



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119965** (13) **U**

(51) МПК (2017.01)

A61F 9/00

A61K 31/045 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 08316	(72) Винахідник(и): Тихонов Олександр Іванович (UA), Коношевич Людмила Володимирівна (UA), Шпичак Олег Сергійович (UA), Коваль Василь Миколайович (UA)
(22) Дата подання заявки: 11.08.2017	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.10.2017	(73) Власник(и): ТИХОНОВ ОЛЕКСАНДР ІВАНОВИЧ, вул. Червоноармійська, 8/10, кв. 55, м. Харків, 61052 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.10.2017, Бюл.№ 19	(74) Представник: Лерантович Еліна Томашівна, реєстр. №285

(54) ОЧНІ КРАПЛІ

(57) Реферат:

Очні краплі містять природний прополіс, причому як природний прополіс містять водний витяг прополісу та додатково містять полівінілпіролідон, поліетиленгліколь-300 (Макрогол-300) та пропіленгліколь, воду для ін'єкцій.

UA 119965 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до офтальмології, і може бути використана для лікування широкого кола запальних захворювань очей: бактеріальних, алергічних, інфекційно-алергічних: кон'юнктивітів, блефаритів, кератитів та інших.

Збільшення виробництва якості лікарських засобів є одним із важливих умов розвитку фармації в галузі охорони здоров'я та покращення лікарського забезпечення населення України. У зв'язку з цим, проблема створення нових ефективних лікарських препаратів для лікування комбінованих уражень органу зору, травмотоксикохімічної етіології, що складає до 50 % від усіх захворювань на сьогоднішній день є актуальною.

Для виконання даної проблеми необхідно подальше ціленаправлене розширення сировинної бази фармацевтичної промисловості, особливо в галузі виробництва ліків природного походження.

Пошуком економічно раціональних і доступних сировинних джерел доказана доцільність застосування в технології вітчизняних ліків прополісу – одного із доступних продуктів бджіл, що містить у своєму складі до 50 % фенольних сполук.

Лікарські засоби на їх основі для лікування і профілактики глаукоми, травматичних, термічних, хімічних та променевих уражень органів зору до теперішнього часу не були розроблені.

По аналізу очної захворюваності розрахункове число запальних захворювань 18 млн. на рік, в тому числі кон'юнктивітів - 12 млн. Хворі з запальними захворюваннями очей становлять 40-60 % амбулаторного прийому окуліста. Досить частою формою є поєднані бактеріально-алергічні кон'юнктивіти і блефарокон'юнктивіти. Вони мають цілорічне завзяте рецидивуючий перебіг. У цих випадках застосування антибіотиків нерідко не робить лікувального ефекту і може призводити до розвитку хронічних, наполегливих лікарських блефарокон'юнктивітів.

Широко відомі сульфаніламідні препарати для лікування інфекційних захворювань очей, наприклад кон'юнктивіти, блефарити, кератити та інші. Відомі очні краплі, виконані у вигляді 10-30 % водного розчину лікарського препарату Сульфацил натрію [М.Д. Машковский "Лекарственные препараты". – М.: "Медицина", 1985, т. 2, с.281-282.; RU №2245138 С1, А61К 31/04, 2005 г.].

Відомий протизапальний, антимікробний і регенеруючий засіб "Пропомікс" [пат. UA №1738, А61К 35/00, 25.10.1994, бюл. № 3], предметом є застосування 0,5-0,6 % розчину поліфенольного гідрофільного комплексу сполук з прополісу як протизапального, антимікробного і регенеруючого засобу в офтальмології.

Для отримання основи крапель - порошкоподібної субстанції (фенольного гідрофільного препарату прополісу) потрібне застосування (ЛЗР) легкозаймистої рідини (оцтово-етиловий ефір - етилацетат і петролейний ефір - "прекурсори"), а це дуже суворий кількісний облік, який може тягнути за собою кримінальну відповідальність, також для його отримання використовують нестандартне устаткування.

Відомі очні краплі [см. Наказ Міністерства охорони здоров'я СРСР N 96, 3.04.91, М., розділ 4, с. 52-61], що містять розчинник у вигляді води очищеної і активну речовину. Як активна речовина може бути використаний левоміцетин, сульфацил натрію і ін.

Недоліком цих крапель є недостатньо ефективний вплив крапель на процеси загоєння пошкодженої рогівки. Це подовжує процес лікування, вимагає більше часу для рубцювання тканин, причому якість рубцювання не завжди задовільна.

Відомо, що багато хімічних сполук з антивірусною активністю проявляють побічну дію у вигляді високої токсичності, тератогенності та імунодепресивних властивостей. У зв'язку з цим важливим напрямом наукових досліджень є виявлення антивірусної дії у препаратів, отриманих з сировини природного походження

Існують краплі для очей [пат. UA №97076, А61F 9/00, А61К 31/045, А61Р 27/02, від 25.02.2015, бюл. № 4/2015], що містять розчинник у вигляді води очищеної і активну речовину, а саме природний прополіс.

В основу корисної моделі покладено задачу удосконалення крапель для очей, в яких за рахунок оптимального підбору компонентів буде отримано засіб, що має широкий спектр фармакологічної дії без прояву побічної дії і призначеного для забезпечення протизапальної, розсмоктуючої, антисептичної дії, сприяння ніжному рубцюванню тканин рогівки ока. для лікування травма-токсико-хімічних уражень очей.

Поставлена задача вирішується таким чином, що розроблені очні краплі що містять природний прополіс, згідно з корисною моделлю, як природний прополіс містять водний витяг прополісу та додатково містять полівінілпіролідон, поліетиленгліколю-300 (Макроголу-300) та пропіленгліколь, воду для ін'єкцій при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

водний витяг прополісу 0,1-0,7

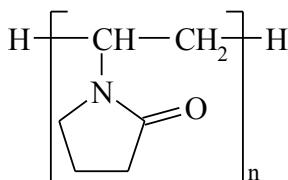
полівінілпіролідон 0,3-1,0
 поліетиленгліколь-300 (макрогол-300) 0,2-1,0
 пропіленгліколь 0,1-1,0
 вода для ін'єкцій решта.

Згідно з корисною моделлю, водний витяг прополісу використовують у співвідношенні сировини до екстрагенту 1:10.

Основними діючими сполуками прополісу є дійсно похідні γ -пірону, фенолкарбонові кислоти, оксикумарини, тритерпенові та смолобальзамічні сполуки та ін. Склад прополісу це рослинні смоли (в середньому 55 %); бальзами, які містять у вигляді складних сумішей ефірні масла (8 %), дубильні речовини (8 %), ароматичні альдегіди, фенолокислоти; віск (22 %); квітковий пилок (5-11 %); механічні домішки. В ньому великий набір мінеральних елементів, містяться вітаміни та інші речовини. До групи біоактивних сполук належать флавоноїди з їх антибактеріальними властивостями. З прополісу виготовляють спиртові настої, спиртові емульсії, прополісне молоко, прополісне вершкове масло, ефірний екстракт тощо. Прополіс має сильну антимікробну і стимулюючу дію.

Водна витяжка прополісу (СПЦ-СР-95, версія: 02). Виробник: ТОВ "Фармацевтична компанія "Здоров'я", м. Харків. Мутно-опалесцююча рідина темно-сірого кольору з зеленуват-коричневим відтінком та запахом прополісу.

Як зв'язувальну речовину беруть повідон (полівінілпіролідон (ПВП) (Povidonum) (Povidone) (ФС 42-1194-78, ДФУ 2.0, Том 2, с. 543-547).



Брутто-формула: $C_{6n}H_{9n+2}N_nO_n$ [90003-39-8].

α -Гідро- ω -гідрополі[1-(2-оксопіролідин-1-іл)етиле́н]. Складається з лінійних полімерів 1-етенілпіролідин-2-ону.

Вміст: не менше 11,5 % і не більше 12,8 % азоту (N; А.м. 14,01), у перерахунку на безводну речовину. Порошок або пластівці білого або жовтаво-білого кольору. Гігроскопічний. Легко розчинний у воді Р, етанолі (96 %) Р і метанолі Р, дуже мало розчинний в ацетоні Р.

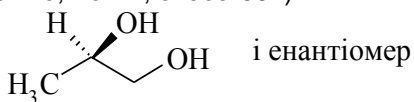
pH (2.2.3) 0,2 % водного розчину – від 3,0 до 5,0. Альдегіди – не більше 0,05 % (500 ppm), у перерахунку на ацетальдегід. Пероксиди – не більше 0,04 % (400 ppm), у перерахунку на H_2O_2 . Важкі метали (2.4.8, метод D) – не більше 0,001 % (10 ppm). Вода (2.5.12) – не більше 5,0 %. Сульфатна зола (2.4.14) – не більше 0,1 %.

Як розчинники застосовуються поліетиленгліколь-300 (ПЕГ-300) (Макроголи).

Макроголи являють собою суміш полімерів із загальною формулою $H-(OCH_2-CH_2)_n-OH$, де n – середня кількість оксіетиленових груп.

Прозора, в'язка, безбарвна або майже безбарвна, гігроскопічна рідина. Змішується з водою Р, дуже легко розчинний в ацетоні Р, етанолі (96 %) Р і метилхлориді Р, практично не розчинний у жирних оліях і мінеральних маслах.

Пропіленгліколь (Propylenglycol) (Propylene Glycol) (ТУ 6-09-2434-81, ВФС 42-1594-86, ДФУ 2.0, Том 2, с. 563-564).



Брутто-формула: $C_3H_8O_2$ [57-55-6].

Молекулярна маса: 76,1.

(RS)-пропан-1,2-діол.

В'язка, прозора, безбарвна рідина. Гігроскопічна. Змішується з водою Р та етанолом (96 %) Р. Використовується як співрозчинник і стабілізатор у сумішах з водою Р, етанолом Р або спиртом бензиловим Р.

Технологія виготовлення очних крапель

До одержаного водного витягу прополісу (згідно зі Специфікацією СПЦ-СР-95, версія: 02) при інтенсивному перемішуванні послідовно додають пропіленгліколь, поліетиленгліколь-300 (Макрогол-300) та полівінілпіролідон та доводять водою для ін'єкцій до необхідного об'єму. Розчин фільтрують, проводять стерильну фільтрацію і розливають у флакони, які щільно закупорюють гумовою пробкою та алюмінієвим ковпачком під обкатку з кришкою-крапельницею.

Краплі, які отримані за технологією без застосування ЛЗР, це стандартизована, стерильна рідина полівалентної фармакологічної активності, стабільна в процесі зберігання при різних температурних режимах (від 0 °C - до 25 °C) і відповідає всім вимогам ДФУ та GMP. Також краплі по всіх параметрах економічно і з точки зору пожежної безпеки більш доцільні в порівнянні з раніше існуючими.

Приклад 1. Мікробіологічні дослідження очних крапель.

Для дослідження антибактеріальної активності досліджуваного препарату – очних крапель було використано 4 тест-зразки.

Відповідно до рекомендацій ВООЗ для оцінки активності досліджуваного препарату використовували тест-штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Basillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Candida albicans* ATCC 885/653. Приготування мікробної суспензії мікроорганізмів проводили з використанням приладу Densi-La-Meter (виробництва PLIVA-Lachema, Чехія; довжина хвилі 540 нм). Суспензію готували відповідно до інструкції, яка додається до приладу і інформаційного листа про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006 "Стандартизація приготування мікробних суспензій", м. Київ. Синхронізацію культур проводили з використанням низької температури (4 °C). Мікробне навантаження становило 10^7 мікробних клітин на 1 мл середовища і встановлювалося за стандартом McFarland. У роботу брали 18-24 годинну культуру мікроорганізмів. Для досліджень використовували агар Мюллера-Хінтона (Дагестанський НВО "Живильні середовища", термін придатності середовища до XI 2014 р).

Метод дифузії препарату в агар проводили "колодязями". Визначення активності антибактеріальних препаратів проводили на двох шарах щільного поживного середовища, розлитого в чашки Петрі. У нижньому шарі використовували "голодні" не засіяні середовища (агар-агар, воду, солі). Нижній шар являє собою підкладку висотою 10 мм, на яку строго горизонтально встановлювали 3-6 тонкостінних циліндри із нержавіючої сталі діаметром 8 мм і висотою 10 мм. Навколо циліндрів заливали верхній шар, що складається з живильного агаризованого середовища, розплавленого і охолодженого до 40 °C, в яку вносили відповідний стандарт добової культури тест-мікроба. Попередньо, верхній шар добре перемішували до утворення однорідної маси. Після застигання циліндри стерильним пінцетом витягували, і у лунки, що утворилися, поміщали випробувану речовину з урахуванням його об'єму (0,3 мл).

Об'єм середовища для верхнього шару коливався від 14 до 16 мл. Чашки підсушували протягом 30-40 хв. при кімнатній температурі і ставили в термостат на 18-24 години.

Дані результатів дослідження антибактеріальної активності досліджуваних зразків представлені в таблиці 1.

Як показують дані таблиці 1, усі зразки проявляли антибактеріальні властивості відносно мікроорганізмів роду *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 і *Basillus subtilis* ATCC 6633, та слабку активність щодо мікроорганізмів роду *Candida albicans* ATCC 653/885.

Для проведення випробувань препарату на мікробіологічну чистоту використовували тіогліколеве напіврідке середовище, рідке середовище Сабуро, тверді поживні середовища: живильний агар, середовище Сабуро і по можливості, середовище Чистовича, кров'яний агар на основі живильного агару, середовище Ендо.

Таблиця 1

Антибактеріальна активність досліджуваних зразків

Мікроорганізми	Діаметри зон затримки росту у мм, число повторів дослідів n=3			
	Зразок 1	Зразок 2	Зразок 3	Зразок 4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15, 16, 15	16, 17, 16	16, 15, 15	15, 16, 16
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15, 14, 14	13, 14, 14	13, 13, 14	13, 15, 14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	ріст	ріст	ріст	ріст
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	ріст	ріст	ріст	ріст
<i>Basillus subtilis</i> ATCC 6633	17, 17, 16	16, 15, 16	15, 15, 16	14, 15, 16
<i>Candida albicans</i> ATCC 653/885	12, 13, 13	13, 13, 13	14, 13, 14	13, 14, 13

Середовища готували відповідно до вимог виробника (кількість порошку на літр, pH середовища, умови автоклавування та ін.). Кожна серія середовища (Дагестанський НВО "Живильні середовища", термін придатності середовища до XI 2014 р), яка використовувалася в експерименті, перевірялася на ростові якості відповідно до нормативних документів.

- 5 Перед проведенням дослідження на мікробіологічну чистоту проводили випробування на відповідність ростових властивостей живильних середовищ. Живильні середовища інокували невеликою кількістю відповідними тест-штамами мікроорганізмів (10^2 - 10^3) колонієутворюючих одиниць на мл середовища – КУО/мл). На середовище Сабуро засівали дріжджоподібні гриби роду *Candida*. На живильний агар – *Pseudomonas aeruginosa* і *Bacillus subtilis*, на Чистовича – *Staphylococcus aureus*, на середовище Ендо – *Escherichia coli*. Тіогліколеве середовище витримували в термостаті при температурі 35 °С три доби. Дані представлені в таблиці 2.

Таблица 2

Ростові властивості поживних середовищ

Тест-штами	Поживні середовища	Умови культивування		Висновок
		Температура	Тривалість культивування	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Чистовича	35 °С,	24-72 години	Морфологія колоній та клітин є типовою
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Ендо	35 °С,	24-72 години	Морфологія колоній та клітин є типовою
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Поживне середовище	35 °С,	24-72 години	Морфологія колоній та клітин є типовою
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Поживне середовище	35 °С,	24-72 години	Морфологія колоній та клітин є типовою
<i>Candida albicans</i> ATCC 885/653	Середовище Сабуро	25 °С,	24-120 години	Морфологія колоній та клітин є типовою
X	Тіогліколеве середовище для контролю стерильності	35 °С,	24-72 години	Ріст мікроорганізмів відсутній

Примітка: X – мікроорганізми не засіювали

- 15 Дані таблиці 2 вказують на те, що усі культури мікроорганізмів відповідали таксономічному позначенню штаму, а морфологія колоній при культивуванні на середовищах і морфологія клітин при мікроскопії була типовою. Тіогліколеве середовище відповідало вимогам на стерильність – зростання мікроорганізмів було відсутнім, середовище залишалось прозорим.

- 20 Випробування на мікробіологічну чистоту проводили методом прямого посіву на рідкі поживні середовища. Розливали в стерильні пробірки тіогліколеве середовище і рідке середовище Сабуро по 10,0 мл. У кожен з пробірок вносили по 1 мл (1 г) випробуваного препарату. Посіви інкубували протягом 14 днів на тіогліколеве середовище в термостаті при температурі 35 °С, посіви на рідкому середовищі Сабуро при температурі 25 °С. Нейтралізацію антибактеріальних властивостей досліджуваних зразків проводили інактиватором, який включає полісорбат-80 (30 г/л) і лецитин (3 г/л). Дані представлені в таблиці 3.

25

Таблица 3

Випробування тест-зразків на мікробіологічну чистоту

Зразки	Середовища та умови культивування	
	Тіогліколеве середовище 14 днів при 35 °С	Рідке середовище Сабуро 14 днів при 25 °С
1	Ріст мікроорганізмів	Ріст грибів відсутній
2	Ріст мікроорганізмів	Ріст грибів відсутній
3	Ріст мікроорганізмів	Ріст грибів відсутній
4	Ріст мікроорганізмів	Ріст грибів відсутній

Як показують дані таблиці 3, після 14 днів інкубації при культивуванні на середовищі Сабуро ріст грибів був відсутнім. На тіогліколевому середовищі при культивуванні зразків препарату реєструвалось зростання мікроорганізмів. Мікроскопія показала наявність грампозитивної спорової палички. Підтвердження було отримано шляхом посіву на диференціальні, поживні середовища. Дані представлені в таблиці 4.

Як показують дані таблиці 4, за морфологією колоній та деякими біологічними властивостями, виділені мікроорганізми належать до роду *Bacillus Subtilis*. На диференціальних середовищах (середовищі Чистовича і середовищі Ендо) за виділенням представників кишкової групи і патогенних стафілококків росту серед інших видів мікроорганізмів не спостерігалось.

При дослідженні методом глибокого посіву, який полягав у тому, що препарат додавали у кількості 1,0 г в агар і до поверхневого посіву (1 г) ГС – на агар визначали кількість життєздатних клітин мікроорганізмів і грибів. Дослідження глибокого і поверхневого посіву препарату на чашках Сабуро показали відсутність росту грибів. При культивуванні на живильному агарі був відзначений ріст мікроорганізмів.

Таблиця 4

Ідентифікація мікроорганізмів, що вирости на тіогліколевому середовищі

Зразки	Ріст мікроорганізмів на поживних середовищах				
	Чистовича	Ендо	Кров'яний агар	Сабуро	Поживний агар
1	X	X	Сухі сірі колонії, з нерівними краями шорсткі, не блискучі, гемоліз	X	Сухі сірі колонії, з нерівними краями шорсткі, не блискучі
2	X	X	Сухі сірі колонії, з нерівними краями шорсткі, не блискучі, гемоліз	X	Сухі сірі колонії, з нерівними краями шорсткі, не блискучі
3	X	X	Сухі сірі колонії, з нерівними краями шорсткі, не блискучі, гемоліз		Сухі сірі колонії, з нерівними краями шорсткі, не блискучі
4	X	X	Сухі сірі колонії, з нерівними краями шорсткі, не блискучі, гемоліз		Сухі сірі колонії, з нерівними краями шорсткі, не блискучі

Примітка: X - ріст мікроорганізмів відсутній.

Дані результатів досліджень представлені в табл. 5.

Таблиця 5

Дослідження на мікробіологічну чистоту

Зразки	Кількість мікроорганізмів за десятичним логарифмом ступеня росту при культивуванні на твердих поживних середовищах			
	Метод глибокого посіву 1 г препарату ($\times 10$)		Метод поверхневого посіву 1 г препарату ($\times 10$)	
	Поживний агар 35 °C 3 діб	Сабуро 25 °C п'ять діб	Поживний агар 35 °C 3 діб	Сабуро 25 °C п'ять діб
1	1,7 \pm 0,4	Ріст грибів відсутній	1,9 \pm 0,8	Ріст грибів відсутній
2	1,8 \pm 0,7	Ріст грибів відсутній	1,7 \pm 0,5	Ріст грибів відсутній
3	1,5 \pm 0,4	Ріст грибів відсутній	1,6 \pm 0,4	Ріст грибів відсутній
4	1,7 \pm 0,7	Ріст грибів відсутній	1,8 \pm 0,7	Ріст грибів відсутній

Як показують дані таблиці 5, ріст грибів був відсутнім при дослідженні усіх 4-х зразків. Кількість мікроорганізмів, що виростили на 1 г препарату не перевищувала 10^3 КУО/мл, що відповідає вимогам Державної фармакопеї України.

5

Таблиця 6

Ефективність водної витяжки прополісу (водна витяжка)

Експозиція	Вимоги ДФУ		Число мікроорганізмів			
	Число бактерій КУО/мл Lg зменшення	Число грибів КУО/мл Lg зменшення	Staphylococcus aureus ATCC 6538	Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	Candida albicans ATCC 885/653	Aspergillus niger A TCC 16404
Мікробне навантаження	10^6	10^6	$3,5 \times 10^5$ (5,54)	$4,5 \times 10^5$ (5,66)	$2,2 \times 10^5$ (5,34)	$2,5 \times 10^5$ (5,39)
Первинний посів Lg	-	-	$5,3 \times 10^4$ (0,82)	$5,2 \times 10^4$ (0,95)	$4,9 \times 10^4$ (0,65)	$5,1 \times 10^4$ (0,69)
6 годин	2	-	$3,1 \times 10^3$ (2,05)	$2,3 \times 10^3$ (2,3)	$1,5 \times 10^3$ (1,17)	$1,2 \times 10^4$ (1,31)
24 години	3	-	$0,7 \times 10^2$ (3,7)	$1,8 \times 10^2$ (3,41)	$2,4 \times 10^2$ (2,96)	$1,5 \times 10^3$ (2,22)
7 діб			НВ	$0,2 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$0,3 \times 10^2$
14 діб	-	2	НВ	НВ	$0,4 \times 10^2$ (3,74)	$0,3 \times 10^2$ (3,95)
28 діб	НЗ	НУ	НВ	НВ	НВ	НВ

*НУ – мікроорганізми не збільшуються;

*НВ – мікроорганізми або гриби не виділяються.

Критерієм оцінки антибактеріальної ефективності консервантів було зменшення числа життєздатних колоній клітин мікроорганізмів за певний період після контамінації.

У відповідності з вимогами ДФУ в препаратах – для місцевого застосування логарифм зменшення числа життєздатних колоній бактерій через 6 годин повинен становити не менше 2-х, через 24 години – не менше 3-х, у подальшому число життєздатних клітин бактерій не повинно збільшуватися. Логарифми зменшення числа життєздатних клітин грибів за 7 діб має становити не менше 2-х. Ці показники відповідають критерію "А".

Відповідно до критерію "В" в препаратах для внутрішньом'язового застосування логарифм кількості життєздатних колоній за 24 доби повинен становити не менше 1-го, в подальшому число життєздатних колоній не повинен збільшуватися. Логарифм зменшення числа життєздатних грибів за 14 діб повинен становити не менше 1 і в подальшому не збільшуватися.

Після контамінації мікроорганізмами препарат через певні проміжки часу висівали на агар для визначення числа життєздатних клітин. Відсутність зростання на агарі або не збільшення кількості колоній після 14 днів інкубації вказували на те, що препарат відповідає вимогам ДФУ.

Наявність життєздатних клітин мікроорганізмів і грибів на 14 добу дослідження вказують, що препарат не відповідає критеріям "А" або "В" і не відповідає вимогам ДФУ.

Як показують дані таблиці 6, після 14-ї доби культивування логарифм числа життєздатних клітин грибів становив 3,74 і 3,95. Клітини Candida albicans ATCC 885/653 і Aspergillus niger ATCC 16404 не виділяються після 28-ї доби культивування. Після 2-х діб культивування логарифм числа колоній мікроорганізмів становив для Staphylococcus aureus ATCC 6538 – 2,05 і Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 – 2,3. На 7-у добу відповідно 3,7 і 3,41. На 14-ту і 28-ту добу інкубації мікроорганізми не реєструвалися. Дослідження даного зразка показали, що він відповідає критерію "А" згідно з вимогами ДФУ.

Приклад 2. Вивчення гострої токсичності очних крапель на мишах

Гостру токсичність тест-зразка (ТЗ) – очних крапель "Прополіс", вивчали при нашкірному нанесенні та внутрішньоочеревинному введенні. Перед введенням ТЗ мишей позбавляли корму на 4 год.

Очні краплі вводили у максимальній дозі VI класу токсичності: внутрішньоочеревинно – у дозі 3,1 мл/кг, при нанесенні на шкіру – у дозі 22,6 мл/кг. Доступ тварин до води був вільним, до їжі їх

допускали лише через 2 години після введення ТЗ. Перед нанесенням ТЗ на шкіру у тварин вистригали ножицями шерсть площею 2×3 см.

За тваринами спостерігали протягом 2 тижнів, що дає можливість оцінити токсичну дію речовини на організм експериментальних тварин, як безпосередньо після введення, так й визначити віддалені наслідки передозування.

Оцінювали загальний стан тварин (зовнішній вигляд, дихання, слиновиділення, процеси сечовипускання та дефекації). Досліджували динаміку маси тіла, яку визначали на 0 добу (вихідні дані), 3, 7 і 14 добу спостереження.

По закінченні тварин виводили з експерименту, проводили макроскопічний огляд внутрішніх органів тварин, зважували їх та розраховували коефіцієнти маси органів (КМ).

Як показали проведені дослідження за внутрішньоочеревинного введення ТЗ у дозі 3,1 мл/кг та нашкірного нанесення у дозі 22,6 мл/кг ознак інтоксикації у піддослідних тварин не спостерігали (табл. 7). Тварини всіх експериментальних груп були активними, охайними, мали задовільний апетит, нормально реагували на звукові та світлові подразники, процеси сечовиділення і дефекації були у нормі, порушення дихання та судом не спостерігали.

Таблиця 7

Летальність мишей при одноразовому застосуванні досліджуваних речовин, n=6

Групи тварин	Доза, мл/кг	Шлях введення	кількість загиблих тварин/загальна кількість тварин у групі
негативний контроль	-	—	—
Очні краплі	3,1	Внутрішньоочеревинний	0/6
Очні краплі	22,6	нашкірний	0/6

Примітка. n – кількість тварин у кожній групі.

У всіх дослідних тварин шерстний покрив був у нормі. До води та їжі підходили охоче. За фізіологічним станом дослідні тварини не відрізнялися від контрольних. Слизова оболонка ротової порожнини, язик звичайного вигляду. Слизова оболонка природних отворів нормального кольору, виділення відсутні. Регіональні лімфовузли не збільшені. Летальні випадки були відсутні.

Результати визначення динаміки маси тіла тварин наведені в таблиці 8. Дані наведені у таблиці 8 свідчать, що в усіх дослідних групах, яким вводили або наносили ТЗ, відбувався позитивний приріст маси тіла. Цей показник не виходив за межі значень групи тварин НК.

Таблиця 8

Вплив ТЗ на динаміку маси тіла (г) мишей, n=6 ($M \pm m$)

Групи тварин	Шлях введення	Вихідні дані	3 доба	7 доба	14 доба
негативний контроль	—	22,99±0,76	24,27±1,29	25,55±2,54	26,19±2,60
Очні краплі	внутрішньоочеревинний	23,38±1,14	24,62±1,09	25,85±1,73	26,25±1,67
Очні краплі	нашкірний	23,49±0,75	25,55±0,87	27,61±1,78	28,26±1,85

Примітка. n – кількість тварин у кожній групі.

По закінченні терміну спостереження, на 15 добу проводили розтин тварин, яким вводили ТЗ внутрішньоочеревинно. Макроскопічне дослідження при розтині показало, що однократне введення досліджуваного зразка у надмірній дозі не викликало видимих змін органів.

Внутрішні органи грудної порожнини були без видимих ознак патологічних змін: серце звичайної конфігурації та нормального розміру, легені блідо-рожеві, без спайок між листками плеври, заповнювали всю плевральну порожнину. Загрудинні лімфовузли не збільшені.

В очеревинній порожнині розміщення органів анатомічно правильне, стороннього вмісту не знайдено. Печінка рівномірно червоно-коричневого кольору, капсула не напружена, бічний край часток не заокруглено. Підшлункова залоза блідо-рожево-жовтого кольору, схожа на жирову тканину, без ознак склерозу, жирових некрозів. Селезінка пружна, повнокровна, червоно-

вишневого кольору. Капсула нирок легко знімається, на розрізі органу простежуються щільні, зі збереженням рисунку шари. Наднирники без особливостей. Заочеревинні лімфовузли не збільшені. Слизова оболонка залозистого відділу шлунка з характерним рельєфом складок, нормального кольору, без геморагій, набряку та ерозивних ушкоджень.

5

Таблиця 9

Вплив ТЗ на КМ внутрішніх органів (%) мишей самок, яким внутрішньоочеревинно вводили ТЗ у дозі 3,1 мл/кг, n=6, M (Min?Max)

Групи тварин	Коефіцієнти маси внутрішніх органів, %					
	печінки	нирок	серця	легенів	селезінки	тимусу
негативний контроль	4,85 (4,80; 4,89)	1,50 (1,21; 1,75)	0,56 (0,48; 0,72)	1,47 (0,85; 1,86)	0,55 (0,39; 0,78)	0,47 (0,26; 0,59)
Очні краплі	4,75 (4,47; 5,19)	1,39 (1,22; 1,87)	0,52 (0,49; 0,60)	1,43 (0,99; 1,73)	0,56 (0,41; 0,73)	0,50 (0,48; 0,51)

Примітка. n – кількість тварин у кожній групі.

Результати розрахунку коефіцієнтів маси внутрішніх органів наведені у таблиці 9. Відповідно до отриманих даних, за внутрішньоочеревинного введення ТЗ коефіцієнти маси внутрішніх органів статистично значуще не відрізнялися від значень тварин з групи інтактного контролю, що свідчить про відсутність токсичного впливу досліджуваного ТЗ на загальнотрофічні процеси організму дослідних мишей.

10

Отже, одержані результати показали, що нашірне нанесення та внутрішньоочеревинне введення досліджуваного ТЗ у надмірних дозах не призводить до загибелі тварин. Отже, відповідно до класифікації речовин за токсичністю очні краплі належать до VI класу токсичності – відносно нешкідливі речовини (табл. 10).

15

Таблиця 10

Ступінь токсичності очних крапель

Групи тварин	Шлях введення	Вид/стать тварин	ЛД ₅₀ , мл/кг	Клас токсичності
Очні краплі	Внутрішньоочеревинний	Миші-самки	3,1	Відносно нешкідливі речовини
	нашірний		22,6	

Приклад 3. Дослідження місцевоподразнювальної дії очних крапель при одноразовому нанесенні

20

Дослідження гострої подразнювальної дії досліджуваних крапель на очі проводили на безпородних білих кролях самцях та самицях з масою тіла 2,0-2,5 кг. Загалом було використано 6 тварин. за одну годину до початку інсталяції досліджуваної речовини проводили огляд обох очей дослідних тварин. Досліджувану речовину закапували в око в об'ємі 0,01 мл прямо на оболонку ока тварини. Очі трьох тварин після інсталяції досліджуваного засобу не промивалися, у інших 3 кролів через 20 сек. після інсталяції очі зрошувалися протягом 1 хвилини водою кімнатної температури.

25

Спостереження за станом очей тварин проводили одразу після інсталяції та через 1, 24, 48 та 72 години. У процесі дослідження реєстрували стан ділянки навколо очей, повіки, кон'юнктиву, рогову та райдужну оболонки кожної тварини у вищенаведені терміни. Ступінь виявлених реакцій оцінювали згідно зі шкалою. Інше око кожної тварини слугувало власним контролем.

30

Як показало проведене дослідження, інсталяція очних крапель на око кролів не призводить до місцевоподразнювальної дії. Проте, одразу після інсталяції у тварин спостерігали занепокоєння, прояви дискомфорту, легке почервоніння слизової оболонки ока (спостерігали гіперемію у деяких кров'яних судинах), які швидко зникали (табл. 11). Надмірного збудження, що може вказувати на викликане досліджуваним засобом подразнення, не спостерігали.

35

Таблиця 11

Реакція рогової та райдужної оболонки ока кролів на одноразову інсталяцію ТЗ, бали

Групи тварин	Термін дослідження				
	0 год.	1 год.	24 год.	48 год.	72 год.
Очні краплі	0	0	0	0	0
Очні краплі (зрошування)	0	0	0	0	0

У подальші терміни спостереження ознаки подразнювальної дії очних крапель були відсутні: деталі райдужної оболонки чітко видимі, хемоз, почервоніння слизової оболонки ока та виділення відсутні (табл. 12).

Таблиця 12

Реакція слизової оболонки ока кролів на одноразову інсталяцію ТЗ, бали

Групи тварин	Термін дослідження				
	0 год.	1 год.	24 год.	48 год.	72 год.
Очні краплі	1	0	0	0	0
Очні краплі (зрошування)	0	0	0	0	0

Таким чином, результати проведеного дослідження свідчать про відсутність у очних краплях місцевопідразнювальної дії.

Приклад 4. Дослідження протизапальної дії очних крапель на моделі гострого термічного запалення у мишей

Для визначення протизапальної активності крапель застосовували зручну та легковідтворювальну модель гострого термічного запалення у мишей. Досліди проведені на 18 мишах самцях, масою 18-22 г. Гостре термічне запалення викликали зануренням лапи тварини у гарячу воду (температура 66,5 °C) на 4 сек. Досліджуваний ТЗ наносили на пошкоджену лапу одразу після опіку у дозі 0,2 мл./тварину. Дозу ТЗ підбирали емпіричним шляхом таким чином, щоб забезпечити оптимальне зрошування лапи тварини. Через 3 години нанесення ТЗ повторювали. На другу добу тварин виводили з експерименту передозуванням інгальційного 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):

$$\frac{ПЗА \cdot D_d - D_k}{D_k} \quad (1)$$

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

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

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили методами варіаційної статистики. Дані представляли у вигляді середнього та мінімального та максимального значень (M (min; max)). Відмінності між групами вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Під час експерименту всі 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).

Відповідно до отриманих даних через 24 години після моделювання гострого термічного запалення маса лапи мишей з групи позитивного контролю збільшувалася на 45 мг, що

свідчило про розвиток виразного набряку лапи. Дворазове нанесення крапель та ПП "Пантенолу" сприяло зниженню маси лапи мишей у 2,3 та 1,8 разу відповідно (табл. 13). Отримані дані свідчать про виразну протизапальну дію досліджуваних засобів, активність яких склала 57 % та 45 % відповідно.

5

Таблиця 13

Результати визначення протизапальної активності очних крапель на моделі гострого термічного запалення у мишей, n=6

Група тварин	Різниця між лапами, мг	ПЗА, %
Позитивний контроль	44,8 (36; 68)	
Очні краплі	19,3 (8; 26)*	57 (42; 82)*
Пантенол	24,7 (14; 36)*	45 (20; 69)*

Примітки:

* – при порівнянні з групою позитивного контролю (критерій Манна-Уїтні);

n – кількість тварин у кожній групі

Отже, на моделі гострого термічного запалення у мишей очні краплі чинять протизапальну активність співставлену з такої відомого засобу протизапальної та протиопікової дії – препарату "Пантенол".

10 Очні краплі забезпечують протизапальну, антисептичну дію і сприяють ніжному рубцюванню тканин рогівки ока.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

15 1. Очні краплі, що містять природний прополіс, які **відрізняються** тим, що як природний прополіс містять водний витяг прополісу та додатково містять полівінілпіролідон, поліетиленгліколь-300 (Макрогол-300) та пропіленгліколь, воду для ін'єкцій, при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

водний витяг прополісу 0,1-0,7

полівінілпіролідон 0,3-1,0

поліетиленгліколь-300 (Макрогол-300) 0,2-1,0

пропіленгліколь 0,2-1,0

вода для ін'єкцій решта.

20 2. Очні краплі за п. 1, які **відрізняються** тим, що водний витяг прополісу використовують у співвідношенні сировини до екстрагенту 1:10.

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601