

УДК 615.324:638.135:615.014.2

**ДОСЛІДЖЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ
АКТИВНОСТІ, ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ
ТА МІСЦЕВОПОДРАЗНЮВАЛЬНОЇ ДІЇ
ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ
«ПРОПОЛІС-ДЕРМА»**

*ТИХОНОВ О.І., ШПИЧАК О.С., ФРОЛОВА О.Є. *,
ГУДЗЕНКО О.П. **

Національний фармацевтичний університет, м. Харків
*Державний Заклад «Луганський державний медичний
університет» МОЗ України, м. Рубіжне

АНОТАЦІЯ

Представлений матеріал у статті, присвячений дослідженню гострої токсичності, протизапальної і місцевоподразнювальної дії фармацевтичної композиції «Прополіс–Дерма» («Прополіс–ПНГ», «Прополіс–ПСХ» та «Прополіс–ПХД») з протигрибковою, протимікробною та кератолітичною активністю, створеної для лікування та профілактики дерматомікозів, різнобарвного лишая, а також захворювань, спричинених дріжджеподібними грибами роду *Candida*.

Гостру токсичність фармацевтичних композицій під умовною назвою «Прополіс–Дерма» («Прополіс–ПНГ», «Прополіс–ПСХ», «Прополіс–ПХД») вивчали при нашкірному нанесенні досліджуваних засобів. Досліди проведено на мишах, шляхом нанесення на шкіру максимальної дози VI класу токсичності – 22,6 мл/кг.

Встановлено, що токсикологічні параметри, фармацевтичної композиції «Прополіс–Дерма» при нашкірному нанесенні мишам відносяться до VI класу токсичності «Відносно нешкідливі речовини» та не чинять місцевоподразнювальної дії на шкіру кролів.

Під час досліджень на моделі гострого термічного запалення встановлено виразні протизапальні властивості фарма-

цвітничної композиції «Прополіс-Дерма» співставлену з препаратом порівняння «Пантенол».

Результати експерименту дають змогу розмістити тестові зразки препарату за виразністю протизапальної дії наступним чином: «Прополіс-ПХД» – 61%, «Прополіс-ПХС» – 30%; «Прополіс-ПНГ» – 21%.

Ключові слова: гостра токсичність, протизапальна активність, фармацевтичні композиції, «Прополіс-Дерма», «Прополіс-ПНГ», «Прополіс-ПХС», «Прополіс-ПХД».

ВСТУП

Грибкові ураження шкіри є однією з найбільш актуальних і до кінця не вирішеною проблемою дерматології та сучасної медицини. В цілому серед захворювань інфекційних патологій, що характеризується частотою виникнення дерматомікозів, оніхомікозів та кандидомікозів, головною причиною яких є інфікування спорами грибкових бактерій роду *Microsporum*, *Trichophyton* або *Candida albicans* у осіб зі зниженою резистентністю організму при певних хворобах та пошкодженнях придатків шкіри або слизових оболонок внутрішніх органів та ін. [13].

До факторів які спричиняють розвиток цієї інфекції слід віднести набутий імунodefіцит (ВІЛ-інфекція, прийом глюкокортикоїдів, цитостатиків, імунодепресантів), несприятливий екологічний фон, злоякісні новоутворення, цукровий діабет, туберкульоз, хронічний стрес та інші фактори, що призводять до виснаження захисних сил організму та розвитку супутніх патологічних процесів [5,6].

Слід зазначити, що останнім часом під час діагностики дерматомікозів спостерігається тенденція до виявлення відразу декількох видів патогенних мікроорганізмів, що дає підставу розглядати цей факт як мікс-інфекцію даних захворювань.

Тому сучасний високоефективний системний антимікотик повинен бути з широким спектром протигрибкової активності та мінімальним ризиком розвитку побічних ефектів, враховуючи термін лікування даної патології [1,2].

Арсенал лікарських препаратів протигрибкової дії на фармацевтичному ринку України в основному представлений препаратами синтетичного походження [7].

Необхідно зазначити, що є актуальність створення нових лікарських засобів на основі субстанцій природного походження.

Тому, Нами було розроблено склад та запропоновано для впровадження у медичну практику нову фармацевтичну композицію під умовною назвою «Прополіс–Дерма» («Прополіс–ПНГ», «Прополіс–ПСХ» та «Прополіс–ПХД») з протигрибковою, протимікробною і кератолітичною активністю, які створені для лікування дерматомікозів, різнобарвного лишая, а також захворювань, спричинених дріжджеподібними грибами роду *Candida* [8,9,10,11].

А результати проведених мікробіологічних досліджень свідчать, що досліджувані тест-зразки препаратів «Прополіс–ПНГ», «Прополіс–ПСХ», «Прополіс–ПХД» мають виражені антагоністичні властивості по відношенню до грампозитивних бактерій (*S. aureus*, *B. subtilis*), вибірково антибактеріальну здатність – до *E. coli*, та виражену антифунгальну дію відносно штамів грибів роду *Candida albicans*, що відповідає вимогам Державної фармакопеї України і можуть бути використані для терапії мікозів різної етіології в умовах високої резистентності грибків до традиційних протигрибкових лікарських засобів.

Експериментальна частина

Доклінічні дослідження гострої токсичності фармацевтичної композиції під умовною назвою «Прополіс-Дерма» («Прополіс-ПНГ», «Прополіс-ПСХ», «Прополіс-ПХД») вивчали при нашкірному нанесенні досліджуваних засобів. Тестові разки препаратів наносили на шкіру у максимальній дозі VI класу токсичності – 22,6 мл/кг.

За тваринами спостерігали протягом 2 тижнів, що дає можливість оцінити токсичну дію речовин на організм експериментальних тварин, як безпосередньо після нанесення, так й визначити віддалені наслідки передозування. Оцінювали зага-

льний стан тварин (зовнішній вигляд, дихання, слиновиділення, процеси сечовивипускання та дефекації). Досліджували динаміку маси тіла. По закінченні терміну спостереження проводили макроскопічний огляд внутрішніх органів тварин [3,4].

Результати досліджень свідчать, що при нашкірному нанесенні у дозі 22,6 мл/кг ознак інтоксикації у піддослідних тварин не спостерігалось. Летальні випадки були відсутні (табл. 1).

Таблиця 1 – Летальність мишей при одноразовому нанесенні досліджуваних речовин на шкіру, n=6

Групи тварин	Доза, мл/кг	Шлях нанесення	Кількість загиблих тварин/загальна кількість тварин
негативний контроль	–	–	0/6
«Прополіс-ПНГ»	22,6	нашкірний	0/6
«Прополіс-ПСХ»			0/6
«Прополіс-ПХД»			0/6

Примітка. n – кількість тварин у кожній групі.

Результати визначення динаміки маси тіла тварин наведені в таблиці 2. Спостереження за тваринами свідчать, що в усіх дослідних групах, яким вводили або наносили тестові зразки, спостерігався позитивний приріст маси тіла.

По закінченні терміну спостереження, на 15 добу проводили розтин тварин. Макроскопічні дослідження при розтині тварин показали, що однократне введення досліджуваного зразка у надмірній дозі не викликало видимих патологічних змін органів.

Отже, одержані результати показали, що нашкірне нанесення досліджуваних тестових зразків не призводить до загибелі тварин та не чинить макроскопічно видимих патологічних змін внутрішніх органів. Відповідно до класифікації речовин за токсичністю фармацевтичні композиції під умовною

назвою «Прополіс-Дерма» відносяться до VI класу токсичності – відносно нешкідливі речовини (табл. 3).

Таблиця 2 – Вплив ТЗ на динаміку маси тіла (г) мишей самок при нашкірному нанесенні, n=6 ($M \pm m$)

Групи тварин	Термін спостереження, доба			
	Вихідні дані	3 доба	7 доба	14 доба
негативний контроль	23,62±2,44	24,69±1,96	25,23±1,85	25,76±1,83
«Прополіс-ПХС»	19,96±2,49	20,19±2,21	20,31±2,09	20,42±1,96
«Прополіс-ПХД»	21,11±1,87	20,97±1,69	20,89±1,63	20,82±1,59
«Прополіс-ПНГ»	20,66±1,55	21,24±1,04	21,53±0,81	22,19±0,63

Примітка. n – кількість тварин у кожній групі.

Таблиця 3 – Ступінь токсичності фармацевтичної композиції «Прополіс-Дерма»

Групи тварин	Шлях введення	Вид/стать тварин	ЛД ₅₀ , мл/кг	Клас токсичності
«Прополіс-ПХС»	нашкірний	миші/самки	>22,6	Відносно нешкідливі речовини
«Прополіс-ПХД»				
«Прополіс-ПНГ»				

Дослідження гострої подразнювальної дії фармацевтичних композицій під умовною назвою «Прополіс-Дерма» проводили шляхом одноразового нанесення на шкіру кролів тестових зразків дозою 0,5 г на тварину і фіксували на шкірі за допомогою марлевої серветки в 12 шарів, яку закріплювали за допомогою хірургічної стрічки. Інтактну ділянку шкіри покривали хірургічною серветкою. Період експозиції становив 24 год. Загалом було використано 6 тварин. Для встановлення подра-

знювальної дії тест-зразка у кожної тварини було використано 4 ділянки шкіри (з вистриженою шерстю за 24 години до початку експерименту, без жодних патологічних ознак) площею 6 см² кожна:

- 1 – інтактна ділянка (інтактний контроль);
- 2 – ділянка на яку наносили тест-зразок «Прополіс-ПХС»;
- 3 – ділянка, на яку наносили тест-зразок «Прополіс-ПХД»;
- 4 – ділянка, на яку наносили тест-зразок «Прополіс-ПНГ».

Кожна тварина виступала як власний контроль. Після завершення періоду експозиції шкіру тварин звільняли від серветки, промивали водою. Реєстрацію можливої подразнювальної дії проводили тричі: через 1 годину після зняття марлевої серветки з досліджуваними тест-зразками (25 годин після початку експозиції, "1"), через 48 ("2") та 72 годин ("3") після початку експозиції. Для кожної тварини визначали наявність еритеми, струпу, набряку та проводили оцінку шкірної реакції в балах за шкалою. Загальний ступінь подразнення (ЗСП) для кожної тварини розраховували за сумою балів ("1"+"2"+"3"+"4"). Потім розраховували індекс прямого подразнення шкіри (ПП) за формулою:

$$\text{ПП} = \text{ЗСП} / 3 \times n,$$

де:

З – кількість спостережень,

n – кількість тварин.

Остаточний ступінь подразнювальної дії ТЗ оцінювали за величиною ПП наступним чином:

0,0	–	подразнювальна дія відсутня
0,0 – 0,5	–	подразнення, яким можна знехтувати
0,5 – 2,0	–	помірне подразнення
2,0 – 5,0	–	середнє подразнення
5,0 – 8,0	–	сильне подразнення

Дослідження можливої подразнювальної дії фармацевтичних композицій під умовною назвою «Прополіс-Дерма», проводили шляхом нанесення повторних аплікацій на шкіру кролів, всього було використано 6 тварин [3,4]. Для встановлення подразнювальної дії тест-зразків у кожній тва-

рини було використано 4 ділянки шкіри (з вистриженою шерстю за 24 години до початку експерименту, без жодних патологічних ознак) розміром 2,5 x 2,5 см кожна:

- 1 – інтактна ділянка (інтактний контроль);
- 2 – ділянка на яку наносили тест-зразок «Прополіс-ПХС»;
- 3 – ділянка, на яку наносили тест-зразок «Прополіс-ПХД»;
- 4 – ділянка, на яку наносили тест-зразок «Прополіс-ПНГ».

Кожна тварина виступала як власний контроль. Тест-зразки наносили в дозі 0,5 мл на тварину. Ділянки нанесення та інтактну ділянку покривали хірургічною серветкою в 2 шари, яку закріплювали за допомогою медичної стрічки. Період експозиції становив 4 години на добу, після чого серветку знімали. Аплікації здійснювали щодня протягом 21 доби. Оцінку подразнювальної дії ТЗ проводили вищеописаним методом.

Результати дослідження місцевоподразнювальної дії фармацевтичних композицій під умовною назвою «Прополіс-Дерма» при одноразовому нанесенні на шкіру кролів, свідчать, що 24-годинна експозиція фармацевтичних композицій під умовною назвою «Прополіс-Дерма» в дозі 0,5 мл на тварину на ділянку шкіри кролів не призводить до жодних проявів місцевоподразнювальної дії: еритематозних змін, набряку, ознак некрозу (табл. 4).

Таблиця 4 – Шкірна реакція кролів на 24-годинну експозицію фармацевтичних композицій під умовною назвою «Прополіс-Дерма», бали

Група	Термін дослідження, год						ПП
	Еритема			Набряк			
	25	48	72	25	48	72	
Інтактний контроль	0	0	0	0	0	0	0
«Прополіс-ПХС»	0	0	0	0	0	0	0
«Прополіс-ПХД»	0	0	0	0	0	0	0
«Прополіс-ПНГ»	0	0	0	0	0	0	0

Таким чином, результати проведеного дослідження свідчать про відсутність у фармацевтичних композицій під умовною назвою «Прополіс-Дерма» місцевоподразнювальної дії при одноразовому нанесенні [4,12].

Дослідження місцевоподразнювальної дії фармацевтичних композицій під умовною назвою «Прополіс-Дерма» проводили за допомогою повторних аплікацій, з метою прогнозування кумулятивного подразнення, яке може проявитися при тривалому застосуванні ТЗ.

Фармацевтичні композиції під умовною назвою «Прополіс-Дерма» наносили в дозі 0,5 мл на ділянку шкіри кролів розміром 2,5 x 2,5 см щодня впродовж 21 доби. Стан шкіри оцінювали щодня. Результати наведені у таблиці 5.

Таблиця 5 – Шкірна реакція кролів на експозицію фармацевтичних композицій під умовною назвою «Прополіс-Дерма» при повторних аплікаціях, бали

Групи тварин	Термін дослідження								ІПП
	Еритема				Набряк				
	24 год.	7 доба	14 доба	21 доба	24 год.	7 доба	14 доба	21 доба	
Інтактний контроль	0	0	0	0	0	0	0	0	0
«Прополіс-ПХС»	0	0	0	0	0	0	0	0	0
«Прополіс-ПХД»	0	0	0	0	0	0	0	0	0
«Прополіс-ПНГ»	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Як і в попередньому дослідженні прояви місцевоподразнювальної дії ТЗ протягом всього експерименту були відсутні, що свідчить про відсутність у фармацевтичних композицій під умовною назвою «Прополіс-Дерма» кумулятивної подразнювальної дії (табл. 5).

Таким чином, за результатами проведеного дослідження фармацевтичні композиції під умовною назвою «Прополіс-

Дерма» як в умовах одноразової тривалої експозиції, так і при повторних аплікаціях не чинять місцевоподразнювальної дії [3,4].

Дослідження протизапальної дії фармацевтичних композицій під умовною назвою «Прополіс-Дерма» проводили на моделі гострого термічного запалення у мишей.

Для визначення протизапальної активності фармацевтичних композицій під умовною назвою «Прополіс-Дерма» застосовували зручну та легко відтворювальну модель гострого термічного пошкодження лапи у мишей. Досліди проведені на 35 мишах самцях, масою 18-22 г. Гостре термічне запалення викликали зануренням лапи тварини у гарячу воду (температура 66,5⁰С) на 4 сек. Досліджувані ТЗ наносили на пошкоджену лапу одразу після опіку у дозі 0,2 мл/тварину. Дозу ТЗ підбирали емпіричним шляхом таким чином, щоб забезпечити оптимальне зрошення лапи тварини після опіку. Через 3 години нанесення ТЗ повторювали. На другу добу тварин виводили з експерименту передозуванням інгаляційного наркозу. На рівні гомілковостопного суглоба відрізали обидві лапи, зважували їх на електронних вагах. Для кожної тварини окремо підраховували різницю між масами пошкодженої і непошкодженої лап (D).

Як препарат порівняння використовували відомий засіб «Пантенол», виробництва ПАТ «Фармаком» (м. Харків), який застосовували у аналогічному режимі.

Протизапальну активність досліджуваних засобів розраховували за формулою (1):

$$ПЗА = \frac{D_d - D_k}{D_k} \times 100\% \quad (1),$$

де: D_д– різниця між масами пошкодженої і непошкодженої лап у дослідній групі;

D_к– різниця між масами пошкодженої і непошкодженої лап у контрольній групі.

Для статистичного аналізу отриманих результатів використовували методи варіаційної статистики. Дані представляли у вигляді середнього та мінімального та максимального значень

(M (min; max)). Відмінності між групами вважали статистично значущим при $p < 0,05$ [12].

Під час експерименту тварини знаходилися у віварії при $t^{\circ} 18-24^{\circ}C$, вологості 50-60 %, природному світловому режимі “день-ніч”, у пластикових клітках, на збалансованому харчовому раціоні відповідно до діючих норм. Дослідження проведені з дотриманням правил “Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей” (Страсбург, 1986 р) [3,4].

Відповідно до отриманих даних через 24 години після моделювання гострого термічного запалення маса лапи дослідних мишей збільшувалася у середньому на 45 мг, що свідчило про розвиток виразного набряку лапи (табл. 6).

Таблиця 6 – Результати визначення протизапальної активності фармацевтичної композиції «Прополіс-Дерма» на моделі гострого термічного запалення у мишей, $n=7$

Група тварин	Різниця між лапами, мг	ПЗА, %
Позитивний контроль	44,8 (35; 68)	–
«Прополіс-ПХС»	31,3 (20; 45)* /#	30,1 (-0,37; 55,4) #
«Прополіс-ПХД»	17,5 (11; 29)*	61 (35,3; 75,5)
«Прополіс-ПНГ»	33,3 (24; 45)#	21,2 (-0,37; 46,5) # α
«Пантенол»	24,7 (14; 36)*	45 (19,7; 68,8)

Примітки:

1* – відмінності статистично значущі при порівнянні з групою позитивного контролю, $p < 0,05$ (критерій Манна-Уїтні);

1# – відмінності статистично значущі при порівнянні з групою тварин, яким наносили ТЗ «Прополіс-ПХД», $p < 0,05$ (критерій Манна-Уїтні);

1. α – відмінності статистично значущі при порівнянні з групою тварин, яким наносили ПП «Пантенол», $p < 0,05$ (критерій Манна-Уїтні);

2. n – кількість тварин у кожній групі

Дворазове нанесення фармацевтичних композицій під умовною назвою «Прополіс-Дерма» – «Прополіс-ПХС» і

«Прополіс-ПХД» сприяло зниженню маси лапи мишей у 1,4 та 2,6 разу відповідно (табл.6). під дією ПП «Пантенолу» маса лапи мишей була нижчою ніж у групі ПК у 1,8 разу (табл. 6). Тест-зразок «Прополіс-ПНГ» чинив менш виразну протизапальну дію – маса лапи мишей була меншою ніж у групі ПК у 1,3 разу, але ці відмінності не були статистично значущими.

Отже, на моделі гострого термічного запалення у мишей фармацевтичні композиції під умовною назвою «Прополіс-Дерма» чинять протизапальну дію. За виразністю досліджуваних ТЗ можна розташувати таким чином: «Прополіс-ПХД» – 61%, «Прополіс-ПХС» – 30%; «Прополіс-ПНГ» – 21% [12].

Найбільшу ефективність виявляє ТЗ «Прополіс-ПХД», який за виразністю дії перевершує ТЗ «Прополіс-ПХС» та «Прополіс-ПНГ». У цілому протизапальна активність ТЗ, окрім ТЗ «Прополіс-ПНГ» співставлена з такою відомого засобу протизапальної та протиопікової дії – препарату «Пантенол».

ВИСНОВКИ

1. Визначення деяких токсикологічних параметрів показало, що фармацевтичні композиції під умовною назвою «Прополіс-Дерма» – «Прополіс-ПХС», «Прополіс-ПХД» та «Прополіс-ПНГ», при нашкірному нанесенні відносяться до VI класу токсичності «Відносно нешкідливі речовини», не чинять місцевоподразнювальної дії на шкіру кролів.
2. На моделі гострого термічного запалення встановлено виразні протизапальні властивості фармацевтичних композицій під умовною назвою «Прополіс-Дерма» співставлені з препаратом порівняння «Пантенол». За виразністю дії досліджуваних ТЗ можна розташувати таким чином: «Прополіс-ПХД» – 61%, «Прополіс-ПХС» – 30%; «Прополіс-ПНГ» – 21%.
3. Отримані результати підтверджують актуальність розробки фармацевтичної композиції «Прополіс-Дерма» та впровадження фармацевтичних засобів в медичну практику.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Белоусова Т.А., Горячкина М.В. Микозы стоп: рациональный выбор терапии // Русский медицинский журнал (Дерматология). – 2011. – Том 19, № 11. – 688-692.
2. Girardi M., Heald P.W., Wilson L.D. The Pathogenesis of Mycosis Fungoides // N Engl J Med. – 2004. – Vol. 6;350 (19). – P. 1978–1988.
3. Доклінічне вивчення місцевопідразнювальної дії лікарських засобів (методичні рекомендації). Київ, - 2007. – 57 с.
4. Методичні рекомендації «Експериментальне вивчення нових препаратів для місцевого лікування ран» / Л.В. Яковлева, Щ.В. Ткачова, Я.О. Бутко, Ю.Б. Лар'яновська.– Харків: вид-во НФаУ, 2013. – 52 с.
5. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции: Руководство для врачей / Москва: Издательство «Бином», 2008 – 480 с.
6. Trautinger F., Knobler R., Willemze R., Peris K., Stadler R., Laroche L., D'Incan M., Ranki A., Pimpinelli N., Ortiz-Romero P., Dummer R., Estrach T., Whittaker S. EORTC consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides / Sézary syndrome // European Journal of Cancer. – 2006. – Vol. 42, Issue 8. – P. 1014–1030.
7. Тихонов О.І., Фролова О.Є., Гудзенко О.П., Барнатович С.В. Маркетингові дослідження ринку протигрибкових лікарських засобів для місцевого застосування // Соціальна фармація в охороні здоров'я. – 2016. – Том 2, № 2. – С. 77-81.
8. Tikhonov O.I., Frolova O.E., Shpychak O.S. Creation of pharmaceutical compositions with the antifungal, antimicrobial and keratolytic activity // Clinical Pharmacy. – 2016. – Vol. 20, № 3. – P. 54-59.
9. Пат. на корисну модель № 115974 Україна, МПК51 А61К 35/644 (2015.01), А61К 31/14 (2006.01), А61Р 31/10 (2006.01). Фармацевтична композиція з протигрибковою, протимікробною і кератолітичною активністю / Тихонов О.І., Фролова О.Є., Новіков С.М., Ленчін В.М., Шпичак

- О.С.; заявник і патентовласник Тихонов О. І. – № и 201607579; заявл. 11.07.2016; опубл. 10.05.2017. – Бюл. № 9. – 7 с.
10. Фролова О.Є., Гудзенко О.П., Тихонов О.І., Шпичак О.С. Дослідження протигрибкової, протимікробної і кератолітичної дії фармацевтичних композицій «Прополіс-Дерма» // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2016. – Том 11, № 3. – С. 77-80.
 11. Frolova O.Ye., Tikhonov O.I., Shpychak O.S., Novikov S.M., Lenchin V.M. Development of the technology of vials-pencils for storage and application of medicated products on the skin and its appendages // The Pharma Innovation Journal. – 2016. – № 5(10). – P. 43-48.
 12. Халафян А.А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных. 3-е изд. Учебник. – М.: ООО «Бином-Пресс», 2007.– 512 с.
 13. Хэбиф Т.П. Кожные болезни: Диагностика и лечение / Томас П. Хэбиф ; Пер. с англ. ; Под общ. ред. акад. РАМН, проф. А.А. Кубановой. – 3-е изд. – М. : МЕДпресс-информ, 2008. – 672 с.