

УДК 615.014.2 (477.51)

В. В. ТРОХИМЧУК², д-р фарм. наук, проф., В. В. ШМАТЕНКО¹,

В. О. ТАРАСЕНКО¹, канд. фарм. наук, А. О. ДРОЗДОВА², канд. фарм. наук

¹ Українська військово-медична академія, м. Київ

² Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, м. Київ

ТЕХНОЛОГІЧНИЙ СПОСІБ ВВЕДЕННЯ ДІЮЧИХ РЕЧОВИН ДО ОСНОВИ МАЗІ

Ключові слова: офлоксацин, німесулід, лідокаїн, антимікробна активність, тест-культури, живильне середовище, мазь

Мікробіологічні дослідження відіграють важливу роль для вивчення етіології різноманітних патологічних захворювань, що супроводжуються рановим процесом, їх профілактики та лікування [1].

Враховуючи значну роль мікробного фактора у розвитку ранового процесу, особливого значення в його комплексному лікуванні надають застосуванню м'яких лікарських засобів (МЛЗ), що комбінують антимікробну, протизапальну та місцевоанестезувальну дію. Такі МЛЗ мають бути виготовлені на гідрофільних та емульсійних основах, що мають контрольовану дегідратувальну дію, здатні впливати на вивільнення, біодоступність і терапевтичну дію лікарських речовин.

У цьому аспекті в хірургічній практиці добре себе зарекомендували офлоксацин, німесулід та лідокаїн. Спектр фармакологічної дії зазначених субстанцій визначає їх використання для виготовлення МЛЗ для лікування гнійно-запальної фази ранового процесу [2].

Завданням цього дослідження є визначення антимікробної активності модельних зразків з метою обґрунтування доцільності технологічного способу введення активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) до складу основи.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктом дослідження були модельні зразки мазевих основ, виготовлених на гідрофільних носіях, що містять АФІ – офлоксацин, німесулід та лідокаїн.

Дослідження антимікробної активності зразків здійснювали на базі кафедри клінічної імунології та мікробіології Харківської медичної академії післядипломної освіти під керівництвом проф. С. В. Бірюкової.

Обґрунтування способу введення АФІ – офлоксацину, німесуліду та лідокаїну до складу мазі залежно від антимікробної активності виконували методом дифузії в агарі на твердому живильному середовищі, який ґрунтується на здатності антибактеріальної речовини пригнічувати ріст мікроорганізмів [3, 4, 5]. Зони пригнічення росту тест-штамів мікроорганізмів випробовуваним зразком порівнювали з діаметрами зон пригнічення росту, які утворюються у разі використання референтного препарату Офлокаїн (ВАТ ХФЗ «Фармацевтична фірма "Дарниця"», Україна) з концентрацією офлоксацину 0,1%.

Під час виконання досліджень використано еталонні тест-штами з американської типової колекції культур мікроорганізмів (США) (АТСС): *Escherichia coli* АТСС 10536, *Klebsiella pneumoniae* АТСС 10031 та штами тих самих мікроорганізмів, що було виділено у хворих із патологічними вогнищами запалення (табл. 1).

**Результати перевірки властивостей використаних тест-штамів
мікроорганізмів**

№ з/п	Штами мікроорганізмів/ Колекція	Властивості			
		морфологічні	культуральні	тинкторіальні	біохімічні
1	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	+	+	+	+
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	+	+	+	+

Примітка. «+» – Відповідає.

Бактерії мікроорганізмів *Escherichia coli* ATCC 10536 та *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 вирощували за температури 35 °С упродовж 18–20 год на м'ясопептонному агарі. Живильні середовища перевіряли на стерильність та на ростові властивості згідно з вимогами ДФУ.

Готували суспензії мікроорганізмів і визначали їхню оптичну густина при 550 нм за допомогою денситометра Densimat в одиницях Мак-Фарланда для визначення концентрації бактеріальної суспензії в КУО/мл. Відбирали гладкі або рівномірно пігментовані колонії, із характерним ростом і тинкторіальними властивостями у разі фарбування за Грамом, пересіювали їх на щільне живильне середовище того самого складу та інкубували залежно від виду мікроорганізмів протягом 18–24 год або 24–48 год відповідно для аеробних та анаеробних бактерій.

Кількість мікроорганізмів в суспензіях паралельно підтверджували методом прямого посіву на чашках Петрі зі стерильним густим живильним середовищем – соєво-казеїновим агаром, перераховуючи на КУО/мл [4, 5].

На наступному етапі визначення антимікробної активності досліджуваного зразка мазі відповідне розплавлене агаризоване живильне середовище, охолоджене до 40–45 °С, інокулювали тест-штамом мікроорганізму в оптимальній концентрації КУО/мл і вносили по 20 мл в чашки Петрі, розміщені на поверхні обертового столика з метою одержання рівномірного шару, і залишали на горизонтальній рівній поверхні до застигання агару.

Кількість суспензії вегетативних клітин визначали експериментально на основі таких критеріїв:

- оптимальний ріст тест-мікроорганізмів;
- наявність зон пригнічення росту тест-штамів.

В застиглому живильному середовищі за допомогою стерильного металевого пробійника із внутрішнім діаметром 6 мм та зовнішнім діаметром 8 мм робили лунки у двошаровій товщі агаризованого живильного середовища. Після цього в лунки вносили по 50 мкл зразка опрацьованого лікарського засобу та препарат порівняння Офлокаїн. Для зменшення впливу відмінностей в проміжках часу між внесенням зразків, які використовували в досліді, після їх внесення в лунки чашки Петрі витримували за кімнатної температури протягом 1 год, після чого інкубували за 36 ± 1 °С упродовж 18–24 год. Діаметри зон затримки росту тест-культур вимірювали штангенциркулем з точністю до 1 мм. Випробування проводили в п'яти повторях.

У разі виконання мікробіологічних досліджень важливим моментом є товщина агарового шару в чашці Петрі. Дотримання цих вимог необхідне у зв'язку з тим, що розмір та форма зони пригнічення росту тест-культур залежать від глибини та рівномірності агарового шару. Встановлено, що оптимальна товщина агарового шару має дорівнювати $4,0 \pm 0,5$ мм, що досягається у разі внесення в чашку Петрі діаметром 90 мм 20 мл агару, діаметром 100 мм – 25 мл агару та діаметром 150 мм – 60 мл агару [6, 7, 8].

Мікробіологічні дослідження містили такі етапи: підготовлену суспензію (1 мл) з невідомою бактеріальною концентрацією вносили в підготовлену ампулу АРІ (з 5 мл 0,85%-го розчину NaCl) та перемішували, потім вміщували ампулу у зчитуючий блок і реєстрували цифрове значення Мак-Фарланда. Якщо це значення було менше 0,5, виймали ампулу з приладу та додавали необхідну кількість бактеріальної суспензії. Якщо кількість інокулята перевищувала найбільше значення 7, то розбавляли суспензію і повторювали ще раз, використовуючи іншу ампулу. При чому ампула має бути чистою зовні та протерта перед використанням (табл. 2).

Т а б л и ц я 2

Відповідність одиниць Мак-Фарланда оптичній густині

Стандарт Мак-Фарланда	Бактеріальна концентрація, × 10 ⁸ мл	Теоретична оптична густина за 550 нм
0,5	1,5	0,125
1	3	0,25
2	6	0,50
3	9	0,75
4	12	1,00
5	15	1,25
6	18	1,50
7	21	1,75

Обов'язково здійснювали тестування приладу: брали ампули McFarland Standart 6 шт по 5 мл (0,5, 1, 2, 3, 4, 5) та по черзі вміщували їх в денсимат. Тестування виконували кожен раз після очищення приладу.

Одержані результати порівнювали з даними, наведеними у табл. 2 та складали пропорцію відповідно до одержаних результатів.

Результати показують, яку кількість концентрованого інокулята потрібно взяти для внесення в поживне середовище, щоб досягти потрібної концентрації мікроорганізмів в 1 мл поживного середовища.

Результати дослідження та обговорення

Попередніми дослідженнями було встановлено оптимальну концентрацію АФІ у складі мазі: офлоксацину – 0,05%, німесулід – 1,0%, лідокаїну – 4,0%. Для визначення оптимального способу введення АФІ до складу основи готували зразки з офлоксацином та німесулідом у вигляді розчину в диметилсульфоксиді (ДМСО), суспензії з ПЕО-400, суспензії з гліцеролом та суспензії з маслом вазеліновим. Зразки з лідокаїном вводили в мазеву основу у вигляді розчину у воді, розчину в ДМСО та розчину в ПЕО-400, враховуючи його розчинність у воді та гідрофільних неводних розчинниках (ГНР).

Під час вимірювання зон пригнічення росту тест-культур орієнтувалися на зону повного пригнічення їх видимого росту.

Вивчення антимікробної активності модельних зразків залежно від способу введення АФІ наведено в табл. 3.

Аналіз антимікробної активності зразків залежно від способу введення АФІ свідчить, що у разі введення офлоксацину та німесулід у вигляді суспензії з гліцеролом, ПЕО-400 та маслом вазеліновим зони пригнічення росту тест-культур навколо лунок не перевищують таких, як у разі введення офлоксацину та німесулід у вигляді розчину в ДМСО і становлять 24,27 ± 0,2 мм, 24,22 ± 0,5 мм, 23,37 ± 0,6 мм, 23,97 ± 0,6 мм, 23,25 ± 0,5 мм для *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, *S. aureus*, *B. subtilis* відповідно.

Антимікробна активність зразків мазі за різних способів уведення АФІ

Модельні зразки	Зони затримки росту мікроорганізмів, мм				
	<i>E. coli</i> ATCC 10536	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	<i>C. albicans</i> ATCC8 85/653	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633
Офлоксацин /Німесулід					
Розчин у ДМСО	24,27 ± 0,2	24,22 ± 0,5	23,37 ± 0,6	23,97 ± 0,6	23,25 ± 0,5
Суспензія з ПЕО-400	22,38 ± 0,1	21,38 ± 0,3	21,28 ± 0,3	22,23 ± 0,3	21,30 ± 0,6
Суспензія з гліцеролом	18,18 ± 0,5	19,12 ± 0,4	18,58 ± 0,5	19,21 ± 0,4	19,23 ± 0,2
Суспензія з маслом вазеліновим	20,16 ± 0,3	21,14 ± 0,3	22,19 ± 0,3	20,11 ± 0,2	20,12 ± 0,1
Лідокаїн					
Розчин у воді	20,12 ± 0,5	19,89 ± 0,7	19,28 ± 0,5	19,45 ± 0,4	19,85 ± 0,6
Розчин у ДМСО	22,25 ± 0,2	23,01 ± 0,5	22,85 ± 0,7	22,23 ± 0,5	22,18 ± 0,5
Розчин в ПЕО-400	16,62 ± 0,6	17,15 ± 0,3	18,09 ± 0,7	17,62 ± 0,9	17,27 ± 1,1

П р и м і т к а. Кількість вимірів $n = 5$, $P = 95\%$.

Порівняльний аналіз експериментальних досліджень свідчить, що зразки мазі, в основу яких лідокаїн вводили у вигляді розчину в ДМСО, виявили більшу антимікробну активність – $22,25 \pm 0,2$ мм, $23,01 \pm 0,5$ мм, $22,85 \pm 0,7$ мм, $22,23 \pm 0,5$ мм, $22,18 \pm 0,5$ мм для *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, *S. aureus*, *B. Subtilis* відповідно.

Таким чином, на підставі проведених експериментальних досліджень *in vitro* встановлено, що оптимальним способом введення офлоксацину, німесулідів та лідокаїну є спосіб введення їх у вигляді розчину в ДМСО.

В и с н о в к и

1. Здійснено мікробіологічні дослідження (метод дифузії в агар) щодо обґрунтування доцільності способу введення АФІ до складу опрацьованого лікарського засобу комплексної ранозагоювальної дії.

2. У результаті вивчення антимікробної активності (*in vitro*) встановлено, що оптимальним способом введення АФІ – офлоксацину, німесулідів та лідокаїну – є спосіб введення їх у вигляді розчину в ДМСО.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Блатун Л. А. Местное медикаментозное лечение ран // Хирургия. – 2011. – № 4. – С. 51–59.
2. Перцев И. М., Котенко А. М., Чуешов О. В., Халаева Е. Л. Фармацевтические и биологические аспекты мазей. – Харьков: Издательство НФаУ «Золотые страницы», 2003. – 288 с.
3. Клиника микробиологической антимикробной химиотерапии. – 2004. – Т. 6, № 4.
4. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів (Метод рекомендації). – К., 2004. – 39 с.
5. Державна фармакопея України – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
6. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Метод. указания МУК 4.2.1890-04). – К., 2004. – С. 314–316.
7. Пат. 70983 Україна МПКА61К 9/06 (2006.01), А61К 31/00, А61Р 17/00. Фармацевтична композиція Офлінім у формі мазі з протизапальною, антимікробною, знеболювальною та репаративною дією / В. В. Шмагтенко, В. В. Трохимчук, В. О. Тарасенко. – № u201315497, Заявл. 30. 12. 2013; Опубл. 25. 04. 2014, Бюл. № 8.
8. European Pharmacopeia. – 4-th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2003. – 2416 p.

Надійшла до редакції 04. 01. 2015.

В. В. Трохимчук², В. В. Шматенко¹, В. О. Тарасенко¹, А. О. Дроздова²

¹ *Українська військово-медична академія, м. Київ*

² *Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, м. Київ*

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ВВЕДЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В ОСНОВУ МАЗИ

Ключевые слова: офлоксацин, нимесулид, лидокаин, антимикробная активность, тест-культуры, питательная среда, мазь

А Н Н О Т А Ц И Я

Проблема расширения номенклатуры лекарственных средств, которые используют для местного лечения раневого процесса, остается важной задачей для практической военной медицины. В этом аспекте актуальной есть разработка комбинированной мази для применения в первой фазе раневого процесса, которая имеет комплексное влияние на патологический процесс и проявляет антибактериальную, противовоспалительную и местноанестезирующую активность.

Целью исследования было обоснование технологического способа введения активных фармацевтических ингредиентов в состав мази в зависимости от антимикробной активности модельных композиций.

Объектом исследования были модельные образцы мазевых основ, приготовленных на гидрофильных носителях, содержащие активные фармацевтические ингредиенты – офлоксацин, нимесулид и лидокаин.

Микробиологические исследования проводили методом диффузии в агаре на твердой питательной среде, который базируется на возможности антибактериального вещества угнетать рост микроорганизмов.

Сравнительный анализ экспериментальных исследований свидетельствует, что образцы мази, в основу которых АФИ офлоксацин, нимесулид и лидокаин вводили в виде раствора в ДМСО, выявили наибольшую антимикробную активность.

В результате проведенного исследования по изучению антимикробной активности модельных образцов мази установлено, что оптимальный способ введения в основу АФИ – офлоксацина, нимесулида и лидокаина – это способ введения их в виде раствора в ДМСО.

V. V. Trochimchuk², V. V. Shmatenko¹, V. O. Tarasenko¹, A. O. Drozdova²

¹ *Ukrainian Military Medical Academy, Kyiv*

² *Shupyk National Medical Academy of Post-Graduate Education, Kyiv*

TECHNOLOGY ADMINISTRATION ACTIVE SUBSTANCE IN THE OINTMENT BASE

Key words: ofloxacin, nimesulide, lidocaine, antimicrobial activity, the test culture, culture medium, ointment

A B S T R A C T

The problem of expanding the range of medicines that are used for the topical treatment of wound process, remains an important challenge for practical military medicine. In this aspect, there are topical ointments combining development for use in the first phase of wound process, which has a complex influence on the pathological processes and exhibits antibacterial, anti-inflammatory and local anesthetic activity.

The aim of the study was substantiation of technological route of administration of the active pharmaceutical ingredients in the ointment base, depending on the antimicrobial activity of model compositions.

The study included a model sample of ointment bases, cooked on a hydrophilic carrier containing active pharmaceutical ingredients – ofloxacin, nimesulide and lidocaine.

Microbiological studies were performed by diffusion on solid agar medium, which is based on the ability of substances to inhibit the growth antibacterial microorganisms.

Comparative analysis of experimental studies showed that the samples of ointments, which are based with the active pharmaceutical ingredients ofloxacin, nimesulide and lidocaine was injected as a solution in DMSO showed the highest antimicrobial activity.

As a result of study on the antimicrobial activity of ointments model samples determined that the optimal method of administering the basis AFI – ofloxacin, nimesulide and lidocaine – a method of administering them in the form of a solution in DMSO.

Адреса для листування з авторами: vika tarasenko83@mail.ru