ВИВЧЕННЯ ТОКСИКОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ГЕЛІВ КЛОТРИМАЗОЛУ, КЕТОКОНАЗОЛУ ТА БІФОНАЗОЛУ

Л.В.Яковлєва, Н.С.Чорна, Н.П.Половко

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: протигрибкові препарати; токсикологічні властивості; гостра токсичність

Одним із основних етапів впровадження лікарських засобів є визначення їх токсичності, в тому числі відповідно до вимог Державного фармакологічного центру МОЗ України показників гострої токсичності. Тому метою роботи було визначення показників гострої токсичності гелів з клотримазолом, кетоконазолом та біфоназолом. У результаті досліджень визначено, що LD_{50} дослідних гелів лежить поза межами IV класу токсичності (LD_{50}>2810 мг/кг), що дозволяє віднести їх до класу практично нетоксичних речовин (V клас токсичності). В ході експериментальної роботи не виявлено жодних відмінностей між розробленими антимікотичними гелями та препаратами порівняння, що дозволяє вважати препарати та референтні зразки еквівалентними за показником токсичності при одноразовому нанесенні щурам на шкіру. За показниками гострої токсичності розроблені гелі клотримазолу, кетоконазолу та біфоназолу, основа яких містить карбомер та гідрофільні неводні розчинники: етанол, гліцерин, пропіленгліколь та ПЕО-400, відповідають рівню токсичності референтних препаратів крему "Клотримазол" 1% виробництва "GlaxoSmitKline Pharmaceuticals S.A", Польща, крему "Нізорал" 2% виробництва "Janssen Pharm.", Бельгія, крему "Біфунал" 1% виробництва "Actavis-Балканфарма-Разград АТ", Болгарія, що дозволяє рекомендувати гелі для подальших досліджень з метою впровадження у практичну медицину як протигрибкові засоби.

У теперішній час однією з найбільш перспективних м'яких лікарських форм є гелі, так як вони більш повно та рівномірно вивільняють лікарські речовини, легко наносяться та всмоктуються шкірою, не залишають на ній жирного блиску, володіють помірними осмотичними властивостями, проявляють охолоджуючий, зволожуючий та пом'якшуючий ефект, економічно доступні тощо [7, 8]. Однак, враховуючи гідрофобні властивості більшості антимікотичних субстанцій, препарати на їх основі випускаються переважно у формі кремів та мазей [2]. На кафедрі косметології та аромології доцентом Половко Н.П. під керівництвом проф. Башури О.Г. були проведені дослідження з розробки складу гелевої основи, що містить 1% карбополу 980 та гідрофільні неводні розчинники етанол — 15,0%, гліцерин — 35,0%, ПЕО-400 — 25,0% та пропіленгліколь — до 100,0%, до складу якої вводили лікарські субстанції кетоконазол, клотримазол та біфоназол [5].

Одним із основних етапів впровадження лікарських засобів є визначення їх токсичності [1, 6]. Проведення дослідження гострої токсичності поряд з іншими показниками, які характеризують токсикологічні властивості лікарських засобів є обов'язковою вимогою Державного фармакологічного центру МОЗ України при доклінічному вивченні нових лікарських засобів [1].

Матеріали та методи

Доклінічні дослідження гострої токсичності гелів клотримазолу, кетоконазолу та біфоназолу проводили на базі ЦНДЛ НФаУ. В доклінічних дослідженнях використовували експериментальних тварин, вирощених у віварії ЦНДЛ, який обладнаний відповідно до санітарно-гігієнічних норм. Усіх дослідних тварин утримували у стандартних санітарних умовах [3]. Під час експерименту тварини знаходилися у віварії при температурі 19-24°С, вологості не більше 50%, природному світловому режимі "день-ніч" у пластикових клітках, на збалансованому харчовому раціоні. Перед проведенням експерименту тварини пройшли акліматизацію в умовах кімнати для проведення випробувань протягом 7-ми діб. Дослідження проведені з дотриманням правил гуманного поводження з тваринами згідно з правилами Європейської конвенції по захисту тварин. Отримані дані обробляли методом варіаційної статистики на рівні значущості $p<0,05$ (враховували середнє арифметичне та його стандартну похибку). Статистичні висновки при порівнянні рядів експериментальних даних отримували на основі однофакторного дисперсійного аналізу або дисперс-

Л.В.Яковлєва — доктор фармац. наук, професор, завідувачка Центральної науково-дослідної лабораторії Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

Таблиця 1

Виживання щурів в експерименті по вивченню гострої токсичності дослідних гелів при нашкірних аплікаціях, n = 54

Група тварин	Стать	Доза, мг/кг	Тварини, які загинули/ загальна кількість тварин
Гелева основа	Самці	2810	0/6
Гель кетоконазолу, 2%	Самці	2810	0/6
"Нізорал", крем з 2% кетоконазолу	Самці	2810	0/6
Гелева основа	Самці	2810	0/6
Гель клотримазолу, 1%	Самці	2810	0/6
"Клотримазол", крем, 1%	Самці	2810	0/6
Гелева основа	Самці	2810	0/6
Гель біфоназолу, 1%	Самці	2810	0/6
"Біфунал", крем з 1% біфоназолу	Самці	2810	0/6

сійного аналізу для даних з повторними вимірюваннями критеріїв Ньюмена-Кейлса [4].

При дослідженні гострої токсичності препаратів інтегральним показником є виживання/летальність тварин, який дозволяє розраховувати середньолетальну дозу (LD_{50}) засобу. При неможливості введення препарату у дозах, які спричиняють загибель тварин, для дослідження гострої токсичності Державний фармакологічний центр МОЗ України рекомендує використовувати максимальну дозу IV класу токсичності відповідно до шляху введення [1]. Отже, при встановленні нетоксичності тест-зразка у дозі 2810 мг/кг при нашкірному нанесенні подальші дослідження можна вважати недоцільними. Протягом 14-ти днів після нашкірних аплікацій тест-зразків у щурів щоденно реєстрували вплив препаратів на виживання, на зовнішній вигляд і прояви порушень фізіологічного стану тварин. Масу тварин визначали на 3, 7 та 14 добу від початку експерименту. Через 14 діб після нанесення тест-зразків тварин знежившлювали шляхом декапітації, проводили розтин та макроскопічне обстеження внутрішніх органів, розраховували їх масові коефіцієнти (МК). Експеримент проводили на 54 статевозрілих білих щурах-самцях. Відповідно до рекомендацій ДФЦ МОЗ України у кожній експериментальній групі кількість тварин дорівнювала 6-ти [1]. Гостру токсичність дослідних зразків вивчали при нанесенні препарату на попередньо вистрижену ділянку шкіри спини, яка становила не менше 10% від загальної площі поверхні тварини. Тест-зразки наносили тонким шаром у дозі 2810 мг/кг. Шлях контакту тест зразків з організмом обрано відповідно до передбачуваного шляху використання лікарського засобу у клінічній практиці.

Таблиця 2

Динаміка маси тіла білих безпородних щурів (г) після нашкірного нанесення дослідних гелів, n = 54

Група тварин	Вихідні дані	3 доба	7 доба	14 доба
Гель з клотримазолом				
Гелева основа	211,7±4,8	220,0±6,3	220,0±8,2	225,0±6,7
Гель клотримазолу, 1%	220,0±3,7	228,3±6,5	236,7±5,6	236,7±5,6
«Клотримазол», 1% крем	210,0±5,2	218,3±7,5	221,7±6,5	228,3±7,5
Гель з біфоназолом				
Гелева основа	185,0±9,2	198,3±11,4	200,0±11,5	211,7±12,0
Гель біфоназолу, 1 %	176,7±5,6	191,7±7,0	200,0±8,6	215,0±10,6
«Біфунал», крем 1 %	178,3±10,6	190,0±10,6	191,7±9,8	200,0±9,3
Гель з кетоконазолом				
Гелева основа	183,0±7,0	194,3±9,0	201,7±10,5	213,3±10,1
Гель кетоконазолу, 2%	176,7±8,0	200,0±8,6	203,3±10,2	226,7±8,0
«Нізорал», крем з 2% кетоконазолу	180,0±8,6	190,0±12,6	186,7±10,5	208,3±14,5

Тваринам групи негативного контролю відповідним шляхом наносили гелеву основу в еквівалентному об'ємі. Перед нанесенням зразків тварини голодували протягом ночі. Доступ тварин до води був вільним, до їжі їх допускали лише через чотири години після нанесення об'єктів.

При визначенні гострої токсичності розробленого гелю з клотримазолом як референтний препарат використовували крем "Клотримазол" виробництва "GlaxoSmitKline Pharmaceuticals S.A", Польща. Експеримент проводили на 18 статевозрілих щурах-самцях з масою тіла 200-230 г. Вивчення гострої токсичності гелю з біфоназолом та кетоконазолом проводили на 18 (для кожного зразка) статевозрілих білих щурах-самцях з масою тіла 170-190 г, як препарат порівняння використовували крем "Біфунал" виробництва "Actavis-Балканфарма-Разград АТ", Болгарія та крем "Нізорал"

Таблиця 3

Масові коефіцієнти внутрішніх органів щурів на 14-й день після одноразового нашкірного нанесення дослідних гелів, n = 54

Досліджувані органи	Групи тварин		
	гелева основа	гель клотримазолу, 1%	«Клотримазол», крем, 1%
Печінка	3,08±0,12	3,01±0,09	3,04±0,12
Права нирка	0,34±0,01	0,33±0,01	0,33±0,02
Ліва нирка	0,33±0,01	0,34±0,01	0,33±0,01
Серце	0,33±0,01	0,30±0,01	0,31±0,01
Легені	0,61±0,04	0,62±0,02	0,68±0,02
Селезінка	0,39±0,02	0,33±0,01	0,34±0,02
Надниркова залоза	0,021±0,001	0,022±0,002	0,024±0,001
Тимус	0,136±0,008	0,146±0,011	0,113±0,011
Правий сім'яник	0,68±0,02	0,70±0,02	0,68±0,04
Лівий сім'яник	0,68±0,02	0,70±0,02	0,67±0,03
Досліджувані органи	Гелева основа	Гель біфоназолу, 1%	«Біфунал», крем 1%
Печінка	3,58±0,10	3,38±0,11	3,48±0,1
Права нирка	0,33±0,01	0,32±0,01	0,34±0,02
Ліва нирка	0,33±0,01	0,32±0,01	0,35±0,01
Серце	0,32±0,01	0,34±0,01	0,35±0,01
Легені	0,72±0,05	0,74±0,04	0,71±0,05
Селезінка	0,41±0,04	0,43±0,05	0,44±0,02
Надниркова залоза	0,020±0,001	0,021±0,001	0,020±0,001
Тимус	0,126±0,007	0,136±0,012	0,131±0,011
Правий сім'яник	0,67±0,02	0,62±0,06	0,65±0,04
Лівий сім'яник	0,68±0,02	0,63±0,06	0,67±0,04
Досліджувані органи	Гелева основа	Гель кетоконазолу, 2%	«Нізорал», крем кетоконазолу, 2%
Печінка	3,56±0,10	3,77±0,10	3,39±0,14
Права нирка	0,32±0,02	0,32±0,00	0,31±0,01
Ліва нирка	0,32±0,01	0,31±0,01	0,31±0,01
Серце	0,32±0,01	0,32±0,01	0,34±0,01
Легені	0,71±0,04	0,67±0,05	0,74±0,04
Селезінка	0,42±0,04	0,42±0,04	0,48±0,04
Надниркова залоза	0,020±0,001	0,020±0,001	0,024±0,002
Тимус	0,127±0,007	0,155±0,007	0,145±0,016
Правий сім'яник	0,67±0,02	0,61±0,03	0,63±0,05
Лівий сім'яник	0,67±0,02	0,62±0,02	0,63±0,04

виробництва "Janssen Pharm.", Бельгія.

Результати та їх обговорення

Як було зазначено, інтегральним показником при дослідженні гострої токсичності препаратів є виживання/летальність тварин, який дозволяє розраховувати середньо-летальну дозу (LD_{50}) — основну токсикологічну характеристику лікарського засобу. Результати досліджень, представлені в табл. 1, свідчать про відсутність загибелі тварин при одноразовому нанесенні дослідних зразків гелю.

Як свідчать результати дослідження динаміки маси тіла протягом експерименту, тварини, які отримували тест-зразки та референтні препарати, за даними показниками не відрізнялися від групи щурів, яким наносили на шкіру гелеву основу (табл. 2).

При розтині та макроскопічному дослідженні внутрішніх органів щурів через 14 діб після введення зразків відмічено, що за розміром, кольором, консистенцією, а також розташуванням внутрішні органи тварин, які отримали тест-зразок та референтний препарат, не виходили за межі фізіологічної норми. Масові коефіцієнти внутрішніх органів тварин, яким наносили дослідні гелі та препарати порівняння, не відрізнялися від групи щурів, яким наносили гелеву основу, та не відрізнялись між собою (табл. 3).

Таким чином, LD_{50} дослідних гелів лежить поза межами IV класу токсичності (LD_{50}> 2810 мг/кг), що дозволяє віднести їх до класу практично нетоксичних речовин (V клас токсичності). Жодних відмінностей між розробленими антимікотичними гелями та препаратами порівняння в експерименті не виявлено, що дозволяє вважати препарати та референтні зразки еквівалентними за показником токсичності при одноразовому нанесенні щурам на шкіру.

ВИСНОВКИ

1. Досліджені показники гострої токсичності гелів кетоконазолу, клотримазолу та біфоназолу. Визначено, що дослідні гелі відносяться до класу практично нетоксичних речовин і відповідають V класу токсичності.

2. Встановлено, що розроблені антимікотичні гелі при одноразовому нанесенні на шкіру щурів еквівалентні за показниками токсичності препаратам порівняння.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Коваленко В.М., Стефанов О.В., Максимов О.В., Трахтенберг І.М. Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів. У кн.: Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекоменд. / За ред. чл.-кор. АМН України О.В.Стефанова. — К.: Авіценна, 2001. — С. 74-97.*
2. *Компендиум 2008 — лекарственные препараты / Под ред. В.Н.Коваленко, А.П.Викторова. — К.: МОРИОН, 2008. — 2120 с.*
3. *Надлежащая производственная практика лекарственных средств / Под ред. Н.А.Ляпунова, В.А.Загория, В.П.Георгиевского, Е.П.Безуглой. — К.: МОРИОН, 1999. — С. 508-545.*
4. *Основные методы статистической обработки результатов фармакологических экспериментов. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: Ремедиум, 2000. — С. 349-354.*
5. *Пат. №46336 Гелева основа для лікарських та косметичних засобів / Н.П.Половко, О.Г.Башура, А.А.Яремчук; заявка № и 2009 11528. Заявл.: 12.11.2009. Опубл.: 26.04.2010. — Бюл. №8.*
6. *Commission of the European Communities: Council Directive of 18 December 1986 on the Lows, regulating the Application of Principles of Good Laboratory Practice and the Verification of Their Applications for Tests on Chemical Substances (87/18/EEC). The Rules Governing Medicinal Products in the European Community. — 1991. — Vol. 1. — P. 145-146.*
7. *Ofner C.M., Klech-Gelotte C.M. Gels and jellies // Encyclopedia of Pharmaceutical Technology / Ed. by J.Swarbrick, J.C.Boylan. — 2-nd ed. — New York; Basel: Marcel Dekker, 2002. — Vol. 2. — P. 1327-1344.*
8. *Penn L.E. Gel Dosage Form: Theory, Formulations and Processing. — New York: Marcel Dekker, 1990. — P. 338-381.*

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Мельникова, 12. Тел. (57) 714-27-15.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 14.10.2011 р.