

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ АНТИМІКРОБНОЇ ДІЇ МАЗЕЙ БЕТАМЕТАЗОНУ ДИПРОПІОНАТУ НА ВАЗЕЛІНОВІЙ ОСНОВІ

О.В.Дунай, К.Г.Жемерова, М.О.Ляпунов, А.Г.Фадейкіна, О.О.Ляпунова*

ДП “Державний науковий центр лікарських засобів”
Національний фармацевтичний університет*

Ключові слова: ефективність антимікробних консервантів; антимікробна дія; бетаметазону дипропіонат; гентаміцину сульфат; клотримазол; пропілпарабен; гідрофобна вазелінова основа

Наведені результати дослідження специфічної антимікробної активності та ефективності антимікробної консервуючої дії мазей бетаметазону дипропіонату на вазеліновій основі. Показано, що пропілпарабен у концентрації 0,05% забезпечує ефективне зменшення числа життєздатних клітин бактерій та грибів в інокульованих зразках на рівні критерію А (ДФУ 5.1.3), тоді як препарати-аналоги, які не містять антимікробних консервантів, у цілому не відповідають фармакопейним вимогам щодо ефективності консервуючої дії. В досліджах in vitro показано, що розроблені препарати на гідрофобних мазевих основах, які містять комбінації бетаметазону дипропіонату та лікарських речовин антимікробної дії, завдяки наявності у їх складі антимікробного консерванту пропілпарабену в концентрації 0,05% виявляють більш виразну антибактеріальну та антифунгальну дію порівняно з імпортними препаратами-аналогами.

Високий рівень захворюваності на дерматози в Україні, тенденція до зростання кількості тяжких клінічних форм, зменшення тривалості терміну ремісії та низький індекс одужання хворих роблять проблему лікування дерматозів однією з пріоритетних у сучасній дерматології [1, 7].

Важливе місце серед засобів терапії дерматозів посідають глюкокортикоїдні препарати, які виявляють виражену протизапальну активність, а також суттєву імунодепресивну дію за рахунок пригнічення різних ланок імуногенезу. На сьогодні при лікуванні дерматозів віддають перевагу місцевій глюкокортикоїдній терапії, яку можна застосовувати як самостійно, так і в комбінації з іншою терапією [6, 9].

Дерматологічні захворювання супроводжуються порушенням імун-

ного статусу та бар'єрної функції шкіри, що призводить до розвитку вторинних мікробних інфекцій. Вторинні бактеріальні та грибкові інфекції шкіри часто спостерігаються у хворих на дерматози, для яких характерна значна колонізація поверхні шкіри патогенними мікроорганізмами [15-18]. Враховуючи розповсюдженість бактеріальної і грибкової інфекції у дерматологічних хворих, для дерматології найбільш актуальним є місцеве застосування кортикостероїдів у комбінаціях з антимікробними речовинами.

У теперішній час на ринку України і Росії номенклатура лікарських засобів протизапальної та антимікробної дії для дерматології представлена переважно препаратами імпортного виробництва, у зв'язку з чим розробка і стандартизація м'яких лікарських

засобів — аналогів інноваційних препаратів імпортного виробництва є актуальною задачею.

Введення в дію Державної фармакопеї України (ДФУ), яка гармонізована з Європейською фармакопеєю (ЄФ), висунуло нові сучасні вимоги до м'яких лікарських засобів (МЛЗ), у тому числі до стандартизації складів антимікробних консервантів у МЛЗ та доказів ефективності їх антимікробної консервуючої дії. Відповідно до вимог ЄФ та ДФУ на стадії розробки МЛЗ повинен бути обраний оптимальний склад консервантів, який забезпечує ефективний захист МЛЗ від мікробного забруднення при виробництві, зберіганні та використанні [4, 13].

Традиційно вважається, що введення антимікробних консервантів у мазі на вазеліновій основі не раціональне, так як у цих гідрофобних розчинниках мікроорганізми не виживають [12, 14].

В Україні зареєстрований інноваційний препарат на гідрофобній вазеліновій основі “Три-

О.В.Дунай — науковий співробітник лабораторії мікробіологічних досліджень ДП “ДНЦЛЗ” (м. Харків)

О.О.Ляпунова — канд. фармацевт. наук, доцент кафедри заводської технології ліків Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

дерм[®] мазь” (“Schering-Plough Pharma Lda”, Португалія). Цей препарат представляє собою мазь на гідрофобній вазеліновій основі, яка містить як допоміжні речовини мінеральне масло (парафін рідкий) та вазелін білий. Діючими речовинами препарату є бетаметазону дипропіонат у комбінації з гентаміцину сульфатом і клотримазолом. Препарат не містить антимікробних консервантів [8]. У Російській Федерації зареєстровані препарати виробництва фірми “Belupo” (Хорватія) “Белодерм[®] мазь” і “Белогент[®] мазь”, які також не містять антимікробних консервантів і мають аналогічну мазеву основу. Ці мазі містять як діючі речовини відповідно бетаметазону дипропіонат та бетаметазону дипропіонат у комбінації з гентаміцину сульфатом [11].

Нами були розроблені склади препаратів-генериків, які містять ті ж діючі речовини у гідрофобній мазевій основі, що складається з вазеліну білого, вазелінового масла (парафіну рідкого) та ізопропілміростату та додатково містить антимікробний консервант пропілпарабен у концентрації 0,05%.

Метою досліджень було вивчення антимікробної дії (ефективності антимікробної консервуючої дії та специфічної антимікробної дії) розроблених препаратів-генериків порівняно з інноваційними препаратами, які не містять антимікробних консервантів.

Матеріали та методи

Дослідження ефективності антимікробної консервуючої дії проводили біологічним методом відповідно до ЄФ та ДФУ (5.1.3) [4, 13]; використовували такі тести мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 885-653, *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Вміст кожної туби, яка містила 15 г препарату, інокулювали монокультурою одного з тест-мікроорганізмів таким чином, щоб забезпечити мікробне навантаження в межах від 10^5 КУО/г до 10^6 КУО/г. Інокульований препарат ретельно перемішували, гер-

метично закривали тубу та зберігали протягом 28 діб при температурі від 20°C до 25°C в захищеному від світла місці.

Через 2, 7, 14 і 28 діб після інокуляції визначали число життєздатних клітин в 1 г кожного інокульованого зразка методом висівання на чашки Петрі з відповідним густим поживним середовищем (ДФУ, 5.1.3).

Для отримання достовірних результатів випробування для кожного з випробуваних препаратів були розроблені індивідуальні методики, які забезпечували нейтралізацію антимікробної дії. Підготовку зразка здійснювали з використанням комплексного розчинника, що забезпечує вивільнення мікроорганізмів з інокульованих зразків. Перевірку придатності методик проводили по відношенню до тест-мікроорганізмів, рекомендованих ДФУ для визначення антимікробної консервуючої дії, відповідно до розроблених схем перевірки [5].

Дослідження специфічної антимікробної дії розроблених препаратів порівняно з референтними препаратами проводили *in vitro* методом дифузії в агар у модифікації “колодязів” [2, 3, 10]. Оскільки показаннями до медичного застосування препаратів “Тридерм[®] мазь” та “Белогент[®] мазь” є дерматози, ускладнені вторинною інфекцією, і дерматомікози [8, 11], критерієм оцінки специфічної антимікробної активності досліджуваних лікарських засобів був ступінь виразності інгібуючої дії по відношенню до бактерій і грибів.

Вибір тест-мікроорганізмів для проведення досліджень проводили з урахуванням етіологічної структури захворювань, при яких застосовується цей препарат, а також спектра дії основних антимікробних компонентів — гентаміцину сульфату і клотримазолу. Як тест-мікроорганізми були обрані: грампозитивні коки (стафілококи, мікрококи); грампозитивні палички; грамотришні палички (синьогнійна паличка, бактерії родини *Enterobacteriaceae*); дріжджові і плісневі гриби.

При вивченні антибактеріальної дії використовували м'ясо-пептонний агар, при вивченні антифунгальної дії — густе середовище Сабуро.

Відповідне густе поживне середовище розплавляли, охолоджували до температури близько 45°C, інокулювали суспензією монокультури тест-мікроорганізмів (із розрахунку $1 \cdot 10^7$ КУО/мл), розливали по 20 мл у чашки Петрі. Після затвердіння в шарі середовища готували лунки діаметром 8 мм і вносили по 0,1 мл випробуваних МЛЗ, попередньо розплавлених на водяній бані з температурою близько 45°C. Інкубацію здійснювали при температурі 37°C протягом 24 год (бактерії) і 48 год (дріжджові і плісневі гриби). Діаметр зон відсутності росту вимірювали з точністю до 0,1 мм. Для кожного препарату проводили шість повторних випробувань.

Статистичну обробку результатів проводили загальноприйнятими методами, прийнятий рівень імовірності складав $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Критерієм оцінки ефективності антимікробного консерванту в лікарському засобі служить зменшення числа життєздатних клітин тест-мікроорганізмів у препараті за певний період часу після його інокуляції. Відповідно до вимог ЄФ та ДФУ існують два критерії оцінки ефективності антимікробних консервантів у препаратах для місцевого застосування (рис. 1). Критерій А відповідає рекомендованій ефективності. У тих випадках, коли критерій А не може бути досягнутий, наприклад, через підвищений ризик несприятливих впливів на пацієнта або хімічну нестабільність лікарської форми при збільшенні концентрації консерванту, лікарський засіб має задовольняти критерій В.

Результати досліджень показали, що в розробленій мазі бетаметазону дипропіонату, яка містить 0,05% пропілпарабену, ефективність антимікробного консер-

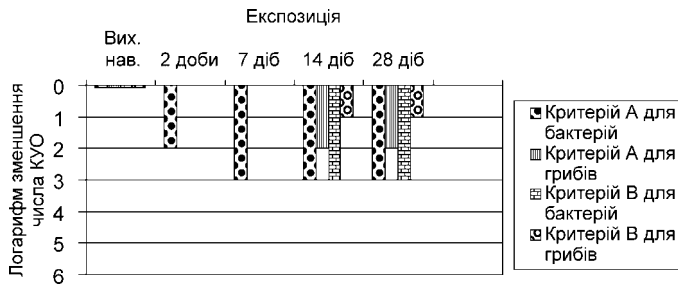


Рис. 1. Вимоги ЄФ та ДФУ до ефективності антимікробної консервуючої дії препаратів для місцевого застосування
Примітка (тут та рис. 2-7): Вих. нав. — вихідне навантаження; Вих. — вихідний

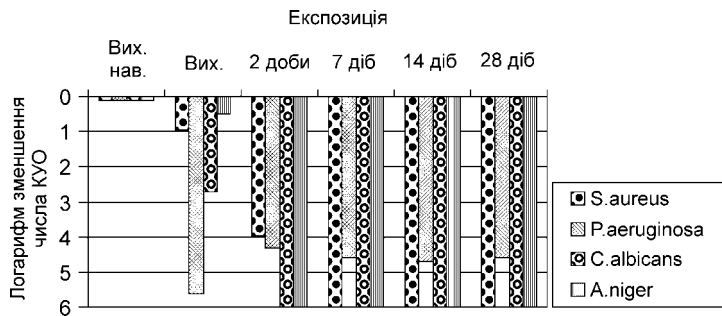


Рис. 2. Ефективність антимікробного консерванту (пропілпарабен 0,05%) у розробленій мазі з бетаметазону дипропіонатом

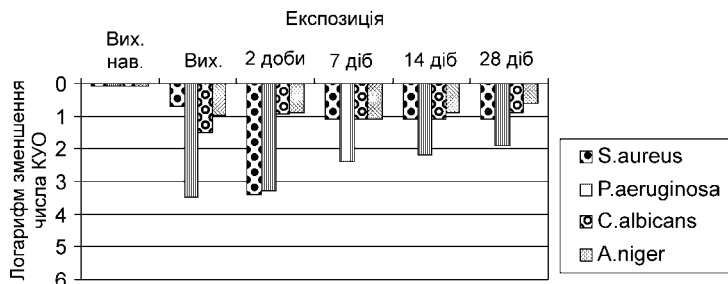


Рис. 3. Ефективність антимікробної консервуючої дії мазі "Белодерм" ("Beluro", Хорватія), що не містить антимікробного консерванту

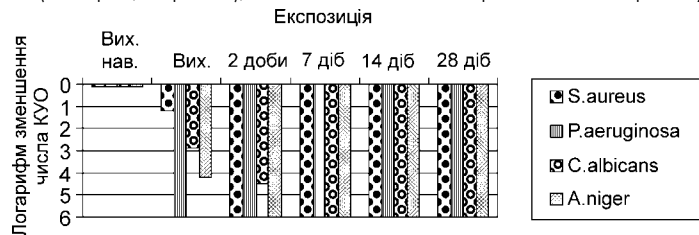


Рис. 4. Ефективність антимікробної консервуючої дії в розробленій мазі з бетаметазону дипропіонатом та гентаміцину сульфатом

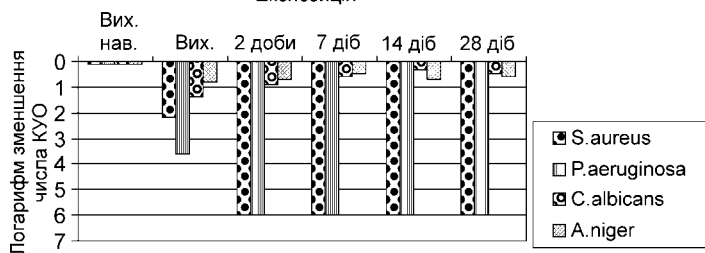


Рис. 5. Ефективність антимікробної консервуючої дії мазі "Белогент" ("Beluro", Хорватія), що не містить антимікробного консерванту

ванту відповідає вимогам критерію А (рис. 2). Життєздатні клітини грибів не виявлялися вже через 2 доби після інокуляції, золотистого стафілокока — через 7 діб. Логарифм зменшення числа життєздатних клітин синьогнійної палички через 2 доби після інокуляції та при усіх подальших висівах складав більше 4.

У референтному препараті "Белодерм" мазь, який не містив антимікробного консерванту, в інокульованих зразках в інтервалі між 2 та 28 добами зберігання відбувається збільшення числа життєздатних клітин бактерій, а число життєздатних клітин грибів суттєво не змінюється (рис. 3). Ефективність антимікробної консервуючої дії препарату не відповідає вимогам ЄФ.

В інокульованих зразках розробленої мазі з бетаметазону дипропіонатом та гентаміцину сульфатом, які містять 0,05% пропілпарабену, життєздатні клітини бактерій та *A. niger* не виявлялися вже через 2 доби після інокуляції, *C. albicans* — через 7 діб після інокуляції. Отримані результати свідчать, що ефективність антимікробної консервуючої дії в розробленому препараті перевищує вимоги критерію А по відношенню як до бактерій, так і до грибів (рис. 4).

У референтному препараті "Белогент" мазь, що містив комбінацію бетаметазону дипропіонату та гентаміцину сульфату, але не містив антимікробного консерванту, ефективність антимікробної консервуючої дії по відношенню до бактерій відповідає вимогам критерію А, напевно, завдяки наявності антибактеріального компонента (рис. 5). Число життєздатних клітин грибів в інокульованих зразках залишається практично на вихідному рівні протягом 28 діб, що не відповідає фармакопейним вимогам.

Результати порівняльного вивчення антибактеріальної активності двох препаратів (табл. 1) показали, що за ступенем виразності антибактеріального ефекту, який оцінювали за діаметром зон затримки росту, розроблена мазь

Таблиця 1

Антибактеріальна активність розробленої мазі з бетаметазону дипропіонатом та гентаміцину сульфатом і референтного препарату “Белогент® мазь” (за даними методу дифузії в агар)

Тест-мікроорганізм	Діаметр зон затримки росту (мм)	
	Розроблена мазь	Мазь “Белогент®”
<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P	18,45±0,97*	11,90±0,41
<i>S. aureus</i> 1925	19,83±0,39*	13,70±0,51
<i>S. aureus</i> 620	18,80±0,97*	13,35±0,53
<i>S. aureus</i> 47	24,60±0,57*	18,67±0,36
<i>S. saprophyticus</i> ATCC 15305	26,32±0,87*	20,97±0,62
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	17,75±0,63*	12,77±0,65
<i>C. xerosis</i> 1911	16,20±0,38*	11,55±0,26
<i>B. cereus</i> ATCC 10702	22,68±2,22*	14,00±0,26
<i>E. coli</i> ATCC 25922	16,12±0,95*	10,08±0,14
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	13,15±0,13*	н/з

Примітки:

- 1) н/з — зони затримки росту відсутні;
- 2) * — $P < 0,05$.

з бетаметазону дипропіонатом та гентаміцину сульфатом суттєво перевищує препарат-аналог “Белогент® мазь”. Крім того, розроблена мазь виявила активність по відношенню до синьогнійної палички, тоді як референтний препарат “Белогент® мазь” по відно-

шенню до цього тест-мікроорганізму активності не виявив.

Порівняльний аналіз ефективності антимікробної консервуючої дії розробленої комбінованої мазі з бетаметазону дипропіонатом, гентаміцину сульфатом та клотримазолом, що містить 0,05%



Рис. 6. Ефективність антимікробної консервуючої дії розробленої мазі з бетаметазону дипропіонатом, гентаміцину сульфатом та клотримазолом

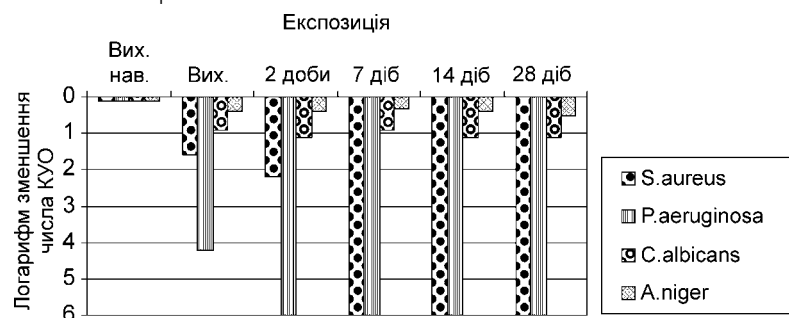


Рис. 7. Ефективність антимікробної консервуючої дії препарату “Тридерм® мазь” (“Schering-Plough Pharma Lda”, Португалія), що не містить антимікробного консерванту

пропілпарабену, та інноваційного препарату “Тридерм® мазь” показав, що в розробленому препараті життєздатні клітини тест-мікроорганізмів не виявлялися вже через 2 доби після інокуляції, що суттєво перевищує вимоги критерію А (рис. 6). У препараті “Тридерм® мазь” ефективність антимікробної консервуючої дії по відношенню до бактерій обумовлена наявністю антибактеріального компонента гентаміцину сульфату і теж відповідає вимогам критерію А (рис. 7). Разом з тим швидкість зменшення числа життєздатних клітин золотистого стафілокока в препараті “Тридерм® мазь” була нижче, ніж у розробленій мазі, що містить ті ж діючі речовини. У розробленій мазі життєздатні клітини золотистого стафілокока не виявлялися вже через 2 доби після інокуляції, а в препараті “Тридерм® мазь” — тільки через 7 діб.

В інокульованих зразках мазі “Тридерм®” число життєздатних клітин грибів залишається практично на вихідному рівні протягом 28 діб, що не відповідає фармакопейним вимогам і свідчить, що клотримазол на вазеліновій основі не виявляє ефективної консервуючої дії.

Результати дослідження специфічної антимікробної активності розробленої мазі та референтного препарату “Тридерм® мазь” показали, що обидва препарати володіють широким спектром антибактеріальної та антифунгальної дії.

Діаметри зон затримки росту тест-штамів бактерій під дією розробленої мазі достовірно перевищували діаметри зон затримки росту бактерій референтним препаратом (табл. 2), що свідчить про більш виражену антибактеріальну дію розробленого препарату.

Для мазі з бетаметазону дипропіонатом, гентаміцину сульфатом та клотримазолом спостерігалися невеликі зони затримки росту синьогнійної палички, які були відсутні для референтного препарату.

Таблиця 2

Антибактеріальна активність розробленої мазі з бетаметазону дипропіонатом, гентаміцину сульфатом та клотримазолом і референтного препарату “Тридерм® мазь” (за даними методу дифузії в агар)

Тест-мікроорганізм	Діаметр зон затримки росту (мм)	
	розроблена мазь	мазь Тридерм®
S. aureus ATCC 6538-P	19,48±0,43*	16,72±0,33
S. aureus 1722	17,07±0,19*	14,43±0,27
S. aureus 620	16,10±0,26*	12,78±0,28
S. aureus 47	16,02±0,20*	10,65±0,17
S. saprophyticus ATCC 15305	20,85±0,28*	18,02±0,27
M. luteus ATCC 9341	17,53±0,26*	15,47±0,08
C. xerosis 1911	12,55±0,22*	9,72±0,12
B. cereus ATCC 10702	14,20±0,29*	10,22±0,14
E. coli ATCC 25922	12,32±0,17*	9,78±0,14
P. vulgaris HX 19 № 222	13,27±0,21*	9,83±0,17
P. aeruginosa ATCC 9027	9,77±0,11	н/з
P. aeruginosa “Тесаков”	9,73±0,16	н/з

Примітки:

1) н/з — зони затримки росту відсутні;

2) * — P<0,05.

Таблиця 3

Антифунгальна активність розробленої мазі з бетаметазону дипропіонатом, гентаміцину сульфатом та клотримазолом і референтного препарату “Тридерм® мазь” (за даними методу дифузії в агар)

Тест-мікроорганізм	Діаметр зон затримки росту (мм)	
	розроблена мазь	мазь “Тридерм®”
C. albicans ATCC 885-653	22,05±0,08*	21,15±0,19
C. tropicalis ВКПГу-547/У-1003	23,02±0,08	22,70±0,20
C. pseudotropicalis ВКПГу-601/33	28,38±0,11*	26,80±0,07
C. parapsilosis ВКПГу-488/10	19,20±0,14*	18,62±0,11
C. utilis ЛИА-01	21,83±0,08	21,65±0,12
C. neoformans ВКПГу-881/ВКМУ-753	25,60±0,40*	22,62±0,53
A. niger ATCC 16404	15,95±0,21*	13,92±0,10
A. fumigatus ВКПГf-59/В-770	16,15±0,11	15,95±0,11

Примітка: * — P<0,05

За ступенем виразності антифунгальної дії до 5 з 8 тест-штамів грибів розроблена мазь також достовірно перевищує препарат “Тридерм® мазь” (табл. 3).

Таким чином, результати проведених експериментальних досліджень показали, що гідрофоб-

на вазелінова основа, яка не містить додаткового антимікробного консерванту, не забезпечує ефективного антимікробного захисту МЛЗ від мікробного забруднення в процесі виробництва, зберігання та використання. Наявність у складі МЛЗ на гідрофобній ва-

зеліновій основі діючих речовин, які володіють вираженою антифунгальною (клотримазол) дією, не гарантує ефективності антимікробної консервуючої дії по відношенню до грибів відповідно до фармакопейних вимог. Введення до складу препаратів на гідрофобній вазеліновій основі антимікробного консерванту пропілпарабену в концентрації 0,05% забезпечує ефективність антимікробної консервуючої дії по відношенню до бактерій та грибів на рівні вимог критерію А ЄФ та ДФУ, а також підсилює ступінь виразності специфічної антимікробної дії по відношенню до бактерій та грибів.

Результати досліджень були використані при розробці мазей, які впроваджуються у виробництво на ВАТ “Хіміко-фармацевтичний комбінат “Акрихін” (Росія). За отриманими даними можна прогнозувати більш високу ефективність терапевтичної дії розроблених препаратів-генериків, а також відсутність при їх клінічному застосуванні ускладнень, пов'язаних з бактеріальною та грибовою інфекцією.

ВИСНОВКИ

1. Гідрофобні вазелінові основи, що не містять антимікробних консервантів, не володіють ефективною антимікробною консервуючою дією, яка відповідає вимогам ЄФ та ДФУ.

2. Введення до складу м'яких лікарських засобів на гідрофобних вазелінових основах антимікробного консерванту пропілпарабену в концентрації 0,05% забезпечує відповідність ефективності антимікробної консервуючої дії вимогам критерію А ЄФ та ДФУ.

3. Розроблені препарати на гідрофобних мазевих основах, які містять комбінації бетаметазону дипропіонату та лікарських речовин антимікробної дії, завдяки наявності у їх складі антимікробного консерванту пропілпарабену в концентрації 0,05% виявляють більш виразну антибактеріальну та антифунгальну дію порівняно з імпортованими препаратами-аналогами.

ЛІТЕРАТУРА

1. Буянова О.В., Аль-Рамлаві Х.Д. //Укр. журн. дерматол., венерол., косметол. — 2005. — №4. — С. 36-39.
2. Волянський Ю.Л., Гриценко І.С., Широбоков В.П. та ін. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: Метод. рекомендації. — К.: МОЗ України, Державний фармакологічний центр, 2004. — 38 с.
3. Даценко Б.М., Бирюкова С.В., Тамм Т.И. и др. Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению лекарственных препаратов для местного лечения гнойных ран. — М.: МЗ СССР, 1989. — 45 с.
4. Державна Фармакопея України / ДП “Науково-експертний фармакопейний центр”. — 1-е вид. — Х.: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
5. Жемерова Е.Г., Кобзарь А.И., Хованская Н.П. //Фармаком. — 2002. — №3. — С. 51-55.
6. Калюжная Л.Д. //Укр. журн. дерматол., венерол., косметол. — 2002. — №1. — С. 30-32.
7. Коган Б.Г., Терлецкий В.Б., Терлецкий Р.В. //Укр. журн. дерматол., венерол., косметол. — 2005. — №3. — С. 22-24.
8. Компендиум 2006 — лекарственные препараты / Под ред. В.Н.Коваленко, А.П.Викторова. — К.: Морион, 2006. — 1920 с.
9. Коржова Т.П., Степаненко В.І., Сологуб Л.В., Пуришкіна О.Д. //Дерматол. та венерол. — 2001. — Т. 13, №3. — С. 3-6.
10. Першин Г.Н. Методы экспериментальной химиотерапии бактериальных инфекций. Методы экспериментальной химиотерапии. — М., 1971. — С. 100-106.
11. Регистр лекарственных средств России РЛС. Энциклопедия лекарств. — 15-й вып. / Гл. ред. Г.Л.Вышковский. — М.: “РЛС-2007”, 2006. — С. 131.
12. Allison L., Erin M. //Dermatitis. — 2005. — Vol. 16, №2. — P. 57-66.
13. European Pharmacopoeia 5. — 5. General Texts. — 5.1. General Texts of Sterility. — 5.1.3. Efficacy of Antimicrobial Preservation. — P. 447-449.
14. Handbook of Pharmaceutical Excipients: 2 Ed. / Ed. by Anley Wade and Paul J. Weller. — Washington/London: Amer. Pharm. Association / The Pharm. Press, 1994. — 651 p.
15. Hoeger P.H. //Pediatr. Allergy Immunol. — 2004. — Vol. 15, №5. — P. 474-477.
16. Leung D.Y. //Curr. Opin. Pediatr. — 2003. — Vol. 15, №4. — P. 399-404.
17. Noruka E.N. //Int. J. Dermatol. — 2004. — Vol. 43, №10. — P. 739-744.
18. Roll A., Cozzio A., Fisher B., Schmid-Grendelmeier P. //Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. — 2004. — Vol. 4, №5. — P. 373-378.

Адреса для листування: 61085, м. Харків,
вул. Астрономічна, 33. Тел. (057) 720-66-03.
ДП “ДНЦЛЗ”

Надійшла до редакції 29.01.2008 р.