію MDR1, таким чином досягаючи протиепілептичних ефектів [79].

У мишей із хронічним непередбачуваним легким стресом лікування емодином (20, 40 та 80 мг/кг) зменшило поведінковий дефіцит. Емодин нормалізував зміни рівня кортикостерону в плазмі крові та підвищив рівень експресії гіпокампального глюкокортикоїдного рецептора (GR) (мРНК і білок) і нейротрофічного фактора мозку (BDNF) (мРНК). Вперше було показано, що лікування емодином призвело до індукованого росту нейритів через сигнальний шлях PI3K/Akt/GSK-3 β у клітинах Neuro2a[80]. Продемонстровано, що емодин індукує апоптоз клітин BV-2 і, як наслідок, усуває запальну мікроглію через індукцію TRB3, що свідчить про те, що емодин є кандидатом для лікування внутрішньомозкових крововиливів та інших нейродегенеративних розладів, які включають активацію мікроглії. Рецептори P2X2/3 відіграють вирішальну роль у полегшенні передачі болю при нейропатичних больових станах. Емодин може зменшити експресію рецептора P2X2/3 під час хронічного болю та пригнічувати первинну аферентну передачу, опосередковану рецептором P2X2/3.

Згідно з вищезазначеними дослідженнями, емодин може діяти як ефективний нейропротекторний препарат для лікування хвороби Альцгеймера та епілепсії, а також може протистояти ішемічно-реперфузійному пошкодженню головного мозку та пошкодженню нейронів, спричиненому глутаматом.

2.2. Фармакокінетика.

У фармакокінетичних експериментах емодин був переважно виявлений у печінці та мозку після перорального прийому. Після внутрішньошлункового введення в дозах 20 і 40 мг/кг емодин швидко пройшов фазу II метаболізму з утворенням свого глюкуроніду, і вихідну форму емодину майже не виявляли *in vivo*. Навіть при введенні у вищих дозах (82,4 мг/кг) рівні емодину, виявлені *in vivo*, залишалися дуже низькими. У моделі культури клітин Сасо-2 продемонстрували, що метаболізм глюкуронізації є однією з головних причин дуже низької біодоступності емодину при пероральному прийомі. Крім того, Продемонстровано, що 2,3,5,4'-тетрагідроксистильтбен-2-О-β-D-глюкозид (TSG) може пригнічувати фазу II метаболізму емодину *in vivo* шляхом понижувальної регуляції експресії UGT1A8. Подібне дослідження показало, що піперин значно підвищує $C_{\max}$ і площу під кривою концентрація-час (AUC) емодину та знижує AUC і $C_{\max}$ емодину глюкуроніду. Однак детальні механізми покращеної біодоступності емодину потребують подальшого дослідження [81]. Традиційне пероральне введення не було б найкращим методом застосування емодину через погане кишкове всмоктування, швидке виведення та низьку біодоступність *in vivo*. Фармакокінетику емодину можна покращити шляхом інгібування його глюкуронізаційного метаболізму. У подальших дослідженнях слід звернути увагу на здатність емодину призводити до інших проблем токсичності через збільшення його вмісту.

2.3. Майбутні перспективи у використанні.

Фармакологічні дослідження *in vitro* та *in vivo* показали, що емодин демонструє різноманітні фармакологічні переваги, включаючи протипухлинну, протизапальну, противірусну, антибактеріальну, протиалергічну, антиостеопоротичну, протидіабетичну, імуносупресивну, нейропротекторну та гепатопротекторну дію. Емодин широко використовується для лікування раку, астми, остеоартриту, діабету, атеросклерозу, AD і захворювань печінки. Крім того, багато останніх досліджень показали, що емодин у поєднанні з різними хіміотерапевтичними

засобами є ефективним у ліквідації росту пухлинних клітин. Тому важливо оцінити вплив емодину на метаболізм інших лікарських засобів, перш ніж емодин можна буде безпечно використовувати в комбінації з іншими препаратами.

Емодин сильно пригнічує експресію білків і генів, таких як C-MYC, MCL1, CCND1, CK2, IKK2, PKC, TGF- β 1, Smad4 і Bcl-2/Bax. Однак рівні експресії BDNF, Runx2, osterix, колагену типу I, остеокальцину та ALP регулюються вгору. Крім того, емодин впливає на сигнальні шляхи NF- κ B, MAPK, PI3K/AKT, NIK-IKK, PPAR γ , MMP та активін A. Надані докази переконливо підтверджують здатність емодину пригнічувати різноманітні події, пов'язані з апоптозом клітин, клітинними метастазами та зупинкою клітинного циклу, і чітко підтверджують його традиційне використання в лікуванні раку.

Далі наведена узагальнююча таблиця (табл. 2.1) фармакологічних властивостей емодину.

Таблиця 2.1

Фармакологічні властивості емодину

Фармакологічний ефект	Клітинні лінії/модель	Механізм(и) дії	Застосування	Літ-ра
Протиракова активність	Ракова клітина сечового міхура	Модулює епігенетичні модифікації	<i>In vitro</i>	[47]
	Клітини аденокарциноми легенів людини A549	Модифікує зовнішні шляхи апоптозу та індукує зупинку клітинного циклу	<i>In vitro</i>	[48]
	Клітини ОЕСМ-1	Пригнічує шляхи β -катеніну та Akt	<i>In vitro In vivo</i>	[56]
	Стовбурові клітини гліоми	Пригнічує передачу сигналів стебла	<i>In vitro</i>	[50]
	Клітини HeLa раку шийки матки людини	Внутрішній мітохондріальний шлях; шлях зовнішнього рецептора смерті	<i>In vivo</i>	[51]

Протизапальна активність	Модель тяжкого гострого панкреатиту	Інгібує датчики стресу ER IRE1 α та їх молекули, що знаходяться нижче за рівнем; рівні експресії сироватки крові (TNF- α , IL-6, IL-1 β); підвищує рівень експресії mCD14.	<i>In vitro In vivo</i>	[61]
	Мишача модель артриту, індукованого колагеном	Пригнічує шлях NF- κ B; прозапальні медіатори	<i>In vivo</i>	[82]
	ЛПС-індукований мастит миші	Активує PPAR- γ	<i>In vivo</i>	[83]
	Мишача модель, індукована овалбуміном	Пригнічує експресію MMP-9; індукує експресію HO-1	<i>In vivo</i>	[62]
Антивірусна активність	Клітини Vero E6	Блокує взаємодію білка S і ACE2	<i>In vitro</i>	[84]
	Клітини рабдоміосаркоми	Пригнічує іонний канал 3а коронавірусу SARS-CoV і HCoV-OC43	<i>In vitro</i>	[63]
	Клітини 2.2.15 гепатоми людини	Пригнічує розмноження вірусу гепатиту В	<i>In vitro In vivo</i>	[85]
Анти-бактеріальна активність	Бактеріальний штам MRSA252	Порушує цілісність клітинної стінки і клітинної мембрани	<i>In vitro</i>	[66]
	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	Пригнічує синтез нерозчинних глюканів	<i>In vitro In vivo</i>	[67]
	Стандартні штами <i>H. pylori</i> SS1 і ATCC 43504	Займає вхід у тунель або вбудовується в тунель	<i>In vitro</i>	[86]
Протиалергічна активність	Клітини RBL-2H3	Підвищує стійкість клітинної мембрани; пригнічує позаклітинний приплив Ca ²⁺	<i>In vitro</i>	[70]
	Самки мишей C57BL/6	Пригнічує шляхи PKC або PKC- IKK2	<i>In vivo</i>	[69]

Антидіабетична активність	Діабетичні миші, індуковані STZ	Регулює шлях PPAR γ	<i>In vivo</i>	[71]
	Мезангіальні клітини, індуковані високим вмістом глюкози	Активує шлях PPAR γ	<i>In vitro</i>	[76]
	3 T3-L1 адипоцити	Пригнічує сигнальні шляхи NF- κ B, ERK	<i>In vitro In vivo</i>	[72]
	HG-стимульовані подоцити; Діабетичні щури, індуковані STZ	Пригнічує експресію ILK і десміну; відновлює експресію нефрину	<i>In vitro In vivo</i>	[60]
Гепато-протекторна активність	Клітини макрофагів миші RAW264.7, викликані LPS	Пригнічує вироблення TNF- α ; деактивує MAPK і NF- κ B; блокує експресію комплексу TLR4/MD2	<i>In vitro In vivo</i>	[87]
	CD4 ⁺ Т-клітини та макрофаги	Пригнічує активацію сигнального шляху p38 MAPK-NF-Kb	<i>In vitro In vivo</i>	[77]
	Клон 9 клітини; CCl ₄ -індуковане пошкодження печінки щурів SD	Модулює запалення	<i>In vivo</i>	[88]
	Клітини HepG2/CYP2E1	Пригнічує активність GGT і експресію білка CYP2E1	<i>In vitro</i>	[89]

РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ (ЛЗ)

3.1.1. Передумови виробництва ЛЗ.

Протягом останніх 20 років у всьому світі спостерігається зростання частоти інфекцій, викликаних *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), у тому числі й резистентними до антибіотиків штамми. Спектр захворювань, спричинених цими патогенами, варіює від незначних поверхневих інфекцій, що можуть минути самотійно, до тяжких інвазивних інфекцій, а також серйозних токсинопосередкованих хвороб, що можуть загрожувати життю. Здатність до тривалої персистенції *S.aureus* на шкірі та слизових оболонках сприяє їх значному поширенню в суспільстві та рецидивуванню інфекцій. Але найбільше занепокоєння у клініцистів нині викликає значне поширення ізолятів *S.aureus*, резистентних до метициліну (MRSA), як у стаціонарах, так і в суспільстві, що вимагає постійного глобального та регіонального моніторингу поширеності метицилінрезистентних штамів та їх чутливості до антибіотиків із метою оптимізації рекомендацій з антибактеріальної терапії стафілококових інфекцій [90].

3.1.1.1. Епідеміологія та патогенез інфекції *S.aureus*. Золотистий стафілокок є грампозитивним коком, що відноситься до неспороутворюючих каталазопозитивних бактерій. Його клітинна стінка містить пептидоглікан та тейхоеві кислоти. Він є стійким до температури до 50 °С, високої концентрації солі та висихання. Здатність *S.aureus* до продукції коагулази відрізняє його від інших, менш вірулентних штамів стафілококів.

Передача мікроорганізму здійснюється контактним шляхом (від інфікованих хворих або безсимптомних носіїв), через повітря та заражені предмети. Найбільшу небезпеку становлять хворі із стафілококовими

					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 3. ТЕХНІКО-ЕКОНОМІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ (ЛЗ)			Літ.	Арк.	Аркушів		
Розроб.		Мичкодан М. І.								41	42	135
Керівник		Стабніков В. П.										
Реценз.												
Н. Контр.												
Затверд.		Стабніков В. П.										
					Кафедра БТМ							

ураженнями, що дренуються. У лікарнях стафілококи можуть передаватись від зараженого пацієнта до іншого через руки персоналу. Крім того, сам персонал може мати невеличкі вогнища інфекції (ячмінь, фурункул тощо). За наявності особи, яка активно виділяє стафілокок чи є його постійним носієм, можуть виникати спалахи інфекції в сім'ях, стаціонарах та колективах.

S.aureus — один із найбільш вірулентних та небезпечних для людей мікроорганізмів, значно поширений у суспільстві. Він може бути компонентом людської мікрофлори, що знаходиться в пахвових западинах, паху, промежині, а також у передніх носових ходах. У будь-який момент часу близько 30 % людей є носіями стафілококу в носі [91]. Поширеність назального носійства *S.aureus* у дітей та персоналу лікарень вища, ніж у загальній популяції. Носійство підвищує ризик інфікування самого носія та його оточення. Було показано, що в більшості пацієнтів із бактеріємією *S.aureus* ізолят із крові був ідентичним тому, що міститься в передніх носових ходах [92]. Усіх людей можна розділити на 3 типи за патерном носійства стафілококу: постійні носії, періодичні носії змінних штамів та особи, які ніколи не є носіями. Крім того, назальних носіїв розділяють на постійних носіїв із високим ризиком інфікування та періодичних, або не носіїв, із низьким ризиком інфікування [93]. Схильність до постійного носійства стафілококу є генетично детермінованою [94].

Патогенні властивості *S.aureus* визначаються низкою чинників, які забезпечують його здатність до адгезії, проникнення у тканини та поширення в організмі, а також допомагають уникати імунної відповіді хазяїна. Деякі з цих чинників асоційовані з клітинною поверхнею, а саме мікробні поверхневі компоненти, що розпізнають молекули адгезивного матриксу (MSCRAMMs) — стафілококовий протеїн А, фібрoneктин-зв'язуючі протеїни (А та В), клампінг-фактори А та В (фібриноген-зв'язуючі протеїни) та колаген-зв'язуючий протеїн, які є адгезинами, що зв'язуються з позаклітинним матриксом [95]; а також полісахаридна капсула, яка не тільки перешкоджає фагоцитозу, що сприяє персистенції мікроорганізму, але й модулює адгезію

до ендотеліальних поверхонь [96]. Інші чинники патогенності секретуються стафілококами. До таких відносять токсини (токсин синдрому токсичного шоку 1, ентеротоксини, ексфоліативні токсини, гемолізени, лейкоцидин Пантона — Валентайна), ферменти (плазмокоагулаза, лецитиназа, протеази, гіалуронідаза, нейрамінідаза, стафілокіназа, ДНКаза), а також бактеріоцини, бактеріолізени, фактори, що інгібують комплемент та хемотаксис та інші. За спектром чинників вірулентності *S.aureus* значно перевершує коагулазонегативні стафілококи, деякі з його позаклітинних токсинів навіть в ізольованому стані здатні справляти потужну біологічну дію на інтактних тварин, тканини, клітини та мембрани. Останнім часом увагу науковців привернула група цитолітичних пептидів — фенолрозчинних модулінів (PSM), які мають помірну цитолітичну здатність та сприяють створенню біоплівки, хоча точна функція цих молекул залишається неясною. PSM найбільш активно продукуються ізолятами, що виділені при інфекціях шкіри та м'яких тканин, що вказує на їх важливу роль у патогенезі цих уражень [97].

S.aureus викликають захворювання шляхом безпосередньої інвазії у тканини або шляхом вироблення токсинів, які можуть уражати макроорганізм у ділянках, віддалених від вогнища інфекції чи колонізації. Характерною ознакою стафілококової інфекції є абсцес, що складається з фібринової стінки, оточеної запальними тканинами, з центральним ядром із гною, що містить мікроорганізми та лейкоцити. Стафілококи можуть зберігатись живими в абсцесі протягом тривалого часу. Із накопиченням гною абсцес проривається або назовні, або в оточуючі тканини з утворенням кишень та вторинних абсцесів. Окрім локального поширення можливе й поширення інфекції гематогенним шляхом (навіть якщо абсцес дуже малий). Гематогенний переніс стафілококів може спричинити пневмонію, інфекції кісток і суглобів, а також серцевих клапанів.

В окремих випадках стафілококи тривало персистують у тканинах і викликають повторні інфекції, незважаючи на адекватну антимікробну

терапію. Такі стійкі глибоко вкорінені стафілококові вогнища описані при остеомієліті, абсцесах головного мозку й при легеневих інфекціях у хворих на муковісцидоз і зараз пов'язуються з варіантами малих колоній *S.aureus* [98, 99]. Варіанти малих колоній являють собою ізоляти з атиповою морфологією, зниженим гемолізом, пігментацією, уповільненим ростом та незвичайними біохімічними характеристиками, що утруднює їх виділення та ідентифікацію. Ці ізоляти можуть тривало існувати внутрішньоклітинно та є більш стійкими до антибіотиків та менш імуногенними, ніж батьківський штам [100]. В одній моделі хронічного остеомієліту деякі антибіотики індукували варіанти малих колоній *S.aureus*, і тільки рифампіцин не мав такого ефекту [101].

Токсини, які виробляють *S.aureus*, здатні самі по собі викликати специфічні захворювання або синдроми. Штами *S.aureus*, що продукують ентеротоксини, спричиняють одну з найпоширеніших харчових токсикоінфекцій. Ентеротоксини можуть зберігатись навіть у термічно обробленій їжі. Ексфоліативні токсини, що виробляються штамми, які належать до фагової групи II, викликають стафілококовий синдром ошпареної шкіри (хвороба Ріттера), добре описаний у новонароджених та немовлят. При цьому механізм розщеплення епідермісу ексфоліативними токсинами до кінця не з'ясований [102]. Але найбільш серйозним токсинопосередкованим захворюванням, пов'язаним зі *S.aureus*, є синдром токсичного шоку (СТШ). Хоча вперше він був описаний у дітей (у 1978 році), частіше його спостерігали в жінок, які використовували тампони під час менструації. Але вже з початку 1990-х років принаймні половина випадків не була пов'язана з менструацією. Причиною розвитку СТШ є штамми, які продукують токсин синдрому токсичного шоку 1 (TSST-1), хоча штамми, які продукують ентеротоксини В і С, можуть викликати до 50 % випадків неменструального СТШ. Ці токсини є суперантигенами, Т-клітинними мітогенами, які зв'язуються безпосередньо з інваріантними ділянками молекул головного комплексу гістосумісності класу II, викликаючи

експансію клональних Т-клітин із наступним масовим вивільненням цитокінів, які й призводять до розвитку шоку. Тобто в даному випадку має місце неспецифічна стимуляція Т-лімфоцитів без нормального розпізнавання антигену [103], що відрізняє СТШ від інфекційно-токсичного шоку.

3.1.1.2. Чутливість *S.aureus* до антибіотиків. Із середини 60-х років XX сторіччя переважна більшість *S.aureus* набула здатності до вироблення пеніцилінази, що зробило ці мікроорганізми резистентними до пеніциліну G, ампіциліну, амоксициліну та протипсевдомонадних пеніцилінів (тепер їх близько 95 %). Появу пеніцилінрезистентних штамів почали фіксувати ще у 40-х роках, практично відразу після впровадження терапії пеніциліном. Це стало поштовхом для розробки стійких до пеніцилінази напівсинтетичних пеніцилінів (метицилін, а далі — оксацилін, нафцилін і їх похідні). Однак уже протягом року від початку їх застосування стали з'являтися повідомлення про появу ізолятів *S.aureus*, резистентних до метициліну (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), спершу в Англії (у 1961 році), а потім в інших країнах. До кінця 60-х років спостерігались поодинокі випадки інфекцій MRSA у лікарнях, а з початком 70-х поширеність MRSA в стаціонарах неухильно зростала. У 1989 році 97 % госпіталів у США повідомили про наявність у них MRSA, а проспективне спостереження SCOPE показало, що частота виявлення MRSA при нозокоміальній бактеріємії *S.aureus* у дітей виросла з 10 % у 1995 році до 29 % у 2001 році [104]. Фактори ризику розвитку інфекції або колонізації нозокоміальним MRSA (healthcare-associated MRSA — HA-MRSA) включають недавню або тривалу госпіталізацію, антибіотикотерапію та перебування у відділенні інтенсивної терапії. HA-MRSA має вірулентність, подібну до такої в чутливих до метициліну стафілококів, і порівнянні показники смертності.

Паралельно із цим у 1970-х роках спорадично спостерігалися окремі випадки інфікування MRSA, яке, очевидно, відбулося в суспільстві, однак зазвичай у цих пацієнтів можна було виявити ті чи інші описані вище фактори ризику і вважалось, що походженням MRSA в цих випадках були

лікарні. Однак із 1980-х років у літературі стали з'являтися повідомлення про епізоди справжньої позалікарняної інфекції MRSA (community-acquired MRSA — CA-MRSA) у пацієнтів без ідентифікованих факторів ризику. Протягом першої половини 90-х років поширення CA-MRSA набуло вибухового збільшення, що свідчить про наявність унікальних властивостей, які дозволяють цим клонам швидко поширюватися у суспільстві. У переважній більшості випадків у дітей без факторів ризику CA-MRSA викликав поверхневі інфекції, включаючи підшкірні абсцеси та целюліт [105]. Також дуже поширеними були рецидивуючі шкірні інфекції [106]. Тепер у США до 75 % інфекцій шкіри та м'яких тканин пов'язані з MRSA. Однак паралельно з цим спостерігалось зростання й частоти інвазивних інфекцій CA-MRSA, включаючи остеомієліт, септичний артрит і пневмонію [107]. Крім того, є дані, що деякі інвазивні інфекції, спричинені CA-MRSA, відрізняються більш тяжким перебігом та більш частим розвитком ускладнень, ніж інфекції, викликані чутливими до метициліну стафілококами.

Резистентність до β -лактамів у MRSA зумовлена модифікацією пеніцилінзв'язуючого білка (ПЗБ), позначеного як ПЗБ-2', який, на відміну від внутрішнього набору ПЗБ (від ПЗБ-1 до ПЗБ-4) *S. aureus*, має значно нижчу афінність до зв'язування з β -лактамними антибіотиками, що дозволяє стафілококу ефективно формувати клітинні стінки у присутності інгібуючих концентрацій препаратів. ПЗБ-2' кодується геном *mecA*, який переноситься унікальним мобільним генетичним елементом — стафілококовою касетною хромосомою (staphylococcal cassette chromosome *mec* — SCC*mec*), що являє собою ділянку розміром від 20 до 70 kb, розташовану приблизно на 30 kb нижче від хромосомного початку реплікації. Існує кілька типів SCC*mec*. Історично нозокоміальні ізоляти MRSA містили типи SCC*mec* I– III, а коли вперше були описані позалікарняні ізоляти, були введені три нових типи — IV, V та VI. Було описано ще два типи SCC*mec*, попередньо названі VII та VIII. Вважається, що менший розмір (< 30 kb) SCC*mec* IV–VI пояснює

підвищену рухомість між штамми [108]. SCCmec типів II та III також містять інші гени стійкості до антибіотиків, такі як tet (стійкість до тетрацикліну). Деякі випадки резистентності до метициліну можуть бути пов'язані не з геном mecA, а з гіперпродукцією β -лактамаз. Часто в цих випадках резистентність до метициліну є проміжною. Клінічне значення цих ізолятів невідоме.

Походження CA-MRSA невідоме. Від нозокоміальних MRSA CA-MRSA відрізняє не тільки відсутність історії перебування в медичних закладах пацієнтів, які є носіями бактерії, та унікальна комбінація генного комплексу й менші розміри SCCmec, а й інші характеристики чутливості до антибіотиків й характерні моделі електрофорезу в імпульсному полі. Цікаво, що CAMRSA рідше зустрічається в передніх носових ходах, ніж HA-MRSA та чутливі до метициліну ізоляти; частіше він колонізує шкіру, особливо в ділянці промежини та прямої кишки. Усе це свідчить, що штамми CA-MRSA могли виникнути в суспільстві, а не просто були перенесені з лікарень. Швидке поширення резистентних до метициліну ізолятів *S.aureus* викликає побоювання, що необхідність все більш частого використання альтернативних антибіотиків (наприклад, ванкоміцину) сприятиме розвитку стійкості і до них, як це відбулося із появою стійкого до пеніциліну *S.aureus* у 1940–1950-х роках. Моніторинг чутливості нозокоміальних та позалікарняних MRSA до антибіотиків проводиться постійно [90].

Препаратами вибору для лікування інфекцій, спричинених MRSA, є напівсинтетичні пеніциліни, стійкі до пеніцилінази (оксацилін, нафцилін, клоксацилін, диклоксацилін) та цефалоспорины I покоління (цефазолін, цефалексин). Якщо клінічна відповідь на один із цих препаратів є повільною, перехід на інший з цієї ж категорії не має сенсу. У таких випадках слід переглянути мікробіологічні дані, оцінити дозу антибіотика та комплаєнс, а також переконатися, що немає ділянок, які потребують дренивання. Цефалоспоринові антибіотики викликають менше подразнення вен при внутрішньовенному введенні, ніж пеніциліни, менше пригнічують кістковий

мозок, але мають ширший спектр дії, ніж оксацилін чи нафцилін (це може сприяти суперінфекції стійкими до цефалоспоринів грамнегативними мікроорганізмами в ослабленого пацієнта з серйозним стафілококовим захворюванням). Ефективність цефалоспоринів II та III покоління проти *S.aureus* нижча. Тому, якщо емпірична терапія передбачає призначення цефтриаксону, цефотаксиму або цефуроксиму, за наявності серйозної підозри на *S.aureus* слід призначати додатково специфічні протистафілококові засоби. Кліндаміцин і триметоприм/ сульфаметоксазол є альтернативними препаратами для пацієнтів із серйозною алергією на β -лактамні антибіотики або непереносимістю β -лактамних антибіотиків. Але кліндаміцин може застосовуватись лише при тих інвазивних інфекціях *S.aureus*, які не є ендоваскулярними (тобто при негативних результатах посіву крові) з огляду на його бактеріостатичну дію.

HA-MRSA, як правило, є мультирезистентними і окрім метицилінорезистентності виявляють відсутність, незначну або знижену чутливість до стандартних цефалоспоринів, аміноглікозидів, еритроміцину, кліндаміцину та тетрациклінів. Основними препаратами, що використовуються для лікування інфекцій, спричинених нозокоміальними MRSA, є ванкоміцин, даптоміцин та лінезолід [90].

Дані про поширеність MRSA в Україні нечисленні й стосуються здебільшого дорослих. За даними дослідження АУРА, яке проводилось в Україні у 2018–2019 рр., серед ізолятів *S.aureus*, які були виділені з ран при інфекціях шкіри та м'яких тканин, інтраабдомінальних інфекціях, інфекціях кісток і суглобів, частка MRSA була 27,2 %. Досліджувані ізоляти MRSA були високочутливими (більше ніж 95 %) до лінезоліду, тайгецикліну, тейкопланіну та фосфоміцину. Чутливість до ванкоміцину становила 88,6 %, цефтароліну — 86,1 %, даптоміцину — 88,8 %, триметоприму/ сульфаметоксазолу — 90,9 % [109]. При вивченні антибіотикорезистентності нозокоміальних штамів *S.aureus* у хірургічних стаціонарах України в багатоцентровому дослідженні, що проводилось в 2015–2016 рр., було

знайдено від 7,3 до 69,7 % (у середньому 38,7 %) ізолятів MRSA, які були високочутливими до лінезоліду (100 %), тайгецикліну (97,3 %), мупіроцину (96,4 %), триметоприму/сульфаметоксазолу (94,7 %), тоді як чутливість до ванкоміцину та тейкопланіну виявилась дещо нижчою (88,2 та 89,5 % відповідно) [110]. Ще в одному дослідженні вивчали поширеність CA-MRSA при гнійно-запальних процесах у дорослих. Було виявлено, що частка CA-MRSA становила 28,7 % від загальної кількості ізолятів *S.aureus* в амбулаторних пацієнтів та 64,9 % серед тих, хто потребував госпіталізації [111]. Пізніше ті ж автори виявили, що серед здорових молодих людей (25–45 років), назальних носіїв *S.aureus*, носійство MRSA виявляється в 16,7 % випадків [112].

3.1.1.3. Діагностика клінічних варіантів інфекції *S.aureus*. *S.aureus* залишається провідним збудником остеомієліту в дитячому віці. Частота виявлення цього патогену при гематогенному остеомієліті в дітей коливається від 65 до 85 % [113]. Навіть з огляду на те, що останнім часом з'являється все більше даних про зростання ролі інших грампозитивних мікроорганізмів, зокрема *Kingella kingae*, у розвитку остеомієліту, принаймні в дітей раннього віку (що пов'язано з покращенням можливостей щодо виявлення даного патогену) [114], сумарна частка стафілококів та стрептококів в етіологічній структурі остеомієліту залишається на рівні 80–90 %. Остеомієліт, спричинений CA-MRSA, характеризується більш тяжким перебігом, із частішим розвитком поліосальної хвороби, міозиту, піоміозиту, внутрішньокісткових та субперіостальних абсцесів, патологічних переломів та септичного тромбофлебиту [115].

Посіви матеріалу, отриманого з кісток або оточуючих їх тканин, є позитивними у 66–82 % випадків. Культури крові дозволяють виділити причинно-значущий мікроорганізм приблизно в половині випадків (від 31 до 74 % пацієнтів у кількох серіях) [116]. Застосування методу ПЛР для виявлення бактеріальної ДНК має певні переваги з огляду на його більшу

чутливість і кращі можливості ідентифікації більш вибагливих для культивування патогенів, таких, наприклад, як *Kingella*.

Рентгенологічні методи візуалізації є провідними в діагностиці остеомієліту, але зміни кісток починають виявлятися лише з 10–21-го дня хвороби. МРТ має більшу чутливість, понад 90 %, і до того ж дозволяє краще виявляти ушкодження м'яких тканин. Радіонуклідне сканування з ^{99m}Tc використовується в діагностиці остеомієліту протягом десятиріч, бо, незважаючи на наявність променевого навантаження, дозволяє виявити зміни кісток значно раніше, ніж за допомогою звичайних рентгенограм, й раніше мало чутливість близько 95 %. Однак нещодавно були опубліковані дані, що сцинтиграфія кісток виявила остеомієліт, викликаний CA-MRSA, лише у 53 % дітей [116]. Припускають, що зниження чутливості методу при CA-MRSA-остеомієліті може бути пов'язане з більшою гостротою захворювання, спричиненого цим патогеном.

3.1.2. Аналіз фармакологічних властивостей цільового ЛЗ, галузей використання.

Фармакодинаміка. Емодин демонструє помітну бактеріостатичну дію на грампозитивні бактерії, особливо *Bacillus subtilis* і *Staphylococcus aureus*. Значення біологічно активної мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) емодину становили 28,9 і 14,4 мкм відповідно. Однак емодин не був активним проти двох грамнегативних бактерій (*Klebsiella pneumoniae* та *Escherichia coli*) у найвищій дослідженій концентрації (1851,9 мкм). Подібним чином повідомлялося, що емодин виявляє антимікобактеріальну дію та антибактеріальну дію широкого спектру, зокрема проти *M. tuberculosis* (найнижча МІК = 0,9 мкм) та грампозитивних бактерій (найнижча МІК < 14,8 мкм) клінічного походження [117]. Сао та ін. досліджували антиметицилінрезистентну активність *S. aureus* (анти-MRSA) і хімічний склад ефірних екстрактів з *RhizomaPolygoniCuspidati* (ET-RPC). Результати показали, що ET-RPC може значно пригнічувати ріст бактерій штамів MRSA. Крім того, емодин було ідентифіковано як основну сполуку з

активністю проти MRSA, яка була пов'язана з руйнуванням цілісності клітинної стінки та клітинної мембрани [118].

Емодин також значно пригнічував ріст, утворення кислоти та синтез нерозчинного глюкану *Streptococcus mutans* *in vitro* та пригнічував розвиток карієсу зубів у щурів. Результати показали, що природна сполука емодин може бути новим фармакологічним засобом для профілактики та лікування карієсу [119].

Загалом, емодин має потенційні антимікробні властивості. Сам емодин може бути використаний як потенційна провідна сполука для подальшого відкриття антибактеріальних ліків.

Фармакокінетика. У фармакокінетичних експериментах емодин був переважно виявлений у печінці та мозку після перорального прийому. Після внутрішньошлункового введення в дозах 20 і 40 мг/кг емодин швидко пройшов фазу II метаболізму з утворенням свого глюкуроніду, і вихідну форму емодину майже не виявляли *in vivo*. Навіть при введенні у вищих дозах (82,4 мг/кг) рівні емодину, виявлені *in vivo*, залишалися дуже низькими. У моделі культури клітин Сасо-2 продемонстрували, що метаболізм глюкуронізації є однією з головних причин дуже низької біодоступності емодину при пероральному прийомі. Крім того, Продемонстровано, що 2,3,5,4'-тетрагідроксистильтбен-2-О-β-D-глюкозид (TSG) може пригнічувати фазу II метаболізму емодину *in vivo* шляхом понижувальної регуляції експресії UGT1A8. Подібне дослідження показало, що піперин значно підвищує $C_{\max}$ і площу під кривою концентрація-час (AUC) емодину та знижує AUC і $C_{\max}$ емодину глюкуроніду. Однак детальні механізми покращеної біодоступності емодину потребують подальшого дослідження [120]. Традиційне пероральне введення не було б найкращим методом застосування емодину через погане кишкове всмоктування, швидке виведення та низьку біодоступність *in vivo*. Фармакокінетику емодину можна покращити шляхом інгібування його глюкуронізаційного метаболізму. У

подальших дослідженнях слід звернути увагу на здатність емодину призводити до інших проблем токсичності через збільшення його вмісту.

Показання:

- Ускладнені інфекційні захворювання шкіри та підшкірних тканин спричинені *S. aureus* та MRSA;
- Гематогенний остеомієліт спричинений *S. aureus* та MRSA;
- Синдром токсичного шоку (СТШ).

Лікарський препарат, що містить емодин слід застосовувати тільки тоді, коли застосування інших антибактеріальних засобів, які зазвичай рекомендуються для початкового лікування цих інфекцій, є недоцільним [118].

3.1.3. Обсяг ринку та очікувані темпи його розвитку.

Оскільки, лікарські препарати, які містять емодин, на сьогодні знаходяться на етапах доклінічних та клінічних досліджень [121], впливу на ринок дані препарати ще не мають, і точна інформація щодо розвитку ринку даного препарату у відкритих джерелах відсутня. Тому далі буде наведена загальна інформація щодо антибактеріальних засобів для системного застосування, до яких і буде відноситись лікарський препарат, що містить емодин, фармацевтичного ринку України.

Згідно з Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) класифікації Антибактеріальні засоби для системного застосування J01 належать до групи Протимікробних засобів для системного застосування J (*рис. 3.1*).

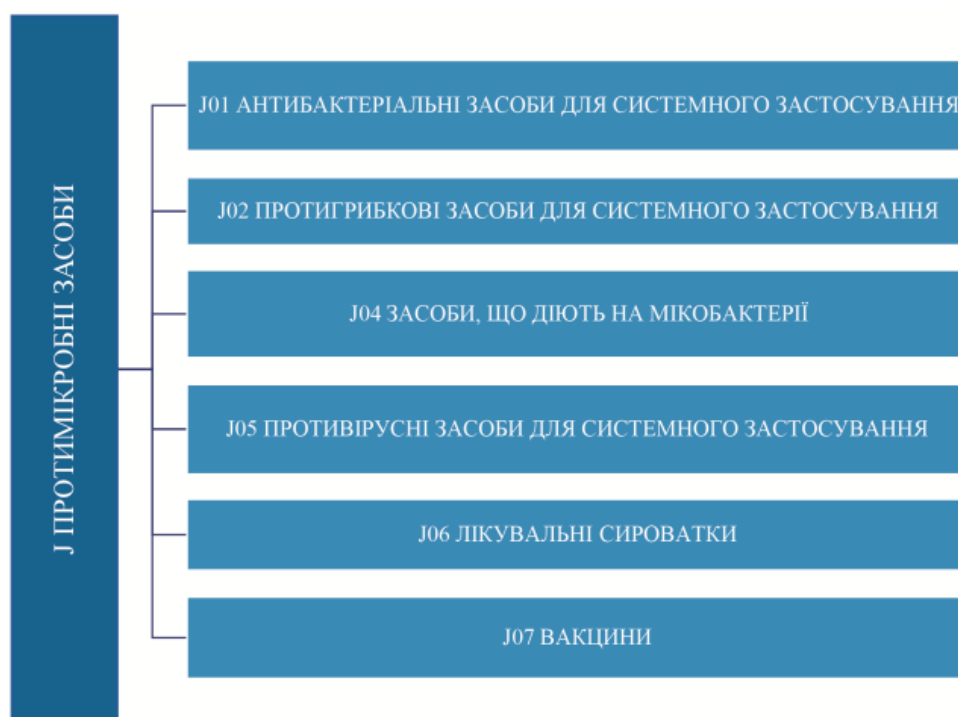


Рис. 3.1. Підгрупи групи Протимікробних засобів для системного застосування J

Відповідно до АТС класифікації досліджувану підгрупу Антибактеріальних засобів для системного застосування J01, своєю чергою, теж поділено на підгрупи (десять підгруп) залежно від діючих речовин та їхньої фармакологічної дії.

Аналіз даних, отриманих із Державного реєстру лікарських засобів України на лютий 2022 р., показує, що група препаратів J01 Антибактеріальні засоби для системного застосування налічує 972 торговельні назви [122]. Найчисленнішою підгрупою є J01D Інші β-лактамі антибіотики – 384 одиниці (39,5 %), а також J01M Антибактеріальні засоби із групи хінолонів – 172 одиниці (17,7 %), J01F Макроліди, лінкозаміди та стрептограміни – 142 одиниці (14,6 %), J01X Інші антибактеріальні засоби 108 одиниць (11,1 %) (табл. 3.2).

**Кількість лікарських засобів у підгрупах групи Антибактеріальних
засобів для системного застосування J01**

Кількість препаратів у групі J01, одиниць	Кількість препаратів у відповідних підгрупах групи Антибактеріальних засобів для системного застосування J01, одиниць									
	J01A	J01B	J01C	J01D	J01E	J01F	J01G	J01M	J01R	J01X
972	9	11	90	384	28	142	17	172	11	108

Насамперед проаналізовано розподіл цих засобів стосовно форм випуску згідно із класифікацією, що використовується у Державному реєстрі лікарських засобів України. Встановлено, що найбільше засобів – це порошки – 427 одиниць (43,9 %); 347 одиниць (35,7 %) – таблетки; 100 одиниць (10,3 %) – розчини; інші форми (капсули, ліофілізати, гранули, концентрати, суспензії, супозиторії) разом становлять 98 одиниць (10,1 %) (рис. 3.2).

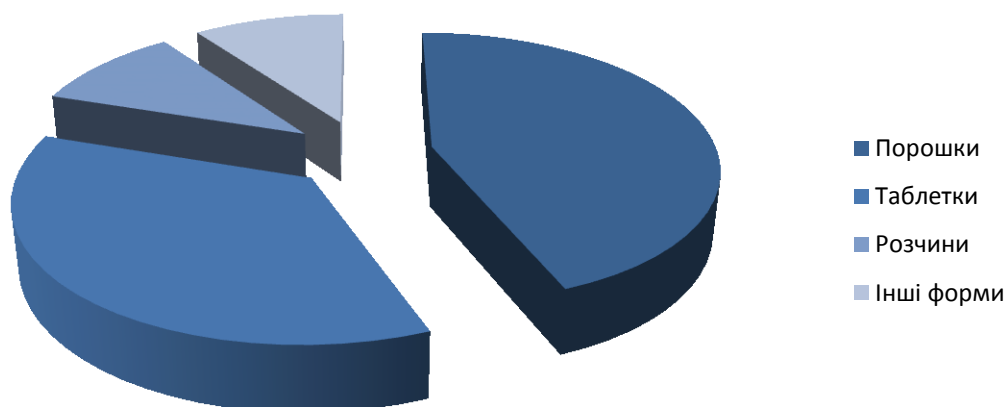


Рис. 3.2. Розподіл препаратів групи J01 за лікарськими формами

Розглянувши розподіл лікарських препаратів за формою випуску залежно від належності до певної підгрупи (табл. 3.2), бачимо, що типовими для більшості з них є форма таблеток (у дев'яти групах із десяти наявних),

порошків (у восьми групах із десяти), ліофілізатів (у шести групах із десяти), а також розчинів та капсул (у п'яти групах із десяти).

Таблиця 3.2

**Розподіл лікарських засобів за формою випуску в підгрупах групи
Антибактеріальних засобів для системного застосування J01**

Форма випуску	Кількість препаратів у відповідних підгрупах групи Антибактеріальних засобів для системного застосування J01, одиниць									
	J01A	J01B	J01C	J01D	J01E	J01F	J01G	J01M	J01R	J01X
гранули	-	-	-	7	-	5	-	-	-	8
таблетки	3	8	37	37	22	92	-	116	7	25
розчини	-	-	-	-	-	4	10	53	2	31
супозиторії	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
суспензія	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-
концентрат	-	-	-	-	2	-	-	2	-	1
ліофілізат	2	1	-	1	-	4	3	-	-	23
порошок	1	2	49	335	-	17	4	-	2	17
капсули	3	-	4	4	-	20	-	-	-	3

Огляд міжнародних непатентованих найменувань (МНН) Антибактеріальних засобів для системного застосування J01 показав, що найчисленнішою є група монопрепаратів, а це 825 одиниць (84,9 %), відповідно комбіновані препарати налічують 145 одиниць (14,9 %).

Більшість МНН, які містять одну діючу речовину, – це антибіотики таких груп, як фторхінолони (левофлоксацин 95 МНН, моксифлоксацин 32 МНН, ципрофлоксацин 28 МНН), макроліди (азитроміцин 81 МНН, кларитроміцин 57 МНН), цефалоспорины (цефтріаксон 79 МНН, цефепім 57 МНН, цефуоксим 46 МНН, цефтазидим 38 МНН), карбапенем – меропенем 47 МНН, β-лактамний антибіотик – амоксицилін 20 МНН, оксазолідинон – лінезолід 18 МНН, нітроімідазольний антибіотик – метронідазол 18 МНН тощо.

Також було розглянуто та проаналізовано належність Антимікробних засобів для системного застосування J01 до відповідних

фармакотерапевтичних груп препаратів [122]. Найбільшу частку становлять антибактеріальні засоби – 677 найменувань (69,7 %), на другому місці протимікробні засоби, які становлять 269 препаратів (27,7 %), а інші фармакотерапевтичні групи налічують лише 26 назв (2,7 %).

Аналіз Антибактеріальних засобів для системного застосування J01 фармацевтичного ринку України показав, що більшість – 70,6 % становлять імпорتنі засоби. Серед країн-імпортерів Велика Британія, Німеччина, Польща, Словенія, Індія – загалом 40 країн. Найвищий відсоток, а саме 32,5%, становлять лікарські засоби, виготовлені в Індії. Водночас на фармацевтичних підприємствах України виробляють 286 препаратів, що становить 29,4 % цієї групи. Лідером серед вітчизняних фірм-виробників є ПАТ “Київмедпрепарат” – 58 одиниць (20,3 %), друге місце займає Публічне акціонерне товариство “Науково виробничий центр “Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод” – 36 одиниць (12,6 %), дещо меншу кількість препаратів випускають Приватне акціонерне товариство “Лекхім – Харків” – 32 одиниці (11,2 %) та ПрАТ “Фармацевтична фірма “Дарниця” – 29 одиниць (10,1 %). Решта – препаратів – 131 одиниця (45,8 %) виробляється на таких фармацевтичних підприємствах, як: ТОВ “Юрія-Фарм”, АТ “Фармак”, ПАТ “Галичфарм”, Дочірнє підприємство “Фарматрейд” тощо.

Виконавши аналіз, можна відзначити: загальна кількість антибактеріальних засобів для системного застосування становить 972 одиниці, найчисленнішою підгрупою цієї підгрупи є J01D Інші бета-лактамі антибіотики – 384 одиниці (39,5 %), а також J01M Антибактеріальні засоби з групи хінолонів – 172 одиниці (17,7 %), J01F Макроліди, лінкозаміди та стрептограміни – 142 одиниці (14,6 %) J01X Інші антибактеріальні засоби – 108 одиниць (11,1 %); найбільше лікарських засобів зареєстровано у вигляді порошків – 427 назв (43,9 %) та таблеток – 347 найменувань (35,7 %); антибактеріальні лікарські засоби становлять найбільшу частку асортименту – 677 найменувань (69,7 %); в досліджуваній групі препаратів домінують імпорتنі 70,6 %, українські фармацевтичні підприємства випускають 286

назв (29,4 %); за міжнародним непатентованим найменуванням переважають монопрепарати – їх 825 (84,9 %). Попри прогрес у розробленні антибактеріальних засобів, кількість одиниць лікарських препаратів вітчизняних виробників не можна вважати достатньою. Тому розроблення нових лікарських засобів досліджуваної групи залишається актуальним завданням для українських науковців.

3.1.4. Перелік виробників (постачальників) субстанції.

Таблиця 3.3

Перелік виробників (постачальників) субстанції [123-127]

Назва компанії	Місцезнаходження	Торгова назва
1	2	3
HeBei LIKES technology Co., Ltd	Китай	Natural Emodin Rhubarb
Wuhan Quanjinci New Material Co., Ltd.	Китай	Emodin
Merck	Німеччина	Emodin
Nanjing NutriHerb BioTech Co., Ltd.	Китай	Rheum Emodin Powder
GuangZhou TongYi biochemistry technology Co., Ltd	Китай	Emodin

3.2. Обґрунтування вибору форми випуску лікарського засобу (ЛЗ)

Фармацевтична промисловість поєднує активний інгредієнт, який був або синтезований у лабораторії, або добутий із його джерела походження, з тими немедичними агентами, які виконують різноманітні та спеціалізовані фармацевтичні функції. Ці останні інгредієнти зазвичай називають фармацевтичними інгредієнтами, помічниками, допоміжними речовинами, необхідними або допоміжними речовинами, які зумовлюють різноманітні фармацевтичні дозовані форми. Ці інгредієнти додаються для розчинення, стабілізації, збереження, фарбування, ароматизації, суспендування, згущення,

розведення, емульгування та отримання ефективних і привабливих лікарських форм [128].

Кожен фармацевтичний препарат є унікальним за своїми фізичними та фармацевтичними характеристиками, а також за кінцевою формою, в якій препарат представлений для прийому пацієнтом.

Таким чином, перед фармацевтичною промисловістю стоїть завдання виготовити лікарську форму, яка забезпечує терапевтичний ефект для пацієнта, який лікар може вважати прийнятним. Сильнодіючий характер і низькі дози для більшості ліків, які використовуються на практиці, зазвичай виключають будь-які очікування, що широка громадськість може безпечно отримати відповідну дозу препарату з основного матеріалу.

Переважає більшість лікарських речовин вводиться в міліграмах, що зазвичай вимагає використання дуже чутливих лабораторних ваг. Якщо доза лікарського засобу невелика, тверді лікарські форми, такі як таблетки та капсули, повинні бути приготовані з розріджувачами або наповнювачами, щоб отримана одиниця дозування була достатньо великою для обробки [128].

Окрім забезпечення механізму безпечної та зручної доставки точної дози діючої речовини, лікарська форма повинна забезпечувати [128]:

- ✓ Захист препарату від руйнівного впливу атмосферного кисню або вологи (наприклад, таблетки, вкриті оболонкою, запечатані капсули тощо);
- ✓ Захист препарату від руйнівної дії шлункової кислоти після прийому всередину;
- ✓ Приховування гіркого, солоного або неприємного смаку чи запаху лікарської речовини (наприклад, капсул, таблеток, вкритих оболонкою, ароматизованих сиропів);
- ✓ Рідкі лікарські форми для розчинних речовин у потрібному носії (наприклад, розчини);
- ✓ Рідкі лікарські форми для нерозчинних або нестабільних речовин у потрібному носії (наприклад, суспензії);

- ✓ Розширена дія препарату завдяки використанню спеціальних механізмів контрольованого вивільнення;
- ✓ Оптимальна дія препарату з місць місцевого нанесення (наприклад, мазі, креми, препарати для очей, вух і носа);
- ✓ Здатність вводити ліки в тканини тіла (наприклад, ін'єкції);
- ✓ Дія препарату через інгаляції.

Крім того, багато лікарських форм містять відповідне маркування, що дозволяє легко ідентифікувати ліки за допомогою характерного кольору, форми або упаковки [128].

3.3. Обґрунтування вибору біологічного агенту для отримання субстанції для інженерної частини роботи.

Емодин (рис. 3.3) є одним із найпоширеніших похідних антрахінону, відомий своєю медичною цінністю та різними біологічними діями, включаючи антибактеріальну та протизапальну дію, пригнічення проліферації клітин, імунну та антиоксидантну ферментну активність у сироватці крові, покращення та лікування хвороби Альцгеймера та захворювань печінки. Емодин в основному виділено з рослин, грибів і навіть деяких тварин [135].

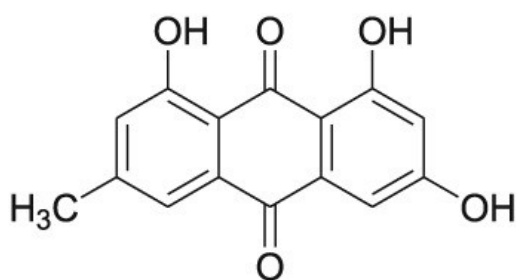


Рис. 3.3. Хімічна структура емодину

Емодин продемонстрував помітну бактеріостатичну дію на досліджувані грампозитивні бактерії, особливо *Bacillus subtilis* і *Staphylococcus aureus*. Значення біологічно активної мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) емодину становили 28,9 і 14,4 мкм. Подібним чином повідомлялося, що емодин виявляє антимікобактеріальну дію та антибактеріальну дію широкого спектру, зокрема проти *M. tuberculosis* (найнижча МІК = 0,9 мкм) та

грампозитивних бактерій (найнижча МІК < 14,8 мкм) клінічного походження [136]. Емодин також значно пригнічував ріст, утворення кислоти та синтез нерозчинного глюкану *Streptococcus mutans* *in vitro* та пригнічував розвиток карієсу зубів у щурів [137].

Загалом, емодин має потенційні антимікробні властивості. Сам емодин може бути використаний як потенційна провідна сполука для подальшого відкриття антибактеріальних ліків.

Узагальнюючу характеристику технологічних особливостей одержання емодину за використання різних продуцентів наведено у табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Особливості одержання емодину за використання *A. favipes*HN4-13, *A. awamori*WAIR120 та *A. ochraceus*LP-316

Біологічний агент	Концентрація емодину в культуральній рідині, мг/л	Склад поживного середовища, г/л	Тривалість культивування, год	Особливості процесу біосинтезу	Використана література
<i>Aspergillus favipes</i> HN4-13	132,40±3,09 (0,1327 г/л)	Картопляний крохмаль – 59,3; Дріжджовий екстракт – 10,0; Морська сіль – 30,0; KН ₂ РO ₄ – 0,1; MgSO ₄ ·7H ₂ O – 0,05; FeSO ₄ ·7H ₂ O – 0,01.	168 (7 діб)	pH = 5, t = 32°C, аеробні умови, n= 160 об/хв.	[138]
<i>Aspergillus awamori</i> WAIR120	0,0427 (0,0000427 г/л)	Глюкоза – 60,0; Дріжджовий екстракт – 15,0.	240 (10 діб)	pH = 5,5, t = 30°C, аеробні умови, n= 120 об/хв.	[139]
<i>Aspergillus ochraceus</i> LP-316	1.358 (0.001358 г/л)	Тростинний цукор – 30,0; K ₂ HPO ₄ – 1,0; MgSO ₄ – 0,5; KCl – 0,5; FeSO ₄ – 0,01; Оцтова кислота – 0,07.	168 (7 діб)	pH = 5,5-5,8, t = 28-30°C, аеробні умови, n= 120 об/хв.	[140]

Проаналізувавши дані наведені в таблиці 3.5 можна сказати, що найвищий показник синтезу емодину $-132,40 \pm 3,09$ мг/л (0,1327 г/л) досягається при культивуванні *Aspergillus favipes* HN4-13. Найнижчий показник синтезу спостерігається у *Aspergillus awamori* WAIR120 (0,0427 мг/л (0,0000427 г/л)). Така кількість полімеру досягається при культивуванні *Aspergillus favipes* HN4-13 та *Aspergillus awamori* WAIR120 впродовж 168 год та 240 год відповідно.

Проте така порівняльна характеристика технологічного процесу (див. табл. 3.5) є недостатньою. Тому на наступному етапі вибору біологічного агента порівнювали вартість поживних середовищ для культивування всіх трьох продуцентів (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

**Вартість компонентів поживного середовища для культивування
*A. favipes*HN4-13, *A. awamori*WAIR120 та *A.ochraceus*LP-316**

Продуцент	Компонент поживного середовища, г/л	Ціна компонента*, грн/кг	Вартість компонента (грн) на 1л середовища	Джерело інформації
<i>Aspergillus favipes</i> HN4-13	Картопляний крохмаль – 59,3	55	3,26	[1]
	Дріжджовий екстракт – 10,0	483	4,83	[2]
	Морська сіль – 30,0	68	2,04	[3]
	KH ₂ PO ₄ – 0,1	120	0,012	[4]
	MgSO ₄ · 7H ₂ O – 0,05	10,2	0,00051	[5]
	FeSO ₄ · 7H ₂ O – 0,01	20	0,0002	[6]
Вартість 1 л середовища – 10,14 грн.				
<i>Aspergillus awamori</i> WAIR120	Глюкоза – 60,0	98	5,88	[7]
	Дріжджовий екстракт – 15,0	483	7,245	[2]
Вартість 1 л середовища – 13,13 грн.				
<i>Aspergillus ochraceus</i> LP-316	Тростинний цукор – 30,0	120	3,6	[8]
	K ₂ HPO ₄ – 1,0	120	0,12	[9]
	MgSO ₄ – 0,5	93	0,0465	[10]
	KCl – 0,5	43	0,0215	[11]
	FeSO ₄ – 0,01	20	0,0002	[12]
	Оцтова кислота – 0,07	109	0,00763	[13]
Вартість 1 л середовища – 3,8 грн.				

Примітка. * - Ціни наведено станом на грудень 2023.

- 1 - <https://prom.ua/ua/p1498377674-kartofelnyj-krahmal.html>;
- 2 - <https://www.dia-m.ru/news.php?newsid=56166>;
- 3 - <https://prom.ua/ua/p1541893555-sol-morskaya-pischevaya.html>;
- 4 - <https://prom.ua/p151620028-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>;
- 5 - <https://prom.ua/p509526377-sulfat-magniya-mgso47h2o;wholesale.html>;
- 6 - <https://prom.ua/p610003424-zhelezo-ternokisloe-zheleznyj.html>;
- 7 - <https://prom.ua/p1187606664-glyukoza-dekstroza-1kg.html>;
- 8 - <https://prom.ua/ua/p339646194-sahar-trostonikovyj-nerafinirovannyj.html>;
- 9 - <https://prom.ua/p151620028-kalij-fosfornokislyj-zameschennyj.html>;
- 10 - <https://prom.ua/p783600334-sulfat-magniyamagnij-ternokislyj.html?&primelead=M14wOA>;
- 11 - <https://prom.ua/p1426027583-kalij-hloristyj.html?&primelead=MS42>;
- 12 - <https://prom.ua/p610003424-zhelezo-ternokisloe-zheleznyj.html>;
- 13 - <https://prom.ua/ua/p1496929515-uksusnaya-kislota-999.html?&primelead=MS43NQ>.

Дані наведені у табл. 3.6, свідчать, що середовище для культивування *Aspergillus awamori* WAIR120 є найдорожчим за вартістю (13,13 за 1 л) у порівнянні з середовищами для культивування *Aspergillus favipes* HN4-13 (10,14 грн за 1 л), та *Aspergillus ochraceus* LP-316 (3,8 грн за 1 л). Для того, щоб остаточно обрати найефективніший біологічний агент розраховували умовну вартість 1 г цільового продукту (табл. 3.7).

**Умовна вартість 1 г цільового продукту при культивуванні
*A. favipes*HN4-13, *A. awamori*WAIR120 та *A.ochraceus*LP-316**

Біологічний агент	Вартість 1 л середовища, грн.	Концентрація емодину у культуральній рідині, г/л	Умовна вартість 1 г цільового продукту, грн/г	Тривалість культивування, год	Кількість утвореного емодину за годину, мг/л за год
<i>Aspergillus favipes</i> HN4-13	10,14	0,1327	76,41	168	0,788
<i>Aspergillus awamori</i> WAIR120	13,13	0,0000427	>2798,2	240	0,00018
<i>Aspergillus ochraceus</i> LP-316	3,8	0,001358	2798,2	168	0,008

Отже, умовна вартість 1 г емодину при культивуванні *Aspergillus favipes* HN4-13 є найнижчою (76,41 грн/г) у порівнянні з умовною вартістю емодину, одержаного культивуванням *Aspergillus awamori* WAIR120 (>2798,2 грн/г) та *Aspergillus ochraceus* LP-316 (2798,2 грн/г).

Продуктивність біосинтезу емодину у *Aspergillus favipes* HN4-13 є найбільшою (0,788 мг/л за год) у порівнянні з *Aspergillus awamori* WAIR120 (0,00018 мг/л за год) та у порівнянні з *Aspergillus ochraceus* LP-316 (0,008 мг/л за год).

Зважаючи на найнижчу вартість 1 г цільового продукту (76,41 грн/г) та високу продуктивність (0,788 мг/л за год при тривалості культивування 168 год), штам *Aspergillus favipes* HN4-13 є найкращим продуцентом емодину з проаналізованих вище штамів.

3.4. Розрахунок потреби у субстанції для випуску ЛЗ та розрахунок річної потреби у культуральній рідині для одержання розрахованої кількості субстанції.

При розрахунку потреби у субстанції емодину, який необхідний для виробництва лікарського препарату, враховуються наступні захворювання:

- ✓ Інфекційні захворювання шкіри та підшкірних тканин спричинені *S. aureus* та MRSA;
- ✓ Гематогенний остеомієліт спричинений *S. aureus* та MRSA;
- ✓ Синдром токсичного шоку (СТШ).

Далі в табл. 3.8 наведені дані для розрахунку потреби у субстанції.

Вихідні дані для розрахунку річної потреби у субстанції емодину

Захворювання	Дозування препарату ¹	Курс лікування ¹	Кількість хворих в рік на території України ² [90, 142, 143, 144]	Необхідна кількість субстанції емодину для виробництва препарату, кг
Інфекційні захворювання шкіри та підшкірних тканин спричинені <i>S. aureus</i> та MRSA	400 мг емодину у вигляді інфузії 1 раз на добу у складі комплексної терапії	21 доба	85,1 тис.	714,84
Гематогенний остеомієліт спричинений <i>S. aureus</i> та MRSA у дітей		14 діб	32,2 тис.	180,32
Синдром токсичного шоку (СТШ)		3-5 діб	300	0,6
Всього емодину необхідно 895,76 кг				

Примітки:

¹ – дозування препарату є орієнтовним та оснований на дозуванні аналога за фармакологічними властивостями [141].

² – дані наведені за 2017 р.

Виходячи з даних наведених у таблиці 3.8 річна потреба ринку, враховуючи захворюваність людей на території України, у субстанції емодину для виробництва лікарського препарату становить 895,76кг.

Розрахунок річної потужності виробництва субстанції, об'єму ферментера та кількості виробничих циклів.

Виходячи з того, що на ринку є достатньо потужні виробництва субстанції емодину, які розташовані у Китаї, планується на початку виходу на ринок покривати 10% потреби у субстанції, тобто $895,76 \cdot 0,1 = 89,576$ кг.

Отже, річна потреба в субстанції емодину для виробництва лікарського препарату має становити $89576 \text{ г} / 0,132 \text{ г/л} = 678606 \text{ л}$ або $678,6 \text{ м}^3$, де $0,132 \text{ г/л}$ – концентрація емодину в культуральній рідині. З урахуванням 30% втрат під час виробництва річна потужність має становити $G_p = 678,6 + 678,6 \cdot 0,3 = 882,18 \text{ м}^3$.

Розрахунок кількості виробничих циклів для отримання річної потреби цільового продукту.

1.1. Приймаємо кількість робочих днів на рік – 300. Ефективний фонд робочого часу $N_{\text{еф.}} = 300 \times 24 = 7200 \text{ год.}$

1.2. Розрахуємо цикл роботи ферментера:

$$T_{\text{цф}} = T_{\text{ф}} + T_{\text{др}} = 168 + 10 = 178 \text{ (год), де}$$

$T_{\text{ф}}$ – тривалість виробничої ферментації (біосинтезу);

$T_{\text{др}}$ – тривалість допоміжних робіт (допоміжні роботи включають: миття та огляд (2 год), перевірка на герметичність (2 год), стерилізація (2 год), охолодження (1 год), завантаження середовища (1,5 год), засів (0,5 год), вивантаження культуральної рідини (1 год).

1.3. Кількість циклів за рік становитиме:

$$n_{\text{ц}} = N_{\text{еф.}} / T_{\text{цф}} = 7200 / 178 = 41$$

1.4. Об'єм культуральної рідини, який треба одержати за цикл:

$$V_{\text{кр}}^{\text{н}} = V_{\text{кр}}^{\text{річ}} / n_{\text{ц}} = 882,18 / 41 = 21,5 \text{ м}^3$$

Обираємо ферментер об'ємом 36 м^3 з коефіцієнтом заповнення $K_z = 0,6$. Об'єм культуральної рідини становить $V_{\text{к.р}} = 21,6 \text{ м}^3$, що більше за розрахований, тобто обраний вірно.

Розрахунок кількості стадій підготовки посівного матеріалу. Для вирощування продуцентів емодину використовують ферментери загальним об'ємом 36 м^3 . Коефіцієнт заповнення $K_{\text{зап.}} = 0,6$. Отже, робочий об'єм ферментера:

$$V_{\text{роб.}} = V_{\text{заг.}} \times K_{\text{зап.}} = 36 \times 0,6 = 21,6 \text{ м}^3$$

Визначаємо кількість стадій підготовки посівного матеріалу, для приготування $21,6 \text{ м}^3$ культуральної рідини. Кількість посівного матеріалу становить близько 10 % від загального об'єму поживного середовища.

1) Для приготування $21,6 \text{ м}^3$ культуральної рідини, потрібно: $21,6 \times 0,1 = 2,16 \text{ м}^3$ або 2160 л посівного матеріалу. Таку кількість посівного матеріалу можна приготувати у ферментері об'ємом $3,2 \text{ м}^3$.

2) Щоб приготувати $2,16 \text{ м}^3$ культуральної рідини, потрібно: $2160 \times 0,1 = 216$ л посівного матеріалу. Таку кількість посівного можна приготувати у ферментері об'ємом 400 л.

3) 216 л культуральної рідини можна приготувати, засіявши поживне середовище $216 \times 0,1 = 21,6$ л посівного матеріалу (приготування здійснюють у ферментері об'ємом 30 л).

4) Щоб приготувати 21,6 л культуральної рідини, потрібно: $21,6 \times 0,1 = 2,16$ л посівного матеріалу. Таку кількість посівного можна отримати при вирощуванні посівного матеріалу у інокуляторі об'ємом 5 л.

Таким чином, процес підготування поживного середовища проходитиме у чотири етапи, п'ятим етапом буде сам процес біосинтезу.

РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ТА ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ

4.1. Стадія відділення біомаси.

Першим етапом на шляху виділення і очищення цільового продукту є розділення культуральної рідини на супернатант і біомасу клітин.

Оскільки продуцент *Aspergillus favipes* HN4-13, утворює міцелій при культивуванні, то для відділення біомаси розглянемо фільтрацію та центрифугування. Міцелій відокремлюють у фільтрах-пресах, нутч-фільтрах (під вакуумом) або друк-фільтрах (під тиском).

Центрифугування – процес розділення суспензій і емульсій у полі відцентрових сил; проводиться в машинах, що називаються центрифугами. Центрифуга являє собою циліндричний ротор, що обертається за допомогою електродвигуна, і розміщений у співвісному циліндричному нерухомому кожусі. Якщо ротор має суцільні бічні стінки, центрифуга називається відстійною; якщо бічні стінки ротора перфоровані (покриті фільтрувальною перегородкою), то центрифуга називається фільтруючою.

У відстійних центрифугах здійснюють розділення суспензій і емульсій за принципом відстоювання. У фільтруючих центрифугах здійснюють процес розділення суспензій за принципом фільтрування. Таким чином, загальні закономірності центрифугування мають подібність із закономірностями відстоювання і фільтрування. Однак процеси в центрифугах набагато складніші [145].

Фільтруванням називають процес поділу суспензій з використанням пористих перегородок. Перегородка затримує тверду фазу суспензії і пропускає її рідку фазу. Фільтрування застосовують для більш ретельного

					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ									
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата										
Розроб.		Мичкодан М. І.			РОЗДІЛ 4. ОБҐРУНТУВАННЯ ТА ПІДБІР ТЕХНОЛОГІЧНОГО ОБЛАДНАННЯ З ВРАХУВАННЯМ МАТЕРІАЛЬНИХ ПОТОКІВ ПО СТАДІЯХ				Літ.		Арк.		Аркушів	
Керівник		Стабніков В. П.									68		135	
Реценз.														
Н. Контр.									Кафедра БТМ					
Затверд.		Стабніков В. П.												

поділу суспензій і пилу, ніж шляхом осадження. У результаті фільтрування суспензія розділяється на чистий фільтрат і вологий осад. Останній при необхідності піддають операції промивання, продувки і сушіння безпосередньо на фільтрувальній перегородці[145].

Відкритий нутч-фільтр представляє собою прямокутний або циліндричний апарат з фільтруючою перегородкою розміщеною дещо вище його дна. Перегородка складається з пористих керамічних плиток або тканини, покладених на решітку. Після заповнення фільтра суспензією і включення вакууму фільтрат проходить через перегородку, а осад затримується на ній. Після фільтрування осад промивають і видаляють з фільтра зверху вручну.

Переваги відкритих нутч-фільтрів:

- можливість ретельної промивки осадів;
- легкість захисту від корозії;
- простота і надійність конструкції.

Недоліки відкритих нутч-фільтрів:

- мала швидкість фільтрування;
- громіздкість установки;
- ручна вигризка осаду [146].

Друк-фільтри – це пристрої, що застосовуються для фільтрування суспензій (розчинів із суспензією частинок), під впливом високого тиску, враховуючи це, їх корпуси, виробляють із матеріалів високої міцності.

Друк-фільтри є закритими ємностями, виготовлені з міцних матеріалів (зазвичай сталі). Внутрішній об'єм пристроїв розділений перфорованою плитою, яка називається хибним дном, на яку покладений фільтрувальний матеріал. При необхідності роботи з продуктами, що вимагають підтримки певної температури, корпуси фільтрів можуть бути забезпечені термосорочками, що забезпечують нагрівання або охолодження.

Як правило, суспензія, яку необхідно відфільтрувати, заливається у верхню частину установки і туди нагнітається надлишковий тиск. Проходячи

через фільтрувальну перегородку, суміш поділяється на тверду складову (осад), яка затримується на фільтрі та рідку (фільтрат), яка надходить у нижню частину апарату, після чого виводиться назовні[147].

Фільтр-прес - обладнання, що використовується для поділу рідини/твердої речовини. Зокрема, фільтр-прес відокремлює рідини та тверді речовини за допомогою фільтрації під тиском, при якій суспензія закачується у фільтр-прес і зневоднюється під тиском [148].

Основною перевагою рамних фільтр-пресів перед камерними є більша кількість одержуваного зневодненого осаду за один фільтрувальний цикл [149].

Фільтр-прес має такі переваги порівняно з іншими типами фільтрувального обладнання:

1. Простий в експлуатації, зручний в обслуговуванні та безпечний у роботі з кількома пристроями безпеки. Можна використовувати різноманітні матеріали, такі як чавун (для роботи зі звичайними речовинами), бронза (для менших пристроїв), нержавіюча сталь (щоб уникнути забруднення), тверда гума або пластик (щоб уникнути металу) і дерево (для легкості).

2. Він забезпечує велику площу фільтрації на відносно невеликій площі.

3. Це універсальне обладнання, потужність якого може змінюватись залежно від товщини та кількості використовуваних рам. Площу поверхні можна збільшити, використовуючи камери до 60.

4. Цей прес має міцну конструкцію, яка дозволяє використовувати різницю тиску в 2000 кПа.

5. Експлуатація та технічне обслуговування досить просте, оскільки він не має рухомих частин, а тканину фільтра можна легко відновити.

6. Наявність усіх зовнішніх з'єднань робить пластину ізольованою на випадок, якщо можна уникнути будь-яких витоків і забруднення фільтрату.

7. Виробляє сухий шрот у формі плити[150].

Оскільки продуцент утворює міцелій, тому доцільно використати рамний фільтр-прес (для відділення біомаси). До переваг якого можна

віднести тривалий термін експлуатації при періодичній заміні фільтруючої тканини не частіше ніж один раз на 1-2 роки.

4.2. Стадія звільнення від домішок отриманого супернатанту.

Після відділення біомаси розчин потрібно звільнити від домішок, які в ньому містяться.

Ультрафільтрація – процес мембранного розділення розчинів високомолекулярних та низькомолекулярних сполук, а також фракціонування і концентрування високомолекулярних сполук. Він протікає під дією різниці тисків до і після мембрани.

Ультрафільтрацію, на відміну від зворотного осмосу, використовують для розділення систем, в яких молекулярна маса розчинених компонентів набагато більша молекулярної маси розчинника. Наприклад, для водних розчинів приймають, що ультрафільтрація доцільна тоді, коли хоча б один з компонентів системи має молекулярну масу від 500 і вище.

Оскільки осмотичні тиски високомолекулярних сполук малі (як правило, вони не перевищують десятих часток МПа), при розрахунку рушійної сили процесу ультрафільтрації ними часто можна знехтувати. Тому ультрафільтрацію проводять при порівняно невисоких тисках (0,2-1,0 МПа).

У процесах ультрафільтрації використовуються ацетатцелюлозні мембрани і мембрани, що отримуються на основі інших полімерних матеріалів [151].

Процес відділення від розчинника великих колоїдних частинок або зважених мікрочастинок розміром 0,02-10 мкм називають **мікрофільтрацією**.

Мембрани для мікрофільтрації зазвичай мають ізотропну структуру. Вони мають високу продуктивність, особливо в початковий період експлуатації. Мікрофільтрацію, як правило, здійснюють при малих тисках щоб уникнути значних деформацій, до яких схильні мембрани при накладанні навантаження. Мембрани для мікрофільтрації найчастіше використовують у вигляді дисків різних діаметрів. Останнім часом для збільшення площі

фільтрації на основі мікрофільтраційних мембран виготовляють патронні фільтри.

З метою найбільш повного використання специфічних властивостей мікрофільтрів колективні дисперсії рекомендується піддавати попередній фільтрації на спеціальних фільтрах.

Мікрофільтрація може бути двох типів: тупиковою (патронні фільтри) і проточною з тангенціальним потоком.

Тупикова мікрофільтрація застосовується в основному для середовищ, в яких міститься невелика кількість забруднюючих речовин.

На відміну від тупикової, яка базується на затриманні домішок на поверхні і в об'ємі фільтра, тангенціальна мікрофільтрація передбачає винесення виділених домішок з поверхні фільтра паралельним потоком вихідної рідини, що запобігає їх накопиченню на поверхні фільтра.

Кінцевими продуктами процесу, як і при ультрафільтрації, є пермеат і концентрат. Продуктивність мембран значно знижується через скупчення забруднень на поверхні і забивання пор. Для підтримки їх продуктивності застосовуються три методи: автоматична продувка зворотним струмом стисненого газу (фірма «Memtec»); зворотна промивка пермеатом протягом 1–3 с при витраті 0,2–1 л/м² (фірма «Енка»); періодична промивка мембран водою і в деяких випадках хімікатами. Неорганічні мембрани мають переваги завдяки високій термічній і хімічній стійкості. Для утворення осаду застосовуються заряджені мембрани і спеціальні конструкції мембранних елементів.

У звичайних мембранах переважають ситовий і сорбційний механізми, в заряджених – електростатичний, що дозволяє затримувати мікрочастинки значно менших розмірів, ніж діаметр пор мікрофільтра. Одночасно скорочуються площа і кількість мембранних апаратів. Ефективніше відбувається затримання бактерій і ендоксинів на зарядмодифікованих мембранних фільтрах.

Метод мікрофільтрації набув великого значення поряд з такими мембранними процесами, як зворотний осмос і ультрафільтрація. Мікрофільтрація як ефективний спосіб видалення дисперсних частинок, вже більше тридцяти років успішно застосовується в різних технологіях[151].

Переваги ультрафільтрації:

- компактне розташування в порівнянні з традиційними схемами;
- тривалий термін експлуатації мембранних елементів;
- низький робочий тиск;
- повна автоматизація.

Отже, для звільнення розчину від домішок доцільно використовувати ультрафільтраційну установку.

4.3. Стадія виділення та очищення емодину.

Висока гідрофільність антрахінонів і як наслідок, нерозчинність в неполярних розчинниках не дозволяють використовувати для їх виділення екстракційні методи. Наявність великого числа вуглеводних залишків надає їм властивості сильних багатовалентних основ, що дає можливість очищати антрахінони сорбцією на іонообмінних смолах.

Іонообмінна смола - це високомолекулярна синтетичне з'єднання з тривимірною гелевою і макропористою структурою, здатне вступати в реакції обміну з іонами розчину. Залежно від полярності іонообмінні смоли підрозділяються на катіоніти, аніоніти і біполярні іонообмінні смоли. Катіоніти бувають сильно - і слабокислотні, а аніоніти - сильно - і слабозагальні. Іонообмінна смола являє собою дрібні кульки полімеру.

Іонообмінна сорбція визначається характером іоногенних груп, що присутні у сорбенті, та структурою сорбента. Частіше використовують синтетичні іонообмінні смоли, які представляють собою типові гелі. Їхній каркас-матриця складається з неправильної високополімерної просторової сітки вуглеводневих ланцюгів.

Хімічне очищення емодину проводять на катіоніті КУ-02, що включає наступні операції: сорбція з нативного розчину, елюювання мінорних компонентів і десорбція емодину.

Катіоніти – це тверді нерозчинні речовини, здатні обмінювати свої іони на іони з розчину, що їх оточує. Зазвичай вони є синтетичними органічними смолами, іонообмінна смола відрізняється механічною міцністю, високою хімічною стійкістю до дії кислот, лугів, окисників, і осмотичною стабільністю [152, 153].

Отже, для очищення емодину використовуємо іонообмінну смолу катіоніт КУ-02 та установку для проведення процесів іонообмінної сорбції.

4.4. Стадія концентрування розчину емодину.

Наступний етап – концентрування антибіотика. Для цього варто розглянути такі методи концентрування як випарювання та ультрафільтрацію.

До мембранних процесів розділення розчинів відносять зворотний осмос, ультрафільтрацію, мікрофільтрацію, діаліз, електродіаліз. Ці процеси одночасно очищують та концентрують розчин. Ступінь концентрування від 50 % до 250 % сухих речовин. Мембранні установки прості, невеликі за габаритами, економічні та легко автоматизуються. При ультрафільтрації затримуються молекули розмірами 5-50 нм, зворотного осмосу - 2-5 нм [154].

Ультрафільтрацією називають процес очищення та концентрування розчинів високомолекулярних з'єднань (наприклад, ферментів) з одночасним очищенням їх від низькомолекулярних домішок шляхом пропускання розчину через мембрану з порами розміром від 0,01 до 0,1 мкм. На відміну від мікрофільтрації або звичайної фільтрації при ультрафільтрації затримуються окремі молекули розчиненої високомолекулярної речовини; при ультрафільтрації відбувається не розділення фаз, а перерозподіл розчинених в рідкій фазі речовин. Тим часом проблема забивання пор фільтруючого матеріалу, характерна для звичайної фільтрації, має не менше, а можливо, і більше значення.

Важливою характеристикою будь-якої ультрафільтраційної мембрани є її селективність, що визначає ступінь затримання розчиненої речовини.

Селективність мембрани залежить від розмірів і форми молекул розчиненої речовини. Слід мати на увазі, що практично у всіх випадках існують молекули, що затримуються мембраною лише частково [155].

Недоліки мембранного методів концентрування: ретельна підготовка та очищення розчину, виникнення концентраційної поляризації— підвищення концентрації розчиненої речовини біля поверхні мембрани та утворення значної кількості пермеатів, що вимагають очищення перед скиданням у каналізацію [154].

Випарювання – процес утворення парової фази, який відбувається в усіх масі рідини і, головним чином, на межі між паровою бульбашкою і рідиною. Випарювання настає при температурі кипіння, при якій тиск насиченої пари рідини дорівнює зовнішньому тиску. Процес пароутворення до настання моменту кипіння називають випаровуванням.

Випарювання є тепловим процесом і його використовують для зневоднення розчинів, суспензій з метою концентрації твердої фази або розчиненої речовини. Процес випарювання проводять у випарних апаратах різної конструкції.

У мікробіологічній промисловості найбільш широко використовуються процеси випарювання у вакуумних установках (апаратах) як найбільш економічний спосіб попереднього концентрування продуктів. Для кожного продукту біосинтезу, що концентрується, час перебування у випарному апараті при відповідній температурі визначається дослідним шляхом. На підставі дослідних даних вибирається відповідна конструкція випарного апарата, що забезпечує оптимальний час перебування середовища в апараті при заданій продуктивності при мінімальних витратах енергії [154, 155].

Отже, з метою концентрування супернатанту обрано метод випарювання, адже, по-перше, даний метод є найбільш економічнішим, що в

свою чергу кардинально не вплине на собівартість готового продукту, по-друге, культуральна рідина не потребує додаткової підготовки перед процесом концентрування.

4.5. Стадія сушіння.

Сушіння – процес видалення вологи з матеріалів, при якому використовують теплову енергію для її випаровування та відведення пари, що утворюється. Після очищення та концентрування антибіотик відправляють на сушіння: для чого використовують ліофільне сушіння, висушування в розпилювальній сушарці, висушування у зваженому шарі або у вакуум-сушильних апаратах.

Метод ліофільного сушіння полягає в тому, що вологий матеріал чи розчин (розчин антибіотика), заморожені до температури мінус 20-40 ° С сушаться у вакуумі з залишковим тиском близько 0,01 мм рт. ст., шляхом сублімації води з кристалів льоду. Основним недоліком вакуумної сублімаційної сушки – висока вартість, потребує криогенні умови, що призводить до великої кількості затрат на його експлуатацію.

Сушіння розпиленням є одним з найбільш сучасних та перспективних методів зневоднення лікарських розчинів термолабільної природи. В принципі метод сушіння полягає в тому, що розчин, що висушується, розпорошується за допомогою форсунок, струменя стисненого повітря або швидко обертового диска до частинок розміром 5-25 мкм в струмі протікає через сушильну камеру нагрітого до температури порядку 160° З повітря. Розмір поверхні частинок близько 0,5 млн. м² на 1 м³ розчину забезпечує сушіння протягом часток секунди. Висушений продукт у вигляді порошку відокремлюється від відпрацьованого теплоносія у спеціальних пилевіддільниках.

Вибір способу подачі сушильного агенту зумовлений схемою процесу: прямотечією або протитечією. Якщо подачу здійснювати зверху, то сушіння буде організовано прямотечією. Такий метод менш інтенсивний, ніж протитечією, але це сприяє м'якшому режиму сушіння. При нижній подачі –

можливо забезпечити безперервний процес подачі. З економічної точки зору обидва методи приблизно рівноцінні. Молекулярне сушіння (ліофільне) потребує у 2,7 разу більше виробничої площі та у 2,1 разу більша витрата електроенергії, трудові витрати також вищі. Разом з тим вихід антибіотиків при молекулярному сушінні на декілька відсотків вище, ніж при розпилювальній сушці.

Отже, для сушіння підійде прямотечійна (оскільки сприяє м'якшому режиму сушіння) розпилювальна сушарка з верхнім підведенням повітря, з конічним днищем [155, 156].

РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Специфікація обладнання ділянки післяферментаційних процесів

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
З – 1 З – 6, З - 9	Збірник	3	Збірник об'ємом 50 л та 100 л, виготовлений із нержавіючої сталі AISI 304. Виробник: ТОВ «Метал сервіс груп», Україна [1].
Н-2 Н-7 Н-10	Насос відцентровий	3	Насос відцентровий DAB KPF (Україна). Потужність двигуна – 0,310 кВт; Продуктивність – 0,05 м³/год; Висота подачі – 20м [2].
ФП-3	Рамний фільтр-прес	1	Рамний фільтр-прес виробництва компанії «Xinhai» (Китай). Площа фільтрування: 15-900 м²[3].
УФ-4	Ультрафільтраційна установка	1	Установка ультрафільтрації продуктивністю 5-10 м³/год. Виробник: Україна [4].
ІС-5	Установки для проведення процесів іонообмінної сорбції	1	Установка для проведення процесів іонообмінної сорбції виробництва компанії «Sartorius» (Німеччина). Для сорбції в нерухомому шарі застосовуються сорбційні колони діаметром від 100 мм до 1400 мм і висотою від 800 мм до 5000 мм[5].
РПВ -8	Роторно-плівковий випарник	1	Роторно-плівковий випарник виробництва компанії «Гранд». Габаритні розміри, м: 1,5х3х4,5 Продуктивність, кг: 80 - 1200 по випарюваній волозі в годину [6].

НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ

Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 5. СПЕЦИФІКАЦІЯ ОБЛАДНАННЯ	Літ.			Арк.	Аркушів
Розроб.		Мичкодан М. І.						78	135	
Керівник		Стабніков В. П.							79	
Реценз.						Кафедра БТМ				
Н. Контр.										
Затверд.		Стабніков В. П.								

Закінчення таблиці 5.1

РС-11	Розпилювальна сушарка	1	Сушильна установка А1-ОР2Ч. Установка А1-ОР2Ч є прямоточною розпилювальною сушаркою з відцентровим дисковим розпиленням, верхнім підведенням теплоносія, вертикальною циліндричною камерою і дном киплячого шару продукту, з наступним його охолодженням у віброохолоджувачі. Виробник: ПАТ «Калинівський машинобудівний завод», Україна [7].
ФПВ – 12	Фасувально-пакувальна машина	1	Фасувальний автомат з ваговим дозатором АФ-40 (8) –В. Продуктивність: до 400 уп./год [8].

Примітка:

1. <https://odessa.flagma.ua/> (Збірник)
2. <http://www.dabpump.com.ua> (Відцентровий насос)
3. <https://www.xinhaimining.ru> (Рамний фільтр-прес)
4. <https://prom-water.ua> (Ультрафільтраційна установка)
5. <https://sartorius.com> (Установки для проведення процесів іонообмінної сорбції)
6. <https://www.oborud.info> (Роторно-плівковий випарник)
7. <https://www.kmbp.com.ua> (Розпилювальна сушарка)
8. <https://prom.ua> (Фасувально-пакувальна машина)

РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ

Технологічна схема виділення та очищення емодину включає наступні технологічні процеси: відділення біомаси на рамному фільтр-пресі, звільнення від домішок ультрафільтрацією, очищення емодину іонообмінною сорбцією, концентрування у роторно-плівковому апараті, сушіння в прямотечійній розпилювальній сушарці, пакування та маркування субстанції.

Технологічну схему виділення та очищення наведено у графічній частині проекту.

ТП 1. Відділення біомаси.

ТП 1.1. Фільтрування культуральної рідини на рамному фільтр-пресі.

Культуральна рідина, що утворюється в процесі виробничого біосинтезу, подається по трубопроводу в збірник (З-1), звідки за допомогою відцентрового насоса (Н-2) подається в рамний фільтр-прес (ФП-3). Початком циклу фільтр-пресу є стиснення пакета пластин і рами за допомогою гідроциліндра, ручного або механічного приводу. Потім суспензія під тиском перекачується через канал подачі в раму фільтр-преса. Одночасно фільтрат проникає через фільтрувальну тканину і виводиться з фільтр-преса через дренажний канал, при цьому тверда фаза утримується фільтрувальною тканиною і заповнює внутрішню частину рами. Оскільки камери продовжують заповнюватися осадом, швидкість потоку суспензії зменшується, а кількість фільтрату, що виділяється, зменшується.

З метою зневоднення осаду та досягнення необхідного рівня вологості тиск закачування підтримується до 0,7 МПа. Під дією гідравлічної системи пакет плит розсувається, сформований корж витягується і випадає з рами в

					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Мичкодан М. І.			РОЗДІЛ 6. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ПІСЛЯФЕРМЕНТАЦІЙНОГО ВИДІЛЕННЯ І ОЧИЩЕННЯ СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ	Літ.	Арк.	Аркушів
Керівник		Стабніков В. П.					80	135
Реценз.						81		
Н. Контр.						Кафедра БТМ		
Затверд.		Стабніков В. П.						

приймальну ємність.

ТП 2. Звільнення фільтрату від домішок.

ТП 2.1. Очищення розчину на ультрафільтраційній установці.

Розчин, що був отриманий на попередній стадії, по трубопроводах направляється на установку ультрафільтрації, де видаляються домішки (УФ-4). Система складається з насоса для подачі вихідного розчину, попереднього фільтра, стійки з модулями ультрафільтрації та бака для фільтрату/зворотної промивки.

Вихідний розчин насосом подається в модуль ультрафільтрації. Перед модулем розчин пропускається через попередній фільтр, який відфільтровує грубі частинки і таким чином захищає мембрани. Потік розчину проходить через ультрафільтраційні мембрани і потрапляє в резервуар для фільтрату/зворотної промивки. Періодично мембрани промиваються, видаляючи забруднення, які накопичилися на поверхні мембрани. Для підвищення ефективності зворотного промивання в промивну воду можна додавати реагенти.

Очищення мембрани досягається за рахунок великого перепаду тиску в системі, в результаті чого забруднення відриваються від поверхні та змиваються потоком рідини.

ТП 3. Виділення та очищення емодину.

ТП 3.1. Очищення емодину іонообмінною сорбцією.

Очищений емодин вмісний розчин, який був отриманий на попередній стадії, направляють на установку іонообмінних сорбційних процесів (ІС-5). Сорбційно-промивний апарат є основним елементом установки, а саме пульсаційна колона з насадками. Сорбційний омивач оснащений спеціальними насадками – стрижнем, на якому розташовані металеві диски або пластини зі спеціальними отворами, які мають похилі лопаті на однаковій відстані одна від одної. Таке розташування насадок створює турбулентне перемішування потоку під час течії рідини, що забезпечує перехресне перемішування в апараті.

Перехресне перемішування в апараті здійснюється стисненим повітрям, яке пульсує спеціальним мембранним автопульсатором і подається в апарат через пульсаційну камеру.

Сорбційна пульсаційна колона сконструйована таким чином, що забезпечує найбільш сприятливі умови масообміну, оскільки відбувається як поздовжнє, так і поперечне перемішування: сорбент знаходиться в псевдозрідженому шарі. У верхній частині колони встановлений розширювач, який зменшує поздовжнє і поперечне перемішування розчину, тим самим запобігаючи виносу смоли. Щоб смола не потрапляла в пульсаційну камеру і не витікала, в нижній частині колони встановлюють сітку діаметром 0,25 мм.

Концентрування сорбенту і десорбція відбуваються в елюентній колоні. Сорбційний агент переноситься з сорбційного промивного апарату в елююючу колонку через ерліфтний пристрій. Елюентна колонка для повернення сорбенту після десорбції та регенерації обладнана таким же ерліфтным пристроєм. Пристрій являє собою порожнисту металеву трубку, яка з'єднана з нижньою частиною пристрою. При надходженні повітря в трубку внаслідок зміни щільності рідини в трубці і в пристрої сорбент транспортується вгору по трубці. Система також включає збірний резервуар для збору, зберігання та попередньої обробки розчину. Резервуар забезпечується занурювальним відцентровим насосом.

Далі у збірник (3-6) збирається освітлений розчин і відправляється на випарювання.

ТП 4. Випарювання.

ТП 4.1. Концентрування у роторно-плівковому апараті.

Для концентрування розчину його насосом (Н-7) подають на роторно-плівковий випарник (РПВ-8). Випарювання відбувається у випарних трубах, в яких встановлені обертові механізми турбулентності роторного типу. Речовина, яка підлягає обробці, подається через сопло у верхній частині кожної з трубок. Він рівномірно розподіляється по перерізу труби

роторного випарника і під дією сили тяжіння стікає у вигляді плівки на внутрішню поверхню; Робочі органи обертового механізму «ковзають» по поверхні плівки. Зовнішня сторона трубки нагрівається парою до температури пароутворення речовини. Обертові лопаті роторно-плівкового випарника створюють в плівці вихрові структури, які прискорюють процеси тепломасообміну в ній і забезпечують ефективне розділення рідкої і парової фаз при випаровуванні. У той же час значною мірою запобігає утворенню відкладень на внутрішній поверхні випарної трубки.

Це перетворює більшу частину води, що протікає через випарну трубку ротаційного плівкового випарника, у «вторинну» пару. «Вторинна» пара протікає через сепаратор, а найбільші краплі вологи, захоплені парою, що містять концентрат речовини, що випаровується, залишаються на пластинах сепаратора; вони стікають з тарілок у ємність сепаратора. Концентрат, що утворюється в результаті випаровування речовини, по випарним трубам потрапляє на сепаруючу нижню частину роторного випарника. Потім він переміщується шнековим конвеєром, вбудованим у сепаратор випарника, або перекачується за допомогою насоса в ємність для зберігання концентрату (Z-9), звідки потім відправляється на подальшу переробку. «Вторинна» пара надходить у конденсатор, де конденсується. Конденсат з «вторинної» пари подається в накопичувач. Упарювання розчину проводять при температурі 75 °C протягом 20 хвилин під тиском 0,008-0,01 МПа.

ТП 5. Сушіння.

ТП 5.1. Розпилювальна сушка розчину емодину.

Концентрований розчин емодину подається з резервуара для зберігання (З-9) в розпилювальну сушарку (РС-11) за допомогою відцентрового насоса (Н-10) для отримання сухого порошку емодину. Концентрат, який підлягає сушінню, безперервно подається в апарат через отвір у кришці. Вал електродвигуна проходить через центр кришки. На кінці вала закріплений диск діаметром 100...400 мм зі спеціальною виїмкою. Диск обертається зі швидкістю 5...40 000 об/хв. Для досягнення такої швидкості між диском і

валом встановлений редуктор, який збільшує частоту обертання вала електродвигуна. Іноді для повороту валу використовують парову турбіну.

Після того, як струмінь концентрату під дією відцентрової сили досягає центру диска, рідина заповнює рельєфні канали диска, мікропотоки рухаються до його периферії, відриваються від краю диска і потрапляють у вигляді мікрокрапель до верхньої частини камери. При цьому зверху подається гарячий газоподібний потік осушувача (повітря). Агент попередньо нагрівається в нагрівачах, які, у свою чергу, нагріваються електрикою, природним газом або паром.

Після контакту осушувача з мікрокраплями вологого матеріалу вода випаровується практично миттєво, але температура на поверхні матеріалу відповідає температурі за мокрим термометром і ніколи не досягає температури теплоносія. В результаті висушений продукт виходить з нижньої частини пристрою.

Параметр процесу: температура сушіння $95 \pm 1^{\circ}\text{C}$, швидкості подачі розчину $0,001\text{--}0,002 \text{ м}^3/\text{год}$ і швидкості потоку повітря $4 \text{ м}^3/\text{год}$. Кінцевий вміст вологи: $W = 4\%$.

ПМВ 6. Пакування та маркування субстанції емодину.

Фасування субстанції емодинувідбувається у поліетиленові пакети, з наступним пакуванням їх у картонні туби та нанесення на них етикетки, на якій вказана наступна інформація: назва виробника, назва субстанції, вага, дата фасування та термін придатності.

Дані процеси здійснюються автоматично за допомогою фасувально-пакувальної машини (ФМП-12).

РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛЗ. (ПІДБІР СУЧАСНИХ МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ВИРОБНИЦТВА)

Упродовж етапів виділення та очищення емодин, який було синтезовано біологічним агентом *Aspergillus favipes* HN4-13, піддається наступним видам аналізу:

- ✓ Визначення якості емодину за допомогою тонкошарової хроматографії;
- ✓ Кількісне визначення емодину за допомогою спектрофотометра;
- ✓ Визначення ідентичності виділеного емодину;
- ✓ Визначення антимікробної активності емодину методом дифузії в агар.

Визначення якості емодину за допомогою тонкошарової хроматографії. Для дослідження використовується субстанція емодину, яка синтезована *A.favipes* та еталонний стандарт емодину (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Німеччина). Дані зразки поміщають на пластини тонкошарової хроматографії (ТШХ) з використанням хлороформ:ацетон (93:7, об.:об.) як систему проявлення. Плями емодину ($R_f = 0,61$) виділяють у вигляді оранжево-червоного кольору у видимому світлі (рис. 5.1)[1].



					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ							
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 7. КОНТРОЛЬ ВИРОБНИЦТВА СУБСТАНЦІЇ ДЛЯ ЛЗ .(ПІДБІР СУЧАСНИХ МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ВИРОБНИЦТВА)				Літ.	Арк.	Аркушів	
Розроб.	Мичкодан М. І.										85	135
Керівник	Стабніков В. П.								86			
Реценз.									Кафедра БТМ			
Н. Контр.												
Затверд.	Стабніков В. П.											

Рис. 5.1. ТШХ емодину, виділеного з культури *A.favipes*, дає оранжево-червоні плями у видимому світлі. Доріжка 1, стандарт емодину (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Німеччина); доріжка 2, зразок емодину *A.favipes*[158].

Кількісне визначення емодину. Кількісно визначення здійснюється за допомогою спектрофотометра Spectronic Molton Roy Co., 20 D. Спектрофотометричне випробування виконують при 520 нм за допомогою реакції, що містить буферний розчин Бріттона-Робінсона. (суміш 0,04 М фосфорної кислоти, 0,04 М борної кислоти та 0,04 М оцтової кислоти, яка була титрована до рН 12 0,2 М NaOH). Поглинання вимірюють через 2 хвилини використовуючи буферний розчин як стандарт, а значення концентрації емодину отримують за допомогою лінійного діапазону стандартної кривої[158].

Визначення ідентичності виділеного емодину. Ідентичність емодину підтверджується високоефективною рідинною хроматографією (HPLC; Surveyor, ThermoScientificCompany, США). Характеристики колонки для аналізу ВЕРХ: $5,0 \times 100$ мкм, 4,6 мм Hypersil goldC18 при 25°C. Рухома фаза складалася з метанолу та 2% водного розчину оцтової кислоти у співвідношенні 70:30 і прокачувалась зі швидкістю потоку 1,0 мл/хв. Матричний фотодіодний детектор налаштовується на довжину хвилі 220 нм і використовується об'єм ін'єкції 20 мкл [159]. Дані аналізу ВЕРХ зразка емодину, виділеного та очищеного від культури *A. favipes*, і автентичного зразка показали, що емодин відокремлювався за однакового часу утримування ($R_t = 3,0$ хв) (рис. 7.2).

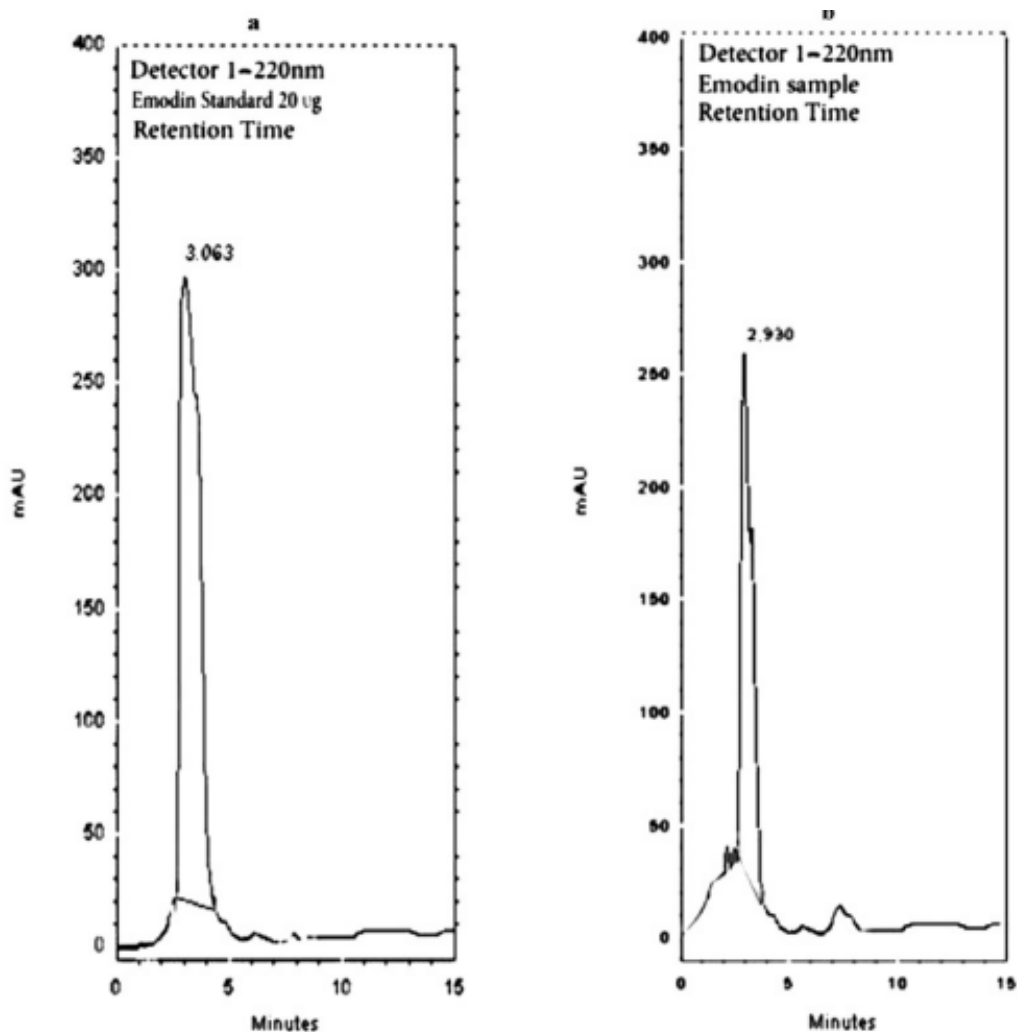


Рис. 7.2. ВЕРХ хроматограма емодину з часом утримання 3,0 хв. (а) Стандартний зразок; (б) зразок емодину, синтезований *A. favipes* [159].

Визначення антимікробної активності емодину методом дифузії в агар. Визначення антимікробної активності антибіотиків ґрунтується на їх здатності пригнічувати ріст мікроорганізмів. Визначення проводять методом дифузії в агар на щільному поживному середовищі шляхом порівняння розмірів зон пригнічення росту тест-штамів мікроорганізмів, які утворюються при випробуванні розчинів стандартного зразка та випробуваного препарату певних концентрацій. Метод заснований на логарифмічній залежності розмірів зон пригнічення зростання тест-мікроорганізмів від концентрації антибіотика, яка має бути лінійною.

Антимікробна активність антибіотиків виражається в одиницях дії - ОД або «мкг» на одиницю об'єму препарату. Для більшості антибіотиків 1 ОД або 1 мкг відповідають 1 мкг активної речовини (кислоти або основи); для антибіотиків, які мають інше кількісне вираження одиниці, відповідні вказівки даються у фармакопейних статтях.

При визначенні антимікробної активності антибіотиків використовують стандартні зразки, активність яких зазвичай встановлюють відповідно до міжнародних біологічних стандартів. За відсутності останніх для зазначених цілей можуть бути використані стандартні хімічні зразки, антимікробну активність яких розраховують на підставі показників якості, встановлених фізико-хімічними методами. Антимікробну активність стандартних зразків антибіотиків, які не мають аналогів у міжнародній колекції стандартів, розраховують також на підставі показників якості, встановлених фізико-хімічними методами.

Методика випробування. У скляні або пластмасові чашки Петрі розміром 20×100 мм або 20×90 мм, встановлені на столиках з горизонтальною поверхнею, розливають розплавлені поживні середовища певного складу в 1 або 2 шари. Для нижнього шару використовують стерильні незасіяні середовища, для верхнього або одного шару - стерильне агарове середовище, попередньо засіяне відповідним тест-мікроорганізмом. Якщо культура є суспензією вегетативних клітин, то температура розплавленого середовища, в яке вносять тест-штам, повинна бути $(49 \pm 1) ^\circ\text{C}$; при використанні суспензії спор – від 65 до 70 $^\circ\text{C}$. До середовища слід додати таку кількість суспензії вегетативних клітин або спор, яка забезпечує оптимальний ріст тест-мікроорганізму та чіткість зон затримки його росту. Кількість посівної дози визначають дослідним шляхом. Оптимальна кількість посівної дози має бути такою, щоб діаметр зон затримки для мінімальної концентрації антибіотика був не менше 14 мм.

Стерильні циліндри (6 штук) єдиного розміру та маси висотою $(10,0 \pm 0,1)$ мм та внутрішнім діаметром $(6,0 \pm 0,1)$ мм з нержавіючої сталі або

алюмінію розставляють на поверхні засіяного середовища на рівній відстані один від одного та від краю чашки. Замість циліндрів можуть бути використані лунки діаметром від 6 до 8 мм, зроблені в товщі агару за допомогою стерильного свердла або іншого відповідного пристрою.

У циліндри або лунки кожної чашки вносять рівні об'єми робочих розчинів стандартного та випробуваного зразків антибіотика. Основні розчини стандартних та випробуваних зразків готують у стерильних розчинниках з концентрацією 1 мг/мл. Потім з основних розчинів в залежності від застосовуваного варіанта методу дифузії в агар (тридозного або з побудовою стандартної кривої) готують робочі розчини трьох або однієї концентрацій випробуваного зразка та розчини трьох або п'яти концентрацій стандартного зразка. Робочі розчини досліджуваних зразків готують з основних розчинів таким чином, щоб їх концентрації не мали суттєвих відмінностей від концентрацій розчину стандартного зразка.

Для зменшення впливу коливань у часі між закапуванням розчинів, що використовуються в досліді, рекомендується після внесення витримувати їх у чашках при кімнатній температурі протягом 1-2 годин.

Діаметри зон затримки росту тест-мікроорганізму за допомогою відповідних приладів вимірюють з точністю до 0,1 мм. Кількість еодину розраховують за градувальним графіком [160].

РОЗДІЛ 8. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ

8.1. Розрахунок річної потужності виробництва ЛЗ та кількості серій на рік

Протягом року розрахована потужність біосинтезу емодину складає 89,576 кг (89576 г).

Кількість емодину в 1 мл готового лікарського препарату дорівнює 1,6 мг. Тоді:

$$\begin{aligned} &1 \text{ мл} - 1,6 \text{ мг} \\ &\times \text{мл} - 89576000 \text{ мг} \end{aligned}$$

Тому, на протязі року необхідно виготовити $x = (89576000 \text{ мг} \cdot 1 \text{ мл}) / 1,6 \text{ мг} = 55985000 \text{ мл}$ розчину для інфузій.

Планується випускати флакони з вмістом у ньому розчину для інфузій 250 мл. Продуктивність наповнювальної машини складає 2000 флаконів на годину. Прийmemo час роботи машини 8 годин. Отже, за один цикл наповнюється $2000 \cdot 8 = 16000$ флаконів або у перерахунку на об'єм розчину для інфузій у флаконі: $16000 \text{ флаконів} \cdot 250 \text{ мл} = 4000000 \text{ мл}$ розчину.

Тоді кількість серій на рік складає $55985000 / 4000000 = \approx 14$ серій.

8.2. Обґрунтування класів чистоти виробничих приміщень

Виробництво стерильної продукції потребує дотримання високих стандартів для уникнення забруднення мікроорганізмами, частками та пірогенами. Успішність цього процесу значно залежить від кваліфікації, навчання та дисципліни працівників. Забезпечення якості має вирішальне значення, адже важливо точно дотримуватися встановлених та валідованих методів приготування й технік. Не можна покладатися лише на кінцеві стадії виробництва чи тестування, щоб гарантувати стерильність чи інші аспекти якості.

					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Мичкодан М. І.			РОЗДІЛ 8. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ОДЕРЖАННЯ ЛЗ	Літ.	Арк.	Аркушів
Керівник		Стабніков В. П.					90	91 ₁₃₅
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						

Для виготовлення стерильної продукції потрібно використовувати чисті зони, до яких доступ має обмежуватися за допомогою повітряних шлюзів. Ці зони слід підтримувати відповідно до стандартів чистоти, постачаючи їм повітря, що пройшло відповідні фільтри.

Для забезпечення чистоти виробництва стерильної продукції важливо виконувати різні операції з підготовки компонентів, приготування та наповнення у відокремлених зонах всередині чистих зон. Виробничі процеси поділяються на дві категорії: у першій випадки продукцію піддають кінцевій стерилізації (в остаточному первинному пакуванні), а у другому - операції виконуються в асептичних умовах на кількох або на всіх стадіях.

Чисті зони для виробництва стерильної продукції класифікуються відповідно до необхідних характеристик навколишнього середовища. Кожна виробнича дія потребує певного рівня чистоти в експлуатованому стані, щоб знизити ризик забруднення частками або мікроорганізмами продукції чи оброблюваних матеріалів.

Для відповідності вимогам, чисті зони повинні бути спроектовані таким чином, щоб забезпечити конкретний рівень чистоти повітря у "оснащеному" стані. "Оснащений" стан означає, що система чистого приміщення повністю готова до роботи: виробниче обладнання встановлене і готове до функціонування, але відсутній персонал. "Експлуатований" стан відображає режим роботи системи чистого приміщення та обладнання за певною кількістю працюючого персоналу.

«Експлуатований» стан та «оснащений» стан мають бути встановлені для кожного чистого приміщення або комплексу чистих приміщень.

Для виробництва стерильних лікарських засобів виділяють чотири класи.

Клас А: Локальна зона для операцій, що становлять високий ризик для якості продукції, наприклад: зони дозування, закупорювання ємностей, відкривання ампул і флаконів, змішування в асептичних умовах. Як правило, такі умови забезпечуються ламінарним потоком повітря на робочому місці.

Системи ламінарного потоку повітря мають забезпечувати рівномірну швидкість повітря в діапазоні 0,36-0,54 м/с (керівний норматив), що застосовне до відкритого робочого місця в чистій кімнаті. Підтримування ламінарності має бути доказаним та валідованим. У закритих ізоляторах та боксах із рукавичками можна використовувати односпрямований потік повітря із меншими швидкостями.

Клас В: Навколишнє середовище для зони класу А у разі виготовлення і наповнення в асептичних умовах.

Класи С і D: Чисті зони для здійснення менш критичних стадій виробництва стерильної продукції [161].

8.3. Обґрунтування вибору підготовки первинної упаковки

Підготовка матеріалів для первинного пакування включає в себе послідовність дій: розпакування від тари, огляд і, за необхідності, відсів. Працівник, який займається цією підготовкою, повинен мати розуміння стандартних процедур для цього процесу.

Контроль за мікробіологічною чистотою матеріалів для первинного пакування здійснюється відповідно до Методичних рекомендацій з цього питання, затверджених наказом МОЗ України від 14.12.01 № 502.

Рекомендується використовувати напівавтомат для звільнення від тари, що дозволяє підняти її на рівень транспортного пристрою, здійснювати шарове зсування та накопичення на столі для подальшого перегляду.

Огляд може проводитися візуально, наприклад, на спеціальних столах з можливістю перевертання та підсвічуванням денним світлом. Відсів відбирають матеріали для первинного пакування, які не відповідають вимогам чинної нормативної документації [162], мають зовнішні відхилення.

Підготовка флаконів розпочинається з їх замочування, миття зовнішньої та внутрішньої поверхонь і стерилізації. Під час замочування розчин мийних речовин знищує забруднення, що дозволяє їм відокремитися від поверхні скла та бути видаленими. Перший етап миття, як правило, включає очищення внутрішньої поверхні флаконів, що відбувається механічним чином.

Миття зовнішньої та внутрішньої поверхонь флаконів виконується за допомогою шприцевого (струминного), ультразвукового або контактнo-ультразвукового методів або їх комбінацій.

Флакони останній раз промивають водою для ін'єкцій, яка пройшла через мембранний фільтр з порами, розмір яких не перевищує 5,0 мкм.

Після миття флакони направляють на процедуру стерилізації. Це відбувається в сушильно-стерилізаційних установках тунельного типу, де флакони проходять три зони: нагрівання до температури стерилізації (315 ± 35 °C), утримання при цій температурі протягом певного часу (5—30 хвилин) і охолодження за допомогою стерильного повітря, яке проходить через фільтр тонкого очищення.

Для підготовки пробок і ковпачків на виробництві використовується багатофункціональне обладнання з програмним управлінням, яке забезпечує виконання всіх необхідних операцій в рамках одного пристрою.

Очищення пробок і ковпачків включає послідовність різних обробних операцій, які чергуються між собою, і фінальних обполіскувань. Після кожної обробки пробок проводиться обполіскування спочатку проточною водою з водопроводу, а потім очищеною водою. Останнє полірування здійснюється водою для ін'єкцій, яка пройшла фільтрацію через пористий фільтр з розміром пор не більше 5,0 мікрометрів.

Стерилізацію пробок і ковпачків проводять за допомогою насиченої пари у спеціальних стерилізаторах, а потім вони висушуються стерильним повітрям. Очищені флакони, пробки і ковпачки поміщають у стерильні контейнери з кришками й зберігають у чистій зоні з рівнем чистоти не нижче класу D протягом не більше 24 годин [162,163].

8.4. Обґрунтування вибору підготовки води для ін'єкцій

Вода для ін'єкцій (ДФУ) – вода, яка використовується як розчинник при приготуванні ЛП для парентерального застосування (вода для ін'єкцій *in bulk*) або для розчинення чи розведення діючих речовин безпосередньо перед парентеральним застосуванням (вода для ін'єкцій стерильна). За

органолептичними показниками вона являє собою прозору, безбарвну рідину без смаку та запаху. Згідно з ДФУ вода для ін'єкцій повинна відповідати вимогам, що висуваються до води дистильованої, й бути апірогенною. Вода для ін'єкцій *in bulk* одержують із води питної або води очищеної шляхом дистиляції згідно з валідованими методиками та процедурами при регулярному контролі її питомої електропровідності та мікробіологічної чистоти в процесі виробництва. Одержання води для ін'єкцій здійснюється в асептичних приміщеннях, де категорично забороняється виконувати будь-які роботи, не пов'язані з процесом дистиляції, перегонкою питної або знесоленої води. Для цього використовують термокомпресійні аквадистилятори, частини яких, що контактують із водою, виготовлені з нейтрального скла, кварцу або підходячого металу. Проблемою при одержанні води для ін'єкцій є забруднення дистиляту пірогенними речовинами, що відбувається шляхом перенесення дрібних крапель води або винесення їх потоком пари в конденсатор. Тому обладнання має бути забезпечене ефективним пристроєм для запобігання захопленню крапель, а також належне утримування й технічне обслуговування обладнання. Першу порцію води, одержану на початку роботи, відкидають, потім дистилят збирають.

Під час виробництва води для ін'єкцій і подальшого її зберігання контролюють і відстежують загальну кількість життєздатних аеробних мікроорганізмів. Для простежування несприятливих тенденцій установлюють відповідну попереджувальну межу і відповідну межу, яка вимагає вживання заходів (10 життєздатних аеробних мікроорганізмів у 100 мл). При необхідності можуть бути встановлені більш жорсткі попереджувальні межі. Крім того, вода для ін'єкцій *in bulk* має витримувати випробування на нітрати — не більше 0,00002% (0,2 мм рт. ст.), важкі метали — не більше 0,00001% (0,1 мм рт. ст.) та бактеріальні ендотоксини — менше 0,25 МО/мл. Воду для ін'єкцій *in bulk* зберігають і використовують в умовах, що дозволяють запобігти росту мікроорганізмів й уникнути будь-яких інших забруднень. Надійність гарантується в спеціальних системах з інертного матеріалу, де

вода знаходиться при високій температурі та в постійному русі. Система складається з двох ємностей з паровим підігрівом та стерилізуючим повітряним фільтром і насоса, який перекачує воду з однієї ємності в другу з постійною швидкістю 1–3 м/с. Температура циркулюючої води підтримується теплообмінниками в межах 80–95 °С. З'єднуючі труби мають нахил 2–3° для забезпечення можливості повного змиву води при промиванні системи. Резервуари для зберігання води, трубопроводи та арматуру виготовляють із стійких до хімічної дії матеріалів спеціальних марок нержавіючої сталі, титану або скла. Максимальний термін зберігання — 24 год в асептичних умовах [164].

8.5. Вибір технологічних стадій та операцій, обладнання

1. Отримання води для ін'єкцій.

Один із найпоширеніших способів отримання води для ін'єкцій полягає у дистиляції, що означає процес випаровування рідини з подальшою конденсацією у вигляді пари. Цей процес передбачає перехід рідини у парову фазу, а потім знову у рідину під час конденсації.

У планах виробництва передбачається використання дистилятора DITES TECNinox [165] з виробничою потужністю 3,5 м³/год при тиску 0,75 МПа.

Дистилятори DITES від TECNinox відзначаються поєднанням надійності стандартного обладнання і гнучкості налаштування з високим рівнем якості, стабільною та ефективною продуктивністю.

Особливості:

- ✓ Вбудований зміювик попереднього нагрівання, новий дизайн, результат тривалих досліджень і досвіду;
- ✓ Система подачі спадаючої плівки з миттєвим ефектом швидкого випаровування для підвищення ефективності випаровування;
- ✓ Розділення крапель води на основі поєднання багатьох фізичних факторів;
- ✓ Автоматика та контроль: системою керує промисловий PLC на основі інтерфейсу HMI [165].

2. Миття та стерилізація скляних флаконів.

На цьому етапі виробництва планується використання лінії для миття та стерилізації флаконів Bosch, яка включає в себе мийну машину RRU 3040 і стерилізаційний тунель HQL 2240 [166].

Мийна машина RRU 3040 має 40 станцій, продуктивність до 12 000 флаконів на годину та підходить для флаконів діаметром від 8 мм до 52 мм х 128 мм у висоту. Включає ультразвукове очищення.

Тунель HQL 2240 має 2875 мм в довжину х 1300 мм в ширину х 2330 мм у висоту [9].

3. Змішування компонентів препарату.

Для виготовлення розчину для інфузій на виробництві передбачається застосування реакторів-змішувачів від компанії "Tecninox" [167].

Матеріали, які застосовуються при виготовленні реакторів, включають нержавіючу сталь 316L для елементів, що мають безпосередній контакт з продуктом, і нержавіючу сталь 304 для інших деталей.

Реактори, які можуть бути вертикальними або горизонтальними, можуть бути встановлені як нерухомі блоки або мати можливість переміщення. Вони можуть бути виготовлені у варіантах з однією, двома або трьома стінками, а також мати конусоподібне, плоске або торосферичне дно.

4. Фільтрація розчину для інфузій та його розлив у флакони

Розчин для інфузій буде фільтруватися та одночасно розливатися у флакони об'ємом 250 мл за допомогою устаткування BOSCH MLF 3002 [168].

Обладнання Bosch MLF 3002 призначене для наповнення та закриття флаконів з періодичним рухом. Це устаткування включає обертовий стіл для порожніх флаконів, 4 наповнювальні головки на поршнях, установку для вставлення пробок з дозатором, а також систему закриття флаконів з дозатором для ковпачків ALU.

Це обладнання підходить для контейнерів діаметром до 55 мм і висотою до 185 мм (з подвійним індексом), а також для вставок і кришок діаметром до 36 мм. Його продуктивність становить до 2000 флаконів за годину [168].

5. Стерилізація розчину для інфузій у первинному пакуванні (флаконі).

На даному етапі проводять стерилізацію розчину в первинній упаковці за використання автоклаву Zirbus серії 10H об'ємом камери 2 м³ [169].

Особливості обладнання:

- ✓ Власне пароутворення за допомогою вбудованого електричного генератора чистої пари;
- ✓ Варіант прямої установки для наземного завантаження автоклава;
- ✓ Версія з подвійними дверима з газонепроникним розділенням для чистих приміщень;
- ✓ Конструкція, що відповідає стандартам GMP, відповідно до DIN 58950 і правил FDA;
- ✓ Підключення до власної кільцевої системи охолодження для економії води. Теплообмін відбувається через пластинчастий теплообмінник і економить до 80% води;
- ✓ Рециркуляційний вентилятор ще більше скорочує час охолодження та забезпечує можливість стерилізації в пароповітряній суміші;
- ✓ Спринклерний процес з гарячою водою (HWSP) для швидкої та дбайливої стерилізації рідин у закритих ємностях [169].

6. Пакування флаконів у вторинну упаковку.

Під час упакування флаконів у вторинну упаковку, яка є картонною коробкою, передбачається використання горизонтальної картонажної машини HorizontalCartoner SC 5 IWK TL [170].

Ця компактна картонажна машина із серії SC 5 спеціально розроблена для фармацевтичної та косметичної галузей з низьким і середнім рівнем продуктивності до 200 коробок на хвилину.

Модульна структура цієї картонної машини дозволяє легко додавати додаткові функції пізніше, що гарантує просте адаптування до змінних

процесів упаковки. Робота може бути інтервальною або безперервною. Додатково вона має позитивний механізм відкривання коробки з контрприсосками та кінематикою монтажу.

Переваги використання:

- ✓ Дизайн і функції, що відповідають стандартам фармацевтичної промисловості;
- ✓ Короткий, компактний розмір конструкції;
- ✓ Центральний сенсорний екран з 3D візуалізацією;
- ✓ Оптимальна доступність для чищення та обслуговування;
- ✓ Можливе підключення до системи керування лініями SCADA [170].

РОЗДІЛ 9. СПЕЦИФІКА ОБЛАДНАННЯ

Специфікація обладнання, яке зображене на апаратурній схемі, наведена в табл. 9.1.

Таблица 9.1

Специфікація обладнання ділянки виготовлення ЛЗ

Позиція	Найменування	Кількість	Технічна характеристика (виробник)
1	2	3	4
ПЗ-1	Повітрозабірник	1	Пристрій забірний, обладнаний металевою сіткою для видалення механічних забруднень. Фірма: ООО «НПЦ Вектор-Кондвент». Виробник: Україна[1].
Ф-2	Фільтр грубої очистки повітря	1	Фільтр першого ступеня очистки типу ФЯП, Фільтруючий матеріал – мати зі скловолокна, Е = 80 %, продуктивність – 1530 м³/год[2].
В-3	Вентилятор	1	Відцентровий вентилятор Ostberg TKS 300 А, Швеція [3].
Т-4	Теплообмінник-охолоджувач	1	Теплообмінник-охолоджувач серії Swegon фірми «Parasol», (Німеччина) продуктивність 63 м³/год [4].
Т-5	Теплообмінник-нагрівач	1	Теплообмінник нагрівач серії NP70 фірми "DEFRO NP ", потік повітря 8268 м³/год, потужність 500 Вт, виготовлений з високоякісної котлової сталі [5].
Ф-6	Головний фільтр очистки повітря	1	Модель фільтра FMW. Ступінь очищення повітря 99%. Продуктивність фільтра складає 3400 м³/год.[6].
Ф-7	Фільтр типу НЕРА	1	Фільтр високоефективної очистки H12 фірми VOLZ Luftfilter, Німеччина. Фільтруючий матеріал: скловолокно. Робоча температура до +65°C. Ступінь очищення 99,999% [7].

					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ						
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 9. СПЕЦИФІКА ОБЛАДНАННЯ	Літ.		Арк.	Аркушів		
Розроб.		Мичкодан М. І.						99	10035		
Керівник		Стабніков В. П.				Кафедра БТМ					
Реценз.											
Н. Контр.											
Затверд.		Стабніков В. П.									

Н-8, Н-20	Насос відцентровий	2	Насос відцентровий DAB KPF (Україна). Потужність двигуна – 0,370 кВт; Продуктивність – 0,06 м ³ /год; Висота подачі – 25 м [8].
УФ-9	Ультрафіолетова установка	1	В установці ElectroSteriliser UV-C E-PP-55 використовується далекий короткохвильовий ультрафіолет типу С (УФ-С). із довжиною хвилі 254 нм [9].
ГФ-10	Грубий фільтр для очищення води	1	Raifil HMS-10B - магістральний фільтр Slim 10" з нержавіючої сталі для холодної води. Використовуються для видалення забруднень (мул, пісок, окислене залізо, суспензії) [10].
ПВ-11	Промислова система пом'якшення води	1	Продуктивність одного фільтру Ecosoft FU 2472CE15 складає 11,7 м ³ очищеної води за годину. Система працює в автоматичному режимі, а її обслуговування полягає лише в своєчасному додаванні таблетованої солі в ємність [11].
УФУ-12	Ультрафільтраційна установка	1	Система ультрафільтрації Toray UFS 1672T-S. ✓ Продуктивність: до 96 м ³ /год ✓ Кількість та типорозмір мембран: 16 x HFU - 2020N ✓ Площа фільтрації: 1152 м ² ✓ Споживання води при зворотному промиванні: 1,28 м ³ ✓ Піковий скидання води при зворотному промиванні: 106 м ³ /год ✓ Вихідний тиск: 1,0 - 7,0 атм [12].
ЗВО-13	Система зворотнього осмосу	1	Система зворотнього осмосу Aquagum AMRO-18K. Базова комплектація установки наступна: ✓ сталеві рами, покриті емаллю; ✓ мембраноутримувачі з нержавіючої сталі AISI304; ✓ префільтр тонкої очистки з фільтроелементом 5 мкм; ✓ трубна обв'язка PPR (FV-plast, Чехія); ✓ електрична шафа управління з промисловим контролером і ручним режимом управління [13].

СЕ-14	Система електродеіонізації	1	Наша лінійка EDI включає 14 стандартних модулів з продуктивністю до 60 м ³ /год. кожна серія розроблена з використанням високоякісних компонентів, що забезпечують максимальну надійність і простоту обслуговування [14].
З-15	Збірник	1	Збірник об'ємом 1 м ³ , виготовлений із нержавіючої сталі AISI 304. Виробник: ТОВ «Метал сервіс груп», Україна [15].
ШД-16	Шестиколонний дистилятор	1	Дистилятор DITEC TECNinox виробничою потужністю 4 м ³ /год, за тиску 0,8 МПа.
МСФ-17	Лінія миття та стерилізації флаконів	1	На даному етапі виробництва планується використовуватись лінія миття та стерилізації флаконів Bosch з мийною машиною RRU 3040 і стерилізаційним тунелем HQL 2240.
Д-18	Дозатор об'ємно-ваговий	1	Дозатор VD1-V8 (Україна). Обсяг дозуючої речовини - 0,2-400 кг [16].
РЗ-19	Реактор-змішувач для приготування розчину для ін'єкцій	1	Реактор об'ємом 400 л фірми «Діоніс» (Україна), оснащений перемішуючим пристроєм. Загальна швидкість перемішування 100 об/хв [17].
ФРІ-21	Установка для розливу у флакони	1	Процес фільтрації розчину для інфузій та одночасно процес його розливу у флакони ємністю 250 мл буде здійснюватися за використання обладнання BOSCH MLF 3002.
АФ-22	Автоклав для стерилізації флаконів	1	Автоклав Zirbusсерії 10Н об'ємом камери 2 м ³ .
КМ-23	Картонажна машина	1	Картонажна машина HorizontalCartoner SC 5 IWK TL до 200 пач/хв.

Примітка:

1. <https://www.c-o-k.ru> (Пристрій забірний).
2. <http://www.airpol.com.ua> (Фільтрпершогоступеня очистки).
3. <https://bioclimat.com.ua> (Вентилятор).
4. <https://promvit.com.ua>(Теплообмінник-охолоджувач серії Swegon фірми «Parasol»).
5. <http://defro.ua> (Теплообмінник нагрівач).
6. <http://www.airpol.com.ua> (Модель фільтра FMW).
7. <https://volzfilters.com> (Фільтр типу HEPA).
8. <http://www.dabpump.com.ua> (Відцентровий насос).
9. <https://aquapolis.ua> (Ультрафіолетова установка).
10. <https://aquapure.com.ua> (Грубий фільтр).
11. <https://prom.ua> (Промислова система пом'якшення води).
12. <https://prom.ua> (Ультрафільтраційна установка).
13. <https://www.aqua-room.com.ua> (Система зворотного осмосу).
14. <https://www.eurowater.com> (Система електродеіонізації).
15. <https://odessa.flagma.ua/> (Збірник).
16. <https://prom.ua> (Дозатор об'ємно-ваговий).
17. <https://odessa.flagma.ua> (Реактор-змішувач для приготування розчину).

РОЗДІЛ 10. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ (ОТРИМАННЯ ЛЗ)

Технологічна схема виготовлення розчину для інфузій, що містить емодин, включає допоміжні роботи (підготовка вентиляційного повітря, підготовка води для ін'єкцій та підготовка первинного пакування) та технологічний процес (приготування розчину для інфузій, фільтрація розчину та розлив у флакони, стерилізація розчину у первинному пакуванні, а також пакування та маркування у вторинну упаковку).

Технологічну схему наведено у графічній частині.

ДР 1. Підготовка вентиляційного повітря.

ДР 1.1. Забір атмосферного повітря

В залежності від сезону та місця забору, склад повітря може відрізнятися за вмістом аерозольних забруднень. Тому забір атмосферного повітря проводять за допомогою збірного пристрою (ПЗ-1) у вищій точці на висоті 10 метрів.

ДР 1.2. Грубе очищення повітря

Повітря проходить через фільтр грубої очистки (Ф-2), де воно очищається від пилу та механічних частинок, досягаючи рівня очищення на рівні 80%. Після цього вентилятор (В-3) направляє його у кожухотрубний теплообмінник (Т-4), де воно охолоджується за допомогою хладагенту фреону або, відповідно до потреб пори року, підігрівається до 21–23°C за допомогою теплообмінника-нагрівача (Т-5). Вологість повітря підтримується у діапазоні 30–60%.

ДР 1.3. Тонке очищення повітря

Далі повітря потрапляє у фільтр тонкого очищення (Ф-6), на якому забезпечується ступінь очистки 99%.

ДР 1.4. Надтонке очищення повітря

					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 10. ОПИС ТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ (ОТРИМАННЯ ЛЗ)	Літ.	Арк.	Аркушів
Розроб.		Мичкодан М. І.					103	135
Керівник		Стабніков В. П.						104
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.		Стабніков В. П.						

На четвертому етапі очищення повітря очищається до ступеню очищення 99,999 % за допомогою фільтру типу HEPA (Ф-7). Повітря береться на аналіз через пробовідбірний пристрій. Очищене вентиляційне повітря по трубопроводу направляється у приміщення класів чистоти D, C, B.

ДР 2. Отримання води для ін'єкцій.

ДР 2.1. Обробка в установці UV-знезараження.

Через відцентровий насос (Н-8) вода з міського водопроводу подається до системи UV-знезараження (УФ-9). Ультрафіолетове опромінення на довжині хвилі 254 нм, здійснюване системою УФ-С, руйнує органічні елементи на клітинному рівні. Ця потужність ультрафіолету перешкоджає росту та розвитку мікробів.

ДР 2.2. Очищення на грубому фільтрі.

Після проходження через систему UV-знезараження (УФ-9), вода подається на фільтр грубої очистки (ГФ-10). Цей етап призначений для видалення з води різних забруднень, таких як мул, пісок, окислене залізо та відкладення.

ДР 2.3. Пом'якшення води.

Вода, що пройшла фільтр грубої очистки (ГФ-10), направляється до установки для знежорсткування води (ВП-11). Ця система складається лише з двох частин: бака з йонообмінною смолою та контейнера для розчину солі. Балон (колона) виготовлений із надійного полімерного композитного матеріалу, стійкого до корозії. Усередині розташована йонообмінна смола Dowex®, виготовлена компанією DowChemical (США). Процес знежорсткування води відбувається за один етап. Очищена від механічних домішок вода поступає до корпусу фільтру, наповненого йонообмінною смолою. Під час проходження через цей шар смоли, йони, які викликають жорсткість, залишаються на смолі, тоді як очищена вода направляється до споживача через центральну трубу корпусу.

ДР 2.4. Очищення в ультрафільтраційній установці.

Після проходження через установку для знежорсткування води (ВП-11), вода направляється до ультрафільтраційної системи (УФУ-12). Ця система мембранної очистки води здатна відділяти частинки розміром до 0,01 мкм.

ДР 2.5. Очищення в системі зворотного осмосу.

Вода, після пройденої ультрафільтрації, подається до системи зворотного осмосу (ЗВО-13). У процесі зворотного осмосу забруднення та непотрібні молекули видаляються з води, коли тиск примушує її пройти через напівпроникну мембрану. У результаті розчинені речовини залишаються на одному боці мембрани, тоді як чистий розчин переходить на іншу сторону.

ДР 2.6. Електродеіонізація води.

Після проходження системи зворотного осмосу (ЗВО-13), вода направляється до наступного етапу очищення, а саме до системи електродеіонізації (СЕ-14). Електродеіонізація (EDI) застосовується для подальшого очищення демінералізованої води після зворотного осмосу з метою досягнення низьких рівнів електропровідності та діоксиду кремнію. На цьому етапі чистота води досягає 99,99999991%, а питомий опір складає 18 МОм·см. Після процесу електродеіонізації очищена вода подається до збірника (З-15) для подальшого очищення.

ДР 2.7. Дистиляція води.

Зі збірника для води очищеної (З-15) вода поступає до шестиколонного дистилятора (ШД-16) для здійснення власне процесу дистиляції.

ДР 3. Підготовка первинної упаковки

ДР 3.1. Підготовка скляних флаконів

ДР 3.1.1 Миття зовнішньої та внутрішньої поверхні

На складі у груповій упаковці отримують необхідну кількість первинної упаковки (флакони). Після зняття зовнішньої упаковки, флакони оглядають зовнішньо і відбраковують ті, що мають невідповідності (сколи, посічення, тріщини).

Зовнішню і внутрішню мийку флаконів проводять на автоматі мийки RRU 3040 флаконів (МСФ-17). Воду очищену (від ДР 2.6), що рухається по трубопроводу, подають до RRU 3040, де вода нагрівається до температури вище 70 °С та подається подають під тиском 0,1 МПа.

ДР 3.1.2 Стерилізація флаконів

Підготовлені флакони надходять в стерилізаційний тунель (МСФ-17), де відбувається їх стерилізація та депірогенізація за допомогою гарячого очищеного повітря при температурі 310 °С зі швидкістю руху конвеєрної стрічки не більше 100 мм/хв, що відповідає тривалості процесу не менше 2 хв.

ДР 3.1.3 Охолодження флаконів

Охолодження відбувається на виході зі стерилізаційного тунелю (МСФ-17). Флакони охолоджуються очищеним повітрям (від ДР 1.4), що рухається по трубопроводу, до температури 20-25 °С. Стерильні та охолоджені флакони по транспортеру надходять до ТП 5.2.

ДР 3.2 Підготовка гумових пробок

ДР 3.2.1 Перегляд пробок та їх відбракування

На складі у груповій упаковці отримують необхідну кількість гумових пробок. Після оброблення/зняття зовнішньої упаковки, пробки оглядають і відбраковують ті, що мають невідповідності (тріщини, деформацію).

ДР 3.2.2 Миття гумових пробок

Мийку пробок проводять вручну в гарячому 55 ± 5 °С розчині мийного засобу, після чого пробки промивають гарячою очищеною водою до повного змиття мийного розчину.

ДР 3.2.3 Стерилізація гумових пробок

Після миття пробки поміщають в пакети для стерилізації, вкладають їх у корзини та завантажують у автоклав. Пробки стерилізують за допомогою насиченої водяної пари, що рухається по трубопроводах при температурі 121 °С протягом 20 хвилин. Стерильні пробки передають до ТП 5.2.

ДР 3.3 Підготовка алюмінієвих ковпачків

ДР 3.3.1 Перегляд ковпачків та їх відбракування

На складі у груповій упаковці отримують необхідну кількість ковпачків. Після оброблення/зняття зовнішньої упаковки, ковпачки оглядають і відбраковують ті, що мають невідповідності (деформацію, вкраплення).

ДР 3.3.2 Миття ковпачків

Алюмінієві ковпачки вкладають у ємність, наповнюють розчином мийного засобу підігрітого до температури 75 ± 5 °C та витримують 15 хв. Після чого ковпачки промивають водою очищеною до повного змиття мийного розчину.

ДР 3.3.3 Стерилізація ковпачків

Чисті ковпачки розфасовують у пакети для стерилізації, які запаюють на ламінаторі. Підготовлені пакети з ковпачками завантажують до автоклаву та проводять їх стерилізацію за допомогою насиченої водяної пари, що рухається по трубопроводу, при температурі 121 °C протягом 20 хвилин. Стерильні ковпачки в пакетах для стерилізації передають до ТП 5.2.

ТП 4. Приготування розчину для інфузій.

ТП 4.1. Змішування компонентів препарату.

В реактор-змішувач (РЗ-19) поміщають воду для ін'єкцій (від ДР 2.7) та додають субстанцію емодину та натрію хлорид за допомогою дозатора (Д-18). Після цього проводиться перемішування до повного розчинення компонентів. Для прискорення цього процесу розчин підігрівають до температури 40-50 °C.

ТП 5. Фільтрація розчину та розлив у флакони.

ТП 5.1. Фільтрація розчину для інфузій.

Отриманий розчин, викладений на попередньому етапі, подається до установки для розливу у флакони BOSCH MLF 3002 (ФРІ-21) за допомогою насоса (Н-20). Спочатку розчин зберігається у баку-накопичувачі цього обладнання, а потім йде на лінію розливу. При вході до лінії розчин пройшов стерилізацію через фільтрацію, після чого потрапляє в систему розливу,

розташовану в чистій зоні, що відповідає асептичним умовам класу чистоти А для зони наповнення.

ТП 5.2. Розлив за закупорювання профільтованого розчину у флакони.

Після цього етапу (від ТП 5.1), розчин для інфузій постачається для наповнення флаконів (від ДР 3.1.3) об'ємом 250 мл за допомогою машини BOSCHMLF 3002 (ФРІ-21). Флакони спочатку закриваються гумовими затворами (від ДР 3.2.3) та далі герметизуються. Після цього стерильні ковпачки (від ДР 3.3.3) завантажуються до приймального бункеру автомата BOSCHMLF 3002 (ФРІ-21). Флакони з розчином переходять на ділянку обтиснення, де вони під ламінарним потоком отримують стерильні ковпачки та одночасно герметизуються.

ТП 6. Стерилізація.

ТП 6.1. Стерилізація розчину у первинному пакуванні.

Флакони з розчином для інфузій, що були отримані на попередньому етапі, розміщуються персоналом виробництва у спеціальних касетах, які потім передаються до автоклава Zirbus серії 10Н (АФ-22). У цьому автоклаві розчину флаконах проходить стерилізацію за температури 121°C протягом 15 хвилин. Після стерилізації флакони з розчином відправляються на наступний етап упаковки у вторинну упаковку.

ПМВ 7. Пакування та маркування флаконів.

ПМВ 7.1. Пакування та маркування флаконів у вторинну упаковку.

Флакони з розчином для інфузій, після проходження процедури стерилізації, подаються до картонажної машини (КМ-23), де проводиться упаковка цих флаконів у додаткову картонну упаковку. Кожен флакон укладається в окрему картонну коробку, а також на упаковці наноситься маркування, включаючи серійний номер і строк придатності. Якість та відповідність упаковки та маркування перевіряються під час виробництва шляхом нагляду працівниками.

РОЗДІЛ 11. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДГО АНД
(ПРОЕКТ АНД)
СПЕЦИФІКАЦІЯ

на Емодин розчин д/інф. 400 мг/250 мл по 250 мл у флак.

Таблиця 11.1

Найменування показника	Допустимі межі	Методи контролю [17]
<i>Опис</i>	Прозора світло-жовта рідина	За п.1 СП, візуально
<i>Ідентифікація</i>	На хроматограмі випробуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння, відповідні їм за розміром і забарвленням.	За п.2 СП, ДФУ 2.2.27
<i>Вміст одного флакону</i>	Не менше від заявленого об'єму	За п.3 СП
<i>pH</i>	Від 5,5 до 7,0	За п.4 СП, ДФУ 2.2.3
<i>Супровідні домішки</i>	Сума будь-яких додаткових домішок: не більше 4.0 %; Не враховують: пік бензилового спирту	За п.5 СП, ДФУ 2.2.29
<i>Стерильність</i>	Має витримувати випробування на стерильність	За п.6 СП, ДФУ 2.6.1
<i>Кількісне визначення</i>	Вміст емодину в 1 мл розчину має бути від 1,55 мг до 1,65 мг.	За п.7 СП, ДФУ 2.2.29
<i>Бактеріальні ендотоксини</i>	Менше 0.6 МО/мг емодину	За п.8 СП, ДФУ 2.6.14
<i>Механічні включення: невидимі частинки</i>	Середня кількість частинок у випробовуваних одиницях не перевищує 6000 в 1 контейнері для частинок розміром 10 мкм або більше і не перевищує 600 в 1 контейнері для частинок розміром 25 мкм або більше	За п.9 СП, ДФУ 2.9.19
<i>Упаковка</i>	У герметично закритих флаконах по 250 см ³ . По 1 флакону разом з інструкцією для застосування поміщають у пачку із картону для споживчої тари.	
<i>Маркування</i>	Згідно затвердженого тексту маркування	
<i>Термін придатності</i>	3 роки	
<i>Умови зберігання</i>	Сухе темне місце при температурі від +5 до +25°C.	

					НУХТ БТЕК 02.02.09 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Мичкодан М. І.				РОЗДІЛ 11. ОПИС ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ЗГІДГО АНД (ПРОЕКТ АНД)	Літ.	Арк.	Аркушів
Керівник	Стабніков В. П.						109	110 135
Реценз.						Кафедра БТМ		
Н. Контр.								
Затверд.	Стабніков В. П.							

1. Опис. Прозора світло-жовта рідина.

2. Ідентифікація.

А. Тонкошарова хроматографія.

Випробовуваний розчин. Об'єм розчину для інфузій розводять метанолом Р до одержання розчину з концентрацією 5 мг/мл емодину.

Розчин порівняння. Готують розчин ФСЗ емодину у воді Р з концентрацією 5 мг/мл емодину.

Тонкий шар: силікагель GF₂₅₄Р.

Рухома фаза: аміаку розчин концентрований Р – толуол Р – метанол Р (1.5:30:70).

Об'єм проб: 10 мкл.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 3/4 довжини пластинки.

Висушування: на повітрі.

Виявлення: обприскують калію йодовісмутату розчином розведеним Р.

Результати: на хроматограмі випробуваного розчину має виявлятися основна пляма на рівні основної плями на хроматограмі розчину порівняння, відповідні їм за розміром і забарвленням.

3. Вміст одного флакону.

Відбирають 30 флаконів.

Струшують вміст кожного з 10 флаконів, обережно, щоб уникнути утворення повітряних бульбашок, виливають вміст кожного флакону в окремі сухі мірні, калібровані циліндри, місткість яких не більше ніж в 2,5 рази більше вимірюваного об'єму. Вмісту кожного флакону дають стікати протягом не більше 30 хв для недозованих препаратів. Після зникнення повітряних бульбашок вимірюють об'єм рідини в кожному циліндрі.

Лікарський препарат вважається таким, що витримує випробування, якщо середнє значення об'єму вмісту 10 флаконів не менше 100% (250 мл), і жоден з флаконів не повинен мати об'єм менш 95% (237,5 мл) від зазначеного на етикетці.

Якщо середнє значення об'єму вмісту 10 флаконів менше 100% (250 мл) від зазначеного на етикетці, але жоден з флаконів не має об'єм менше 95% (237,5 мл) або середнє значення об'єму вмісту 10 флаконів становить 100% (250 мл) і обсяг не більше ніж одного флакону менше 95% (237,5 мл), але не менше 90% (225 мл) від зазначеного на етикетці, то виконують випробування на 20 додаткових флаконах.

Середнє значення об'єму вмісту 30 флаконів повинна становити не менше 100% (250 мл) від об'єму, зазначеного на етикетці, і об'єм не більше ніж одного з 30 флаконів може бути менше 95% (237,5 мл), але не менше 90% (225 мл) від зазначеного на етикетці.

4. pH. pH — число, яке умовно характеризує концентрацію іонів водню у водних розчинах. На практиці pH визначають експериментально. pH випробовуваного розчину пов'язане з pH стандартного розчину (pH_S) таким рівнянням:

$$pH = pH_S - \frac{E - E_S}{k},$$

де:

E - потенціал електрода у випробовуваному розчині, у вольтах;

E_S - потенціал того ж електрода в розчині з відомим pH (pH_S), у вольтах;

k - температурний коефіцієнт, щодорівнює зміні потенціалу при зміні значення pH на одиницю, виражений у вольтах, який розраховують за рівнянням Нернста.

Значення k при різних температурах

Температура (°C)	k (V)
15	0.0572
20	0.0582
25	0.0592
30	0.0601
35	0.0611

Потенціометричне визначення рН проводять шляхом вимірювання різниці потенціалів між двома відповідними електродами, зануреними у випробовуваний розчин: один з електродів чутливий до іонів водню (звичайно скляний електрод), другий - електрод порівняння (наприклад, насичений каломельний електрод).

Методика. Усі вимірювання проводять при тій самій температурі в інтервалі від 20 °С до 25 °С, якщо немає інших зазначень в монографії. Якщо необхідно, враховують температурні поправки відповідно до інструкції виробника. Прилад калібрують за допомогою буферного розчину калію гідрофталату (первинний стандарт) і одного з буферних розчинів з іншим значенням рН. Показання приладу для третього буферного розчину з проміжним значенням рН не мають відрізнятися більше як на 0.05 одиниць рН від табличного значення рН цього розчину. Електроди занурюють у випробовуваний розчин і вимірюють рН у тих самих умовах, що і для буферних розчинів.

Якщо прилад використовують часто, його калібрування проводять регулярно. У протилежному разі калібрування приладу має проводитися перед кожним вимірюванням.

Усі випробовувані розчини і стандартні буферні розчини мають бути приготовані на воді, вільній від вуглецю діоксиду, Р.

5. Супровідні домішки (рідинна хроматографія).

Випробовуваний розчин. Об'єм розчину для інфузій розводять рухомою фазою до одержання розчину з концентрацією 3 мг/мл емодину.

Розчин порівняння. Готують розчин, що містить ФЗС лінкоміцину гідрохлориду, ФЗС емодину і бензиловий спирт Р, у рухомій фазі з концентрацією 0,12 мг/мл лінкоміцину гідрохлориду, 0,24 мг/мл емодину і бензинового спирту (0,0015 %, об./об.).

Інжекції: 20 мкл.

Порядок виходу піків на хроматограмі розчину порівняння: лінкоміцину гідрохлорид, емодин і бензиловий спирт.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння:

- ступінь розділення: не менше 7,7 між піками лінкоміцину гідрохлориду та емодину.

Розраховують вміст супровідних домішок методом внутрішньої нормалізації на хроматограмі випробуваного розчину.

Нормування:

- Сума будь-яких додаткових домішок: не більше 8.0 %;
- Не враховують: пік бензилового спирту.

6. Стерильність.

Випробування методом мембранної фільтрації. Використовують мембранні фільтри з номінальним розміром пор не більше 0.45 мкм, здатні ефективно затримувати мікроорганізми. Для водних, розведених спиртових розчинів та розчинів в оліях використовують, наприклад, целюлозно-нітратні мембранні фільтри, а для концентрованих спиртових розчинів — целюлозно-ацетатні мембранні фільтри. Якщо необхідно, для деяких лікарських засобів, наприклад для антибіотиків, можуть бути використані спеціальні мембранні фільтри.

Використовують мембранні фільтри діаметром близько 50 мм. При використанні мембранних фільтрів іншого діаметра об'єм розчинника та промивної рідини змінюють відповідним чином. Фільтраційну установку та мембранні фільтри стерилізують підходящим способом. Конструкція фільтраційної установки має забезпечувати асептичні умови при внесенні та фільтрації лікарського засобу, а також при видаленні мембранного фільтра для переносу його у живильне середовище або має дозволяти проводити інкубацію посівів безпосередньо у самій установці після додавання в неї живильного середовища.

Перед початком випробування рекомендується пропустити крізь мембранний фільтр невелику кількість підходящого стерильного розчинника, наприклад нейтрального розчину 1 г/л м'ясного або казеїнового пептону із

значенням рН $7,1 \pm 0,2$. Розчинник може містити відповідні нейтралізатори та/або відповідні інактиватори, наприклад, при випробуванні антибіотиків.

Вміст контейнера(ів) із випробуванним зразком переносять на мембранний фільтр або мембранні фільтри. Якщо необхідно, попередньо доводять об'єм зразка відповідним стерильним розчинником до того самого об'єму, що і при перевірці придатності методики. Відразу фільтрують. Якщо лікарський засіб має антимікробну активність в умовах випробування, мембранний фільтр відмивають не менше трьох разів, пропускаючи крізь нього при кожному відмиванні той самий об'єм обраного стерильного розчинника, що і при перевірці придатності методики. Загальний об'єм промивної рідини не має перевищувати п'яти порцій по 100 мл на один мембранний фільтр, навіть у тому разі, коли при перевірці придатності методики встановлено, що такий режим відмивання мембранних фільтрів не дозволяє повністю усунути антимікробну активність лікарського засобу. Після відмивання мембранний фільтр переносять у живильне середовище або розрізають його, дотримуючись правил асептики, на дві рівні частини, кожную з яких поміщають у відповідне живильне середовище. Використовують ті самі кількості живильного середовища, що і при перевірці придатності методики. При використанні установки закритого типу живильне середовище вносять безпосередньо в установку. Посіви інкубують не менше 14 діб.

7. Кількісне визначення.

Рідинна хроматографія.

Випробуваний розчин. Точно виміряний об'єм розчину для інфузій розводять рухомою фазою до одержання розчину з концентрацією 0,15 мг/мл емодину.

Розчин порівняння (а). Готують розчин ФЗС емодину у рухомій фазі з концентрацією 0,18 мг/мл емодину.

Розчин порівняння (b). Готують розчин, що містить ФЗС лінкоміцину гідрохлориду, ФЗС емодину і бензиловий спирт Р, у рухомій фазі

з концентрацією 0,12 мг/мл лінкоміцинугідрохлориду, 0,24 мг/мл емодину і бензилового спирту (0,0015 %, об./об.).

Колонка:

—розмір: 0.20 м x 4.6 мм;

— нерухома фаза: силікагель для хроматографії, октилсилільний Р (10 мкм).

Рухома фаза: ацетонітрил Р1 - розчин 13.6 г/л калію дигідрофосфату Р, рН якого доведено до 2.5 фосфорною кислотою Р, (25:75).

Швидкість рухомої фази: 1.0 мл/хв.

Детектування: спектрофотометрично за довжини хвилі 210 нм.

Інжекції: 20 мкл.

Час хроматографування: у 3 рази більше часу утримування емодину.

Порядок виходу піків на хроматограмі розчину порівняння (b): лінкоміцинугідрохлорид, емодину і бензиловий спирт.

Придатність хроматографічної системи: розчин порівняння:

- ступінь розділення: не менше 7,7 між піками лінкоміцинугідрохлориду та емодину.

8. Бактеріальні ендотоксини.

Випробування на бактеріальні ендотоксини (БЕТ - бактеріальні ендотоксини, тест) з використанням лізату амебоцитів мечохвоста (*Limuluspolyphemus* або *Tachypleustridentatus*) призначене для виявлення або кількісного визначення ендотоксинів, джерелом яких є грамнегативні бактерії. Існують три основні методологічні підходи проведення даного випробування: гель-тромб метод, заснований на утворенні гелю; турбідиметричний метод, заснований на появі каламутності після розщеплення ендогенного субстрату; хромогенний метод, заснований на появі забарвлення після розщеплення синтетичного пептид-хромогенного комплексу.

Випробування проводять будь-яким із шести наведених методів. При сумнівах або розбіжностях остаточний висновок ухвалюють на підставі

результатів, одержаних при проведенні випробування методом А, якщо немає інших зазначень в окремій статті.

Випробування проводять за методикою, що дозволяє уникнути забруднення ендотоксинами.

9.Механічні включення: невидимі частинки.

Випробування необхідно здійснювати в умовах, що обмежують попадання механічних включень, найкраще в зоні ламінарного потоку повітря.

Дуже ретельно промивають використовуваний скляний посуд і фільтраційне обладнання, крім мембранних фільтрів, теплим розчином миючого засобу з подальшим обполіскуванням необхідною кількістю води для видалення слідів миючого засобу, безпосередньо перед випробуванням обполіскують обладнання від верху до низу, зовні і потім всередині собою, вільною від частинок, Р.

Необхідно виключити виникнення бульбашок повітря у випробовуваному зразку, особливо під час перенесення проби до посудини, в якій буде проводитися вимірювання.

Для того, щоб переконатися у відповідності умов проведення випробування необхідним вимогам і належній якості очищення скляного посуду і води, необхідно виконати таке випробування. Визначають наявність механічних включень у п'яти пробах води, вільної від частинок, Р (кожна по 5 мл) згідно з методикою, описаною нижче. Якщо у 25 мл об'єднаної проби кількість частинок розміром 10 мкм або більше перевищує 25, прийняті запобіжні заходи для проведення випробувань недостатні. Повторюють підготовчі стадії, доки обладнання, скляний посуд і вода не стануть придатними для проведення випробування.

Методика. Перемішують вміст зразка, повільно та безперервно перевертаючи контейнер 20 разів. Якщо необхідно обережно видаляють упаковку. Зовнішні поверхні контейнера, що розкривають, очищають струменем води, вільної від частинок, Р і розкривають контейнер, уникаючи

внесення будь-якого забруднення. Для видалення бульбашок повітря використовують підходящу процедуру, наприклад відстоюють розчин протягом 2 хв або обробляють ультразвуком.

Для лікарських засобів для парентерального застосування великих об'ємів випробовують окремі дозовані одиниці. Для лікарських засобів для парентерального застосування малих об'ємів менше 25 мл об'єднують 10 або більше дозованих одиниць у чистому контейнері для одержання об'єму не менше 25 мл; в обґрунтованих і дозованих випадках випробовуваний розчин може бути приготований за допомогою змішування вмісту підходящої кількості флаконів і розведення до об'єму 25 мл водою, вільною від частинок, Р, або підходящим розчинником, вільним від механічних частинок, якщо вода, вільна від частинок, Р непридатна. Випробування лікарських засобів для парентерального застосування малих об'ємів із вмістом 25 мл або більше можуть бути проведені індивідуально.

Кількість випробовуваних зразків має бути достатньою для забезпечення статистично обґрунтованої оцінки. Для лікарських засобів для парентерального застосування великих об'ємів або малих об'ємів і вмістом 25 мл або більше можуть бути випробувані менше 10 дозованих одиниць із використанням підходящого плану відбору проб.

Препарат витримує випробування, якщо середня кількість частинок у випробовуваних одиницях не перевищує 6000 в 1 контейнері для частинок розміром 10 мкм або більше і не перевищує 600 в 1 контейнері для частинок розміром 25 мкм або більше.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Kavanagh K. Fungal fermentations systems and products In: Kavanagh K, editor. *Fungi: biology and applications*. 2011; 125–146.
2. Ng T.B., Cheung R.C.F., Wong J.H., Bekhit A.A., Bekhit A.E. Antibacterial products of marine organisms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99(10):4145–4173.
3. Bills G.F., Stadler M. Editorial comment – discovery, distribution and biosynthesis of fungal secondary metabolites. *Mycology*. 2014; 5(3):99–101.
4. Craney A., Ahmed S., Nodwell J. Towards a new science of secondary metabolism. *J Antibiot*. 2013; 66(7):387–400.
5. Wang W., Liao Y., Tang C., et al. Cytotoxic and antibacterial compounds from the coral-derived fungus *Aspergillus tritici* SP2-8-1. *Mar Drugs*. 2017; 15(11):348.
6. Xu W., Li G., Huang X., Luo Z. Fungal diversity study in the deep sea sediments of three oceans by culture-dependent approach. *J Appl Oceanogr*. 2015; 34:103–110.
7. CLSI 2012. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, approved standard. seventh ed. 950 West Valley Road (Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA): CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute.
8. Valgas C., deSouza S.M., Smânia E.F.A., Zhou X.F., Qin X.C., Kaliyaperumal K., Zhang T.Y., Tu Z.C., Liu Y. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz J Microbiol*. 2007; 38(2):369–380.
9. Soothill J.S., Ward R., Girling A.J. The IC₅₀: an exactly defined measure of antibiotic sensitivity. *J Antimicrob Chemother*. 2002; 29(2):137–139.
10. Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016; 6(2):71–79.
11. Mehta A., Bodh U., Gupta R. Fungal lipases: a review. *J Biotechnol Res*. 2017; 8:58–77

12. Wang Y., Xue Y., Liu C. A brief review of bioactive metabolites derived from deep-sea fungi. *Mar Drugs*. 2015; 13(8):4594–4616.
13. Liu M., Zhou Q., Wang J., Liu J., et al. Anti-inflammatory butenolide derivatives from the coral-derived fungus *Aspergillus terreus* and structure revisions of aspernolides D and G, butyrolactone VI and 4',8"-diacetoxy butyrolactone VI. *RSC Adv*. 2018; 8:13040–13047.
14. Li D.H., Han T., Guan L.P., Bai J., et al. New naphthopyrones from marinederived fungus *Aspergillus niger* 2HL-M-8 and their *in vitro* antiproliferative activity. *Nat prod Res*. 2016; 30(10):1116–1122.
15. Liu S., Dai H., Konuklugil B., Orfali R.S., et al. Phenolic bisabolanes from the sponge-derived fungus *Aspergillus* sp. *Phytochem Lett*. 2017; 18:187–191.
16. Ma J., Zhang X.L., Wang Y., Zheng J.Y., et al. Aspergivones A and B, two new flavones isolated from a gorgonian-derived *Aspergillus candidus* fungus. *Nat Prod Res*. 2017; 31(1):32–36.
17. Ratnaweera P.B., Williams D.E., de Silva E.D., Andersen R.J. Antibacterial metabolites from the Sri Lankan demosponge-derived fungus, *Aspergillus flavipes*. *Curr Sci*. 2016; 111(9):1473–1479.
18. Sugie Y., Hirai H., Inagaki T., et al. A new antibiotic CJ-17,665 from *Aspergillus ochraceus*. *J Antibiot*. 2001; 54(11):911–916.
19. Furtado N.A.J.C., Said S., Ito I.Y., Bastos J.K. The antimicrobial activity of *Aspergillus fumigatus* is enhanced by a pool of bacteria. *Microbiol Res*. 2002;157(3):207–211.
20. Song Y.C., Li H., Ye Y.H., Shan C.Y., Yang Y.M., Tan R.X. Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 241(1):67–72.
21. Li Y., Song Y.C., Liu J.Y., Ma Y.M., Tan R.X. Anti-*Helicobacter pylori* substances from endophytic fungal cultures. *World J Microbiol Biotechnol*. 2005; 21(4):553–558.

22. Flewelling A.J., Bishop A.I., Johnson J.A., Gray C.A. Polyketides from an endophytic *Aspergillus fumigatus* isolate inhibit the growth of *Mycobacterium tuberculosis* and MRSA. *Nat Prod Commun.* 2015; 10(10):1661.
23. Ibrahim S.R.M., Elkhayat E.S., Mohamed G.A., et al. Aspernolides F and G, new butyrolactones from the endophytic fungus *Aspergillus terreus*. *Phytochem Lett.* 2015; 14:84–90.
24. Nguyen H.T., Yu N.H., Jeon S.J., Lee H.W., et al. Antibacterial activities of penicillic acid isolated from *Aspergillus persii* against various plant pathogenic bacteria. *Lett Appl Microbiol.* 2016; 62(6):488–493.
25. Ismaiel A.A., Rabie G.H., Abd El-Aal M.A. Antimicrobial and morphogenic effects of emodin produced by *Aspergillus awamori* WAIR120. *Biologia.* 2016; 71(5):464–474.
26. Yahaya S., Idris B., Yusuf I., Rabiun M.K. Screening and identification of antibacterial agents produced by *Aspergillus* species from the soil of Bayero University Kano. *Bayero J Pure Appl Sci.* 2017; 10(1):498–502.
27. Phainuphong P., Rukachaisirikul V., Tadpetch K., Sukpondma Y., et al. γ -Butenolide and furanone derivatives from the soil-derived fungus *Aspergillus sclerotiorum* PSU-RSPG178. *Phytochemistry.* 2017; 137:165–173.
28. Monggoot S., Pichaitam T., Tanapichatsakul C., Pripdeevech P. Antibacterial potential of secondary metabolites produced by *Aspergillus* sp., an endophyte of *Mitrephora wangii*. *Arch Microbiol.* 2018; 200(6):951–959.
29. Yang S.Q., Li X.M., Xu G.M., Li X., An C.Y., Wang B.G. Antibacterial anthraquinone derivatives isolated from a mangrove-derived endophytic fungus *Aspergillus nidulans* by ethanol stress strategy. *J Antibiot.* 2018; 71(9):778–784.
30. Guo Z.Y., Tan M.H., Liu C.X., Lv M.M., et al. Aspergoterpenins A-D: four new antimicrobial bisabolane sesquiterpenoid derivatives from an endophytic fungus *Aspergillus versicolor*. *Molecules.* 2018; 23(6):1291.

31. Silva E.M.S., Da Silva I.R., Ogusku M.M., Carvalho C.M., et al. Metabolites from endophytic *Aspergillus fumigatus* and their *in vitro* effect against the causal agent of tuberculosis. *Acta Amaz.* 2018; 48(1):63–69.
32. Ruma K., Sunil K., Prakash H.S. Antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and cytotoxic properties of fungal endophytes from *Garcinia* species. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2013; 5(Suppl.3):889–897.
33. Al-Shaibani A.B.A., Al-Shakarchi F.I., Ameen R.S. Extraction and characterization of antibacterial compound from *Aspergillus niger*. *J Al-Nahrain Univ/Sci.* 2013; 16(4):167–174.
34. Sadrati N., Daoud H., Zerroug A., Dahamna S., Bouharati S. Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum*). *J Plant Prot Res.* 2013; 53(2):128–136.
35. Kalyanasundaram I., Nagamuthu J., Muthukumaraswamy S. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated and identified from salt marsh plant in Vellar Estuary. *J Microbiol Antimicrob.* 2015; 7(2):13–20.
36. Ratnaweera P.B., de Silva E.D., Williams D.E., Andersen R.J. Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii* and the isolation of equisetin, from endophytic *Fusarium* sp. *BMC Complement Altern Med.* 2015; 15:220.
34. Padhi S., Das D., Panja S., Tayung K. Molecular characterization and antimicrobial activity of an endolichenic fungus, *Aspergillus* sp. isolated from *Parmelia caperata* of Similipal Biosphere Reserve, India. *Interdiscip Sci Comput Life Sci.* 2017; 9(2):237–246.
38. Ogbole O.O., Adebayo-Tayo B.C., Salawu K.M., Okoli V.C. Molecular identification and antimicrobial activity of endophytic fungi *Aspergillus tamarii* (trichomaceae). *Nig J Pharm Sci.* 2017; 16(1):41–48.
39. Hassan S.A.A., Bakhiet S.E.A. Optimization of antibacterial compounds production by *Aspergillus fumigatus* isolated from Sudanese indigenous soil. *Int Biol Biomed J.* 2017; 3(4):203–208.

40. Akinyemi A. Antimicrobial activities of secondary metabolites from fungal endophytes. *IOSR J Pharm Biol Sci.* 2017; 12(6):13–17.
41. Mishra V.K., Passari A.K., Chandra P., et al. Determination and production of antimicrobial compounds by *Aspergillus clavatonanicus* strain MJ31, an endophytic fungus from *Mirabilis jalapa* L. using UPLC-ESI-MS/MS and TD-GC-MS analysis. *PLoS One.* 2017; 12(10):e0186234.
42. Kalyani P., Hemalatha K.P.J. *In vitro* antimicrobial potential of *Aspergillus niger* (MTCC-961). *Int J Chemtech Res.* 2017; 10(4):430–435.
43. Synytsya A., Monkai J., Bleha R., Macurkova A., Ruml T., Ahn J., Chukeatirote E. Antimicrobial activity of crude extracts prepared from fungal mycelia. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2017; 7(3):257–261.
44. Rani R., Sharma D., Chaturvedi M., Yadav J.P. Antibacterial activity of twenty different endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* and time kill assay. *Clin Microbiol.* 2017; 6(3):280.
45. Amina B., Sana G., Atef J., Laid D., Noreddine K.C. Antibacterial activity of *Aspergillus* isolated from different Algerian ecosystems. *Afr J Biotechnol.* 2017; 16(32):1699–1704.
46. Thorati M., Mishra J.K. Antibacterial activity of crude extract from *Aspergillus niger* isolated from the stilt roots of *Rhizophora apiculata* along South Andaman coast, India. *J Pharmacogn Phytochem.* 2017; 6(5):1635–1638.
47. Prabavathy D., Nachiyar C.V. Study on the antimicrobial activity of *Aspergillus* sp. isolated from *Justicia adathoda*. *Indian J Sci Technol.* 2012; 5(9):3317–3320.
48. Pinheiro E.A., Carvalho J.M., et al. Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus *Aspergillus* sp. EJC08 isolated from medical plant *Bauhinia guianensis*. *Nat Prod Res.* 2013; 27(18):1633–1638.
49. Xiao J., Zhang Q., Gao Y.Q., Shi X.W., Gao J.M. Antifungal and antibacterial metabolites from an endophytic *Aspergillus* sp. associated with *Melia azedarach*. *Nat Prod Res.* 2014; 28(17):1388–1392.

50. Ola A.R.B., Debbab A., Aly A.H., et al. Absolute configuration and antibiotic activity of neosartorin from the endophytic fungus *Aspergillus fumigatiaffinis*. *Tetrahedron Lett.* 2014; 55(5):1020–1023.
51. Zhang H., Liu R., Zhou F., Wang R., Liu X., Zhang H. Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus* sp. of *Eucommia ulmoides*. *Chem Nat Compd.* 2014; 50(3):526–528.
52. Zhang W., Wei W., Shi J., Chen C., Zhao G., Jiao R., Tan R. Natural phenolic metabolites from endophytic *Aspergillus* sp. IFB-YXS with antimicrobial activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015; 25(13):2698–2701.
53. Cha T.L., Chuang M.J., Tang S.H., et al. Emodin modulates epigenetic modifications and suppresses bladder carcinoma cell growth. *Mol Carcinogen.* 2015; 54: 167–177.
54. Li W.Y., Ng Y.F., Zhang H., et al. Emodin elicits cytotoxicity in human lung adenocarcinoma A549 cells through inducing apoptosis. *Inflammopharmacology.* 2014; 22: 127–134.
55. Li W.Y., Chan R.Y., Yu P.H., Chan S.W. Emodin induces cytotoxic effect in human breast carcinoma MCF-7 cell through modulating the expression of apoptosis-related genes. *Pharm Biol.* 2013; 51: 1175–1181.
56. Kim J., Lee J.S., Jung J., et al. Emodin suppresses maintenance of stemness by augmenting proteosomal degradation of epidermal growth factor receptor/epidermal growth factor receptor variant III in glioma stem cells. *Stem Cells Dev.* 2014; 24: 284–295.
57. Wang Y.X., Yu H., Zhang Y.Y., et al. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer hela cells via intrinsic mitochondrial and extrinsic death receptor pathway. *Cancer Cell Int.* 2013; 13: 71.
58. Subramaniam A., Loo S.Y., Rajendran P., et al. An anthraquinone derivative, emodin sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL induced apoptosis through the induction of death receptors and downregulation of cell survival proteins. *Apoptosis.* 2013; 18: 1175–1187.

59. Xie M.J., Ma Y.H., Miao L., *et al.* Emodin-provoked oxidative stress induces apoptosis in human colon cancer HCT116 cells through a p53-mitochondrial apoptotic pathway. *Asian Pac J Cancer P.* 2014; 15: 5201–5205.
60. Pooja T., Karunagaran D. Emodin suppresses Wnt signaling in human colorectal cancer cells SW480 and SW620. *Eur J Pharmacol.* 2014; 742: 55–64.
61. Jia X., Yu F., Wang J., *et al.* Emodin suppresses pulmonary metastasis of breast cancer accompanied with decreased macrophage recruitment and M2 polarization in the lungs. *Breast Cancer Res Tr.* 2014; 148: 291–302.
62. Way T.D., Huang J.T., Chou C.H., *et al.* Emodin represses TWIST1-induced epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma cells through the inhibition of β -catenin and Akt pathways. *Eur J Cancer.* 2014; 50: 366–378.
63. Zhang X., Chen Y., Zhang T., Zhang Y.. Inhibitory effect of emodin on human hepatoma cell line SMMC-7721 and its mechanism. *Afr Health Sci.* 2015; 15: 97–100.
64. Huang L., Wang X.B.Y.Q.M., *et al.* Synergistic cancer growth-inhibitory effect of emodin and low-dose cisplatin on gastric cancer cells *in vitro* . *Trop J Pharm Res.* 2015; 14: 1427–1434.
65. Chen P., Liu Y., Sun Y., *et al.* AZT and emodin exhibit synergistic growth-inhibitory effects on K562/ADM cells by inducing S phase cell cycle arrest and suppressing MDR1 mRNA/p-gp protein expression. *Pharm Biol.* 2013; 51: 1586–1591.
66. Chen G.L., Zhang J.J., Kao X., *et al.* Emodin ameliorates lipopolysaccharides-induced corneal inflammation in rats. *Int J Ophthalmol.* 2015; 8: 665–669.
67. Yao W.Y., Zhou Y.F., Qian A.H., *et al.* Emodin has a protective effect in cases of severe acute pancreatitis via inhibition of nuclear factor- κ B activation resulting in antioxidation. *Mol Med Rep.* 2015; 11: 1416–1420.

68. Wang T., Zhong X.G., Li Y.H., *et al.* Protective effect of emodin against airway inflammation in the ovalbumin-induced mouse model. *Chin J Integr Med.* 2015; 21: 431–437.
69. Schwarz S., Wang K., Yu W., *et al.* Emodin inhibits current through SARS-associated coronavirus 3a protein. *Antivir Res.* 2011; 90: 64–69.
70. Liu Z., Wei F., Chen L.J., *et al.* *In vitro* and *in vivo* studies of the inhibitory effects of emodin isolated from *Polygonum cuspidatum* on Cocksakievirus B4. *Molecules.* 2013; 18: 11842–11858.
71. Dey D., Ray R., Hazra B. Antitubercular and antibacterial activity of quinonoid natural products against multi-drug resistant clinical isolates. *Phytother Res.* 2014; 28: 1014–1021.
72. Cao F., Peng W., Li X., *et al.* Emodin is identified as the active component of ether extracts from *Rhizoma Polygoni Cuspidati*, for anti-MRSA activity. *Can J Physiol Pharm.* 2015; 93: 1–9.
73. Xu J.S., Cui Y., Liao X.M., *et al.* Effect of emodin on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans* and the development of caries in rats. *Exp Ther Med.* 2014; 8: 1308–1312.
74. Lu Y., Yang J.H., Li X., *et al.* Emodin, a naturally occurring anthraquinone derivative, suppresses IgE-mediated anaphylactic reaction and mast cell activation. *Biochem Pharmacol.* 2011; 82: 1700–1708.
75. Kim D.Y., Kang T.B., Shim D.W., *et al.* Emodin attenuates A23187-induced mast cell degranulation and tumor necrosis factor- α secretion through protein kinase C and I κ B kinase 2 signaling. *Eur J Pharmacol.* 2014; 723: 501–506.
76. Wang W., Zhou Q., Liu L., Zou K. Anti-allergic activity of emodin on IgE-mediated activation in RBL-2H3 cells. *Pharmacol Rep.* 2012; 64: 1216–1222.
77. Xue J., Ding W., Liu Y. Anti-diabetic effects of emodin involved in the activation of PPAR γ on high-fat diet-fed and low dose of streptozotocin-induced diabetic mice. *Fitoterapia.* 2010; 81: 173–177.

78. Zhang X., Zhang R., Lv P., *et al.* Emodin up-regulates glucose metabolism, decreases lipolysis, and attenuates inflammation *in vitro*. *J Diabetes*. 2015; 7: 360–368.
79. Chen Z., Zhang L., Yi J., *et al.* Promotion of adiponectin multimerization by emodin: a novel AMPK activator with PPAR γ -agonist activity. *J Cell Biochem*. 2012; 113: 3547–3558.
80. Gao J., Tao J., Zhang N., *et al.* Formula optimization of the Jiashitang scar removal ointment and antiinflammatory compounds screening by NF- κ B bioactivity-guided dual-luciferase reporter assay system. *Phytother Res*. 2015; 29: 241–50.
81. Chen T., Zheng L.Y., Xiao W., *et al.* Emodin ameliorates high glucose induced-podocyte epithelial-mesenchymal transition *in-vitro* and *in-viv*. *Cell Physiol Biochem*. 2015; 35: 1425–1436.
82. Liu Y., Chen X., Qiu M., *et al.* Emodin ameliorates ethanol-induced fatty liver injury in mice. *Pharmacology*. 2014; 94: 71–77.
83. Xue J., Chen F., Wang J., *et al.* Emodin protects against concanavalin a-induced hepatitis in mice through inhibiting activation of the p38 MAPK-NF- κ B signaling pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2015; 35: 1557–1570.
84. Guo H., Shen X., Xu Y., *et al.* Emodin prevents hypoxic-ischemic neuronal injury: involvement of the activin A pathway. *NRR*. 2013; 8: 1360–1367.
85. Yang T., Kong B., Kuang Y., *et al.* Emodin plays an interventional role in epileptic rats via multidrug resistance gene 1 (MDR1). *Int J Clin and Exp Path*. 2015; 8: 3418–3425.
86. Park S.J., Jin M.L., An H.K., *et al.* Emodin induces neurite outgrowth through PI3K/Akt/GSK-3 β -mediated signaling pathways in Neuro2a cells. *Neurosci Lett*. 2015; 588: 101–107.
87. Di X., Wang X., Liu Y. Effect of piperine on the bioavailability and pharmacokinetics of emodin in rats. *J Pharmaceut Biomed*. 2015; 115: 144–149.

88. Huang P.H., Huang C.Y., Chen M.C., *et al.* Emodin and aloe-emodin suppress breast cancer cell proliferation through ER α inhibition. *Evid-Based Compl Alt.* 2013; 376123.
89. Yang Z., Zhou E., Wei D., *et al.* Emodin inhibits LPS-induced inflammatory response by activating PPAR- γ in mouse mammary epithelial cells. *Int Immunopharmacol.* 2014; 21: 354–360.
90. Ho T.Y., Wu S.L., Chen J.C., *et al.* Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antivir Res.* 2007; 74: 92–101.
91. Dang S.S., Jia X.L., Song P., *et al.* Inhibitory effect of emodin and *Astragalus* polysaccharide on the replication of HBV. *World J Gastroentero.* 2009; 15: 5669–5673.
92. Chen J., Zhang L., Zhang Y., *et al.* Emodin targets the β -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase from *Helicobacter pylori*: enzymatic inhibition assay with crystal structural and thermodynamic characterization. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 91.
93. Yin X., Gong X., Jiang R., *et al.* Emodin ameliorated lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure by blockade of TLR4/MD2 complex expression in d-galactosamine-sensitized mice. *Int Immunopharmacol.* 2014.23: 66–72.
94. Lee B.H., Huang Y.Y., Duh P.D., Wu S.C. Hepatoprotection of emodin and *Polygonum multiflorum* against CCl₄-induced liver injury. *Pharm Biol.* 2012; 50: 351–359.
95. Qian Z.J., Zhang C., Li Y.X., *et al.* Protective effects of emodin and chrysophanol isolated from marine fungus *Aspergillus* sp. on ethanol-induced toxicity in HepG2/CYP2E1 cells. *Evid-Based Compl Alt.* 2011: 45261.
96. Ботьот Ю.К., Боть Т.А., Аліфанова С.В., Калічевська М.В. Інфекція *Staphylococcus aureus* у дітей: діагностика та лікування в умовах поширення антибіотикорезистентності. *Здоров'я дитини.* 2022; 17 (3): 144–154.

97. Kluytmans J., van Belkum A., Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(3):505-20.
98. von Eiff C., Becker K., Machka K., Stammer H., Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Study Group. N Engl J Med.* 2001;344(1):11-6.
99. vanBelkumA., VerkaikN.J., deVogelC.P., BoelensH.A., VerveerJ., NouwenJ.L., VerbrughH.A., WertheimH.F. Reclassification of *Staphylococcus aureus* nasal carriage types. *J Infect Dis.* 2009;199(12):1820-6.
100. Chen C.J., Hsu K.H., Lin T.Y., Hwang K.P., Chen P.Y., Huang Y.C. Factors associated with nasal colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among healthy children in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 2011;49(1):131-7.
101. Foster T.J., Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 1998;6(12):484-8.
102. O'Riordan K., Lee J.C. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17(1):218-34.
103. Otto M. Phenol-soluble modulins. *Int J Med Microbiol.* 2014;304(2):164-9.
104. Sendi P., Rohrbach M., Graber P., Frei R., Ochsner P.E., Zimmerli W. *Staphylococcus aureus* small colony variants in prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis.* 2006; 43(8):961-7.
105. Krishna S., Miller L.S. Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. *Semin Immunopathol.* 2012; 34(2):261-80.
106. Tuchscher L., Heitmann V., Hussain M., Viemann D., Roth J., et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J Infect Dis.* 2010; 202(7):1031-40.
107. Tuchscher L, Kreis CA, Hoerr V, Flint L, et al. *Staphylococcus aureus* develops increased resistance to antibiotics by forming dynamic small colony variants during chronic osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71(2):438-48.

108. Aalfs A.S., Otkarina D.A., Diercks G.F., Jonkman M.F., Pas H.H. Staphylococcal scalded skin syndrome: loss of desmoglein 1 in patient skin. *Eur J Dermatol.* 2010;20(4):451-6.
109. Rasigade J.P., Thomas D., Perpoint T., Peyramond D., et al. T-cell response to superantigen restimulation during menstrual toxic shock syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011; 62(3):368-71.
110. Wisplinghoff H., Seifert H., Tallent S.M., et al. Nosocomial bloodstream infections in pediatric patients in United States hospitals: epidemiology, clinical features and susceptibilities. *Pediatr Infect Dis J.* 2013; 22(8):686-91.
111. David M.Z., Daum R.S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23(3):616-87.
112. Al-Zubeidi D., Hogan P.G., Boyle M., Burnham C.A., Fritz S.A. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in serial cultures from the respiratory tract of children with cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2014; 33(6):549-53.
113. Stockmann C., Ampofo K., Pavia A.T., Byington C.L., Blaschke A.J., et al. National trends in the incidence, outcomes and charges of pediatric osteoarticular infections, 1997-2012. *Pediatr Infect Dis J.* 2015; 34(6):672-4.
114. Bradley J.S., Benziger D., Bokesch P., Jacobs R. Single-dose pharmacokinetics of daptomycin in pediatric patients 3-24 months of age. *Pediatr Infect Dis J.* 2014; 33(9):936-939.
115. Bereznjakov I.G. The state of antibiotic resistance in Ukraine: results of the AURA study. Part 1. Zdorov'ja Ukrai'ny. *Ortopedija, Travmatologija, Intensyvna terapija.* 2020; (42):32-34. (in Ukrainian)
116. Salmanov A.G., Usenko A.Y. Antibiotic resistance of nosocomial strains of *Staphylococcus aureus* in surgical stationaries of Ukraine: results of multicenter investigation (2015-2016). *Klinicheskaia Khirurgiia.* 2018; 85(5):5-9.

117. Kotsar O.V. Prevalence of meticilin-resistant extramural staphylococcus aureus (ca-mrsa) and coagulase negative staphylococci (MRCNS) in purulent inflammatory infections. *Dermatology and venereology*. 2014; (63):22-29.
118. Kocar O.V., Golubka O.V., Masalova A.V., Antusheva T.O., Riabushich O.V. The prevalence of meticillin-resistant staphylococcus among the bacillicarriers. *Experimental and Clinical Medicine*. 2016; (73):23-26.
119. Cherry J., Demmler-Harrison G.J., Kaplan S.L., Steinbach W.J., Hotez P.J. Feigin and Cherry's textbook of pediatric infectious diseases. 8th ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2019. 3152 p.
120. Yagupsky P. Review highlights the latest research in *Kingella kingae* and stresses that molecular tests are required for diagnosis. *Acta Paediatr*. 2021; 110(6):1750-1758.
121. Ratnayake K., Davis A.J., Brown L., Young T.P. Pediatric acute osteomyelitis in the postvaccine, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* era. *Am J Emerg Med*. 2015; 33(10):1420-1424.
122. McNeil J.C., Forbes A.R., Vallejo J.G., et al. Role of operative or interventional radiology-guided cultures for osteomyelitis. *Pediatrics*. 2016; 137(5):e20154616.
123. Dey D., Ray R., Hazra B. Antitubercular and antibacterial activity of quinonoid natural products against multi-drug resistant clinical isolates. *Phytother Res*. 2014; 28: 1014–1021.
124. Cao F., Peng W., Li X., et al. Emodin is identified as the active component of ether extracts from *Rhizoma Polygoni Cuspidati*, for anti-MRSA activity. *Can J Physiol Pharm*. 2015; 93: 1–9.
125. Xu J.S., Cui Y., Liao X.M., et al. Effect of emodin on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans* and the development of caries in rats. *Exp Ther Med*. 2014; 8: 1308–1312.
126. Di X., Wang X., Liu Y. Effect of piperine on the bioavailability and pharmacokinetics of emodin in rats. *J Pharmaceut Biomed*. 2015; 115: 144–149.

127. Dong X., Fu J., Yin X., Cao S., Li X. et al. Emodin: A Review of its Pharmacology, Toxicity and Pharmacokinetics. *PhytotherRes.* 2016; 30(8):1207-18.
128. Державний реєстр лікарських засобів України [Електронний ресурс]. Режим доступу: <http://www.drlz.com.ua>
129. Natural Emodin Rhubarb /Radixet Rhizoma Rhei Extract Emodin CAS 518-82-1 with Good Price [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://hblikes.en.made-in-china.com/product/snoYyJmPYzhv/China-Natural-Emodin-Rhubarb-Radixet-Rhizoma-Rhei-Extract-Emodin -with-Good-Price.html>
130. Pharmacy Grade GMP Certified 99% CAS 9067-32-7 Emodin & CAS 67-45-8 518-82-1 1415-73-2 18956-16-6 Best Price [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://quanjinci.en.made-in-china.com/product/eEGYTrpxzHcn/China-Pharmacy-Grade-GMP-Certified-Emodin-CAS-67-45-8-518-82-1-1415-73-2-18956-16-6-Best-Price.html>
131. Emodin [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.sigmaaldrich.com/UA/en/substance/emodin27024518821>
132. Best Price Rheum Emodin Powder 98% 99% HPLC Rhubarb Root Extract [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://nutriherb.en.made-in-china.com/product/jQqUtYFOgxVa/China-Best-Price-Rheum-Emodin-Powder-Rhubarb-Root-Extract.html>
133. Manufacturer Supply High Quality CAS 518-82-1 Emodin [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://tongyon.en.made-in-china.com/product/ZxkrFgOVrmWB/China-Manufacturer-Supply-High-Quality-CAS-518-82-1-Emodin.html>
134. Alexander K. Dosage Forms and Their Routes of Administration. *Pharmacology.* 2009; 9–29. doi:10.1016/b978-0-12-369521-5.00002-6
135. А12С Е Препарати селену [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://compendium.com.ua/uk/atc/a12ce/>

136. Hu H., Song X., Li Y., Gao L. Emodin protects knee joint cartilage in rats through anti-matrix degradation pathway: An *in vitro* and *in vivo* study. *Life Sci.* 2021; 269.
137. Dong X., Fu J., Yin X., Cao S., et al. Emodin: A Review of its Pharmacology, Toxicity and Pharmacokinetics. *Phytother Res.* 2016;30(8):1207-18.
138. Xu J.S., Cui Y., Liao X.M., et al. Effect of emodin on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans* and the development of caries in rats. *Exp Ther Med.* 2014; 8: 1308–1312.
139. Qiu X., Gong L., Xin X., An F. Enhancement of Emodin Production by Medium Optimization and KH_2PO_4 Supplementation in Submerged Fermentation of Marine-Derived *Aspergillus favipes* HN4-13. *Mar. Drugs.* 2021; 19: 421.
140. Ismaiel A.A., Rabie G.H. & Abd El-Aal M.A. Antimicrobial and morphogenic effects of emodin produced by *Aspergillus awamori* WAIR120. *Biologia.* 2016; 71: 464–474.
141. Li X., & Ping L. The Influence of Short Chain Fatty Acids on Biosynthesis of Emodin by *Aspergillus ochraceus* LP-316. *Frontier and Future Development of Information Technology in Medicine and Education.* 2013; 2331–2336.
142. Моксифлоксацин-Віста розчин д/інф. 400 мг/250 мл по 250 мл у флак. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://tabletki.ua/uk/Моксифлоксацин-Виста/10945/#Спосіб_застосування_та_دوزи
143. Захворюваність населення [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.ukrstat.gov.ua>
144. Розподіл захворювань дітей віком 0-17 років за класами хвороб [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/2018/zb/06/zb_zoz_17.pdf

145. Синдром токсичного шоку: симптоми та діагностика [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://itmed.org/articles/syndrom-toksychnogo-shoku-symptomy-ta-diagnostyka/>

146. Методичні вказівки до практичних занять дисципліни «Гідромеханічні та тепло-масообмінні процеси хімічних технологій» для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня спеціальності 161 «Хімічні технології та інженерія» / Укл. Волошин М.Д.. – Кам'янське: ДДТУ, 2018 р. – 24 с. Укр. мовою.

147. Розділення неоднорідних систем [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://kc.pnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/11/2021/02/Processes-and-apparatus-of-chemical-productionLecture6.pdf>

148. Друк-фільтри: принцип роботи, будова, технічні особливості [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://tirit.org/articles/druk_filters.php

149. What is a filter press and how does it work. Micronics, Engineered Filtration Group, 2021. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.micronicsinc.com/filtration-news/filter-press-information/>

150. Рамні фільтр-преси. ГК «Ансер», 2021. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://anserghm.ru/services/filtr-pressy/filtr-pressy-ramnye/>

151. Plate and Frame Filter Press [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pharmacygyan.com/plate-and-frame-filter-press/>

152. Конспект лекцій з курсу „Процеси та апарати хімічної технології”, розділ «Мембранні процеси» для студентів II-V курсів усіх спеціальностей / Укл.: О.О. Тертишний, О.В. Тертишна. – Дніпропетровськ: ДВНЗ УДХТУ, 2011. – 79 с.

153. Характеристики катіоніту КУ-02. «Система Оптимум», товари для лабораторії та виробництва, 2021. [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://www.systopt.com.ua/item-kationit-ku-02>

154. Іонообмінна хроматографія, 2021. [Електронний ресурс]. Режим доступу: https://biology.univ.kiev.ua/images/stories/Kafedry/biofiziki/Library/ion-chrom_lek3.pdf

155. Данилов І. П. Апарати мікробіологічної промисловості [Текст]: навч. посібник І. П. Данилов, С. І Самійленко.-Харків : НТУ «ХП», 2008. – 272.
156. Карлаш Ю.В. Основи проектування біотехнологічних виробництв. [Електронний ресурс]: конспект лекцій для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітньо-професійної програми «Біотехнологія» денної та заочної форм навчання /Ю.В. Карлаш, Є.О. Омельчук - К: НУХТ, 2019. – 252 с.
157. Виділення та очищення продуктів біотехнології. Методичний посібник/авт.: Д.А. Новіков - Мінськ.: БДУ, 2014. - 256 с.
158. Ismaiel A. A., Rabie G. H., &Abd El-Aal M. A. Antimicrobial and morphogenic effects of emodin produced by *Aspergillus awamori* WAIR120.*Biologia*.2016; 71(5): 464-474.
159. Panichayupakaranant P., Sakunpak A. &Sakunphueak A. Quantitative HPLC determination and extraction of anthraquinones in *Senna alata* leaves. *J. Chromatogr. Sci.* 2009; 47: 197–200.
160. ОФС.1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар [Електронний ресурс]. Режим доступу: <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-4-0010-15-opredelenie-antimikrobnj-aktivnosti-antibiotikov-metodom-diffuzii-v-agar/>
161. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020 Лікарські засоби. Належна виробнича практика.
- 162.Виробництвостерильноїпродукції [Електронний ресурс] - Режим доступу:<https://buklib.net/books/36219/>
163. Лич І.В. Промисловатехнологіялікарськихзасобів [Електронний ресурс]: конспект лекцій для студ. освітньогоступеня бакалавр спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» ден. та заоч. форм навч. / І.В. Лич. – К.: НУХТ, 2017. – 323 с.
164. Вода для ін'єкцій [Електронний ресурс] - Режим доступу: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/1784/voda-dlya-in-yekcij>

165. Ditec [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.tecninox.it/en/product/ditec>
166. Boschvialwashingandsterilizingline, with RRU 3040 washingmachineand HQL 2240 sterilisingtunnel [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.hauser-maschinen.de/en/confectionery-food/washers-bottle-blowers-sterilisers/bosch-vial-washing-and-sterilizing-line-with-rru-3040-washing-machine-and-hql-2240-sterilising-tunnel>
167. Processingtank [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.tecninox.it/en/product/processing-tank>
168. AsepticFillingandClosingMachines BOSCH MLF 3002 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://intimac.it/en/used-machines/aseptic-filling-and-closing-machines/aseptic-filling-and-closing-machines-bosch-mlf-3002-/>
169. ProductionAutoclavesforthelaboratory, pharmaceutical, foodindustryandanimalhusbandry[Электронный ресурс]. Режим доступа:<https://www.zirbus.com/autoclaves/productions-units/>
170. Horizontal Cartoner SC 5 (up to 200 cartons/min.) [Электронный ресурс]. Режим доступа:<https://iwk.de/en/products-solutions/machinery/horizontal-cartoner-sc-5-up-to-200-cartons-min/>