<http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2618-8783-2018-3-2-29-33>

УДК 615. 668. 584

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРОФОБНОЙ МЯГКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ С КОЛЛАГЕНАЗОЙ

Локарев¹ А.В., Огай² М.А.

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, пос. Биокомбината, Российская Федерация

²Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ, г. Пятигорск, Российская Федерация

Аннотация. Коллагеназа обладает протеолитической активностью (расщепляет белки). Влияя преимущественно на коллагеновые волокна, способствует расплавлению струпов (затвердевшего слоя свернувшейся крови и омертвевших тканей, прикрывающего дефект кожи) и некротических (омертвевших) тканей.

Протеолитические ферменты используются в медицине и ветеринарии для лечения ран с большим содержанием некротических тканей, которые плохо удаляются в процессе традиционной обработки. Показания для применения лекарственных препаратов ферментов разнообразны: обморожения, ожоги, трофические язвы, раны с массивным гнойно-некротическим отделяемым, рубцы [1]. Непосредственное введение нативных протеолитических ферментов в виде порошков-присыпок или пропитанных растворами фермента салфеток в рану приводит к их быстрой инактивации, делая энзимотерапию малоэффективной, в то время как желательна длительная воздействие в очаге поражения. Наиболее перспективными и более эффективными являются мягкие наружные лекарственные формы протеолитических ферментов: мази, гели, кремы [2].

Липофильные основы наружных лекарственных форм протеолитических ферментов, имеют преимущество перед гидрофильными, т.к. не содержат водной фазы, являющейся благоприятной средой для аутолиза ферментов, вследствие чего сохраняют ферментативные свойства препарата длительное время и оказывают смягчающее действие [3].

Но отмечаются и недостатки у мазей на жировой основе: плохое высвобождение лекарственной субстанции, нарушение оттока раневого содержимого и герметизация раны, плохие потребительские свойства (основы плохо распределяются по поверхности, плохо смываются водой и могут пачкать белье и одежду пациента), ограничения для введения в раневую очаг [4]. Поэтому, поиск новых комбинаций, содержащих ферменты на гидрофобной усовершенствованной основе – задача актуальная.

Ключевые слова: коллагеназа, энзимотерапия, ферменты, мази, гели, кремы.

Целью настоящего исследования являлась разработка наружной лекарственной формы коллагеназы с использованием мазевой основы липофильного характера с улучшенной биодоступностью и приемлемыми потребительскими свойствами.

В качестве носителей для разрабатываемой мази изучали олеогель и аэросил, а также гидрофильную основу – карбопол.

Для получения олеогеля было необходимым выбрать оптимальную концентрацию аэросила для загущения. Образец с содержанием аэросила 3% в оливковом масле представляет собой абсолютно прозрачную гомогенную систему с низкой вязкостью, подвергается синерезису, разделившись на два слоя: нижний — мутный (чуть более вязкий), составивший около 70% объема, и верхний - абсолютно прозрачный и практически жидкий как оливковое масло. Концентрация аэросила до 5% недостаточна для получения упруго-пластичной системы с оливковым маслом. Наиболее приемлемым для получения олеогелей для наружного применения нами выбрано 6%-е содержание аэросила [5].

В качестве гидрофильной основы выбрали гель на основе карбопола. Карбопол (Carbopol) - карбоксиполиметилена, по международной классификации - Карбомер (Carbomer). Это полимерный загуститель. Взаимодействие с водой приводит к гидратации молекулы, сетка растягивается и увеличивается в размерах (рН=3-4). Сетка занимает максимальный объем, связывая и загущая гидрофильный растворитель и растворы, позволяет создать привлекательный прозрачный продукт, сохранить прозрачность гелей, при введении в их состав различных компонентов.

Выбор основы-носителя для коллагеназы был основан на биофармацевтическом анализе. Для определения степени и скорости высвобождения ЛВ из мягких лекарственных форм выбран метод диффузии в агар. Изучали их диффузию из каждого носителя в агаровый гель по следующей методике: в 100 мл 2% агарового раствора разливали в чашки Петри и оставляли для застывания при комнатной температуре на 30 минут. В сформировавшемся геле металлическим цилиндром ($d=6$ мм) вырезали лунки, в которые помещали 0,3 г мази. Готовую систему оставляли на 24 часа в термостате при температуре 37°C. Через 24 часа после внесения точной навески мази оценивали степень растворения агара вокруг лунки. По данным средних значений растворения строили диаграммы степени высвобождения коллагеназы из мазей, приготовленных на различных основах, представленных на рисунке 1.

Гель на основе карбопола   Гель на олеогеля

Рис. 1. Диаграмма степени высвобождения коллагеназы из мази

В результате было установлено, что наибольшую степень высвобождения коллагеназы обеспечивает мазевая композиция № 2. Кроме того, она более плотная, так как коллагеназа не растворима в маслах и распределяется в олеогеле по типу суспензии, не разжижая ее, не растекается и в условиях комнатной температуры, не теряет своей формы. Данные технологические особенности могут позволить более длительное пребывание лекарственной формы на определенном пораженном участке, что очень важно для длительного контакта и проявления фармакологического эффекта. Таким образом, для дальнейших исследований был выбран – олеогель.

Следующим этапом наших исследований было определение оптимальной концентрации коллагеназы в выбранной основе. Определение проводили методом диффузии в агаровый гель. Готовили мази с разной концентрацией коллагеназы - 1, 2, 5%. Определяли с помощью миллиметровой бумаги размеры белесых зон, разрушения агара под действием протеолитической активности коллагеназы. Наиболее оптимальная концентрация составляет 2% с коллагеназой поскольку мазь с концентрацией 1% дает минимальную степень высвобождения, а мазь с концентрацией 5% дает практически одинаковую степень высвобождения с 2%.

Таким образом, оптимальной концентрацией является 2% мазь.

Указанная композиция представляет собой высоковязкий прозрачный гидрофобный гель нейтральной реакцией со своеобразным специфическим запахом. Обладает высокой химической стабильностью, не расслаивается, а также не прогоркает при длительном хранении.

Исследуемая мазь обладает вязко-пластичными и тиксотропными свойствами. Наличие тиксотропных свойств характеризует при производстве и использовании хорошую намазываемость и способность к выдавливанию из туб. Способность к восстановлению структуры после снятия механического воздействия, залог хорошей экструзии из туб, стабильности лекарственной формы при хранении.

Таким образом, была сконструирована мазь с коллагеназой на основе аэросила и оливкового масла.

С целью подтверждения того, что при производстве мази, не произошло разрушение коллагеназы, провели количественный анализ на её содержание по методу Бредфорда. Для этого провели диализ через полупроницаемую мембрану *in vitro* с применением в качестве полупроницаемой мембраны диализной плёнки. Навеску мази с коллагеназой в количестве 1,0 г наносили на диализную плёнку и помещали в 50,0 мл диализной среды. Диализная среда – вода очищенная. Диализ проводили в термостате при температуре $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Отбор проб по 3,0 мл осуществляли через 15 минут; 30 минут; 1; 2; 2,5 и 3 часа.

Метод основан на специфической сорбции белками в кислой среде красителя Кумасси бриллиантового синего G-250. Сорбция происходит в результате гидрофобных взаимодействий, а также связывания с сульфгидрильными и аминокетильными группами белков. В результате этого исходная коричневая окраска Кумасси бриллиантового синего G-250 в кислоте - максимум поглощения 465 нм, переходит в синюю - максимум поглощения 595 нм.

Данный метод подтвердил наличие в диализате коллагензы.

Таким образом, нами сконструирована мазь с коллагеназой на основе гидрофобных компонентов – олеогеля с аэросилом. Оптимальной концентрацией аэросила для загущения оливкового масла оказалась концентрация – 6%. Данная мазь обладает вязко-пластичными и тиксотропными свойствами. Сохраняет свои свойства в течение всего срока хранения и содержит необходимую концентрацию коллагеназы.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Климова О.А. Препараты коллагенолитических протеаз беспозвоночных: биохимические аспекты медицинского и косметологического применения / О.А. Климова, В.Ю. Чеботарев // Бюл. эксперим. биол. и медицины. – 2000. – Т.130, № 7. – С. 70-75.
2. Верниковский В.В. Биотехнологическая разработка некролитической мази и ее исследования: дис. ... канд. биол. наук. – Пятигорск, 2007. – 143 с.
3. Иванкова Ю.О. Перспективы технологических исследований мягких лекарственных форм и косметических средств с протеолитическими ферментами / Ю.О.Иванкова, С.Б. Евсеева // Mat. of the XII International scientific and practical conference «Areas of scientific thought» December 30, 2014. – January 7, 2015 – Sheffield: Science and education LTD, 2014/2015. – Vol. 20. – 104 с.
4. Перцев И.М. Фармацевтические и медико-биологические аспекты лекарств в двух томах / И.М.Перцев, И.А. Зупанец, Л.Д. Шевченко. - Харьков.: Изд-во НФАУ, 1999. – 448 с.
5. Лабзиуи З. Разработка и изучение олеогеля масла арганы / Лабзиуи З., Суслина С.Н. // Вестник РУДН Серия Медицина - 2013.- №2, С15-19.

DEVELOPMENT AND RESEARCH OF HYDROPHOBIC MILD DOSAGE FORM WITH COLLAGENASE

Lokarev¹ A.V., Ogai² M.A.

¹All-Russian research and technological Institute of biological industry, Biocombine, Russian Federation

²Pyatigorsk medical pharmaceutical institute of Volgograd state medical university, Pyatigorsk, Russian Federation

Annotation. Collagenase has proteolytic activity (breaks down proteins). Affecting mainly collagen fibers, promotes melting of scabs (hardened layer of coagulated blood and dead tissue covering the skin defect) and necrotic (dead) tissues.

Proteolytic enzymes are used in medicine and veterinary medicine to treat wounds with a high content of necrotic tissue that are poorly removed during traditional treatment. Indications for the use of enzyme drugs are varied: frostbite, burns, trophic ulcers, wounds with massive purulent-necrotic discharge, scars [1]. The direct introduction of native proteolytic enzymes in the form of powder powders or impregnated with solutions of the enzyme napkins in the wound leads to their rapid inactivation, making enzyme therapy ineffective, while it is desirable to long-term exposure in the lesion. The most promising and more effective are mild external dosage forms of proteolytic enzymes: ointments, gels, creams [2].

Lipophilic bases of external dosage forms of proteolytic enzymes have an advantage over hydrophilic ones, since they do not contain an aqueous phase, which is a favorable environment for the autolysis of enzymes, as a result of which they retain the enzymatic properties of the drug for a long time and have a softening effect [3].

But there are also disadvantages in ointments on a fat basis: poor release of the drug substance, violation of the outflow of wound contents and sealing of the wound, poor consumption properties (the bases are poorly distributed on the surface, poorly washed with water and can stain the patient's underwear and clothes), restrictions for the

introduction into the wound focus [4]. Therefore, the search for new combinations containing enzymes on a hydrophobic improved basis is an urgent task.

Key words: collagenase, enzyme therapy, enzymes, ointments, gels, creams.

REFERENCES

1. Klimova O.A. Drugs collagenolytic proteases of invertebrates: biochemical aspects of medical and cosmetic applications / O.A. Klimov, V.Yu. Chebotarev // *bull. experiment. Biol. and medicine.* - 2000. - Vol. 130, № 7. - P. 70-75.
2. Vernikovskiy V.V. Biotechnological development of necrolytic ointment and its research: dis. ... kand. Biol. sciences'. - Pyatigorsk, 2007. - 143 p.
3. Ivankov Yu.O. Prospects for technological research of soft medicinal forms and cosmetic products with proteolytic enzymes / Y.O. Ivankov, S.B. Evseev // *Mat. of the XII International scientific and practical conference «Areas of scientific thought»* December 30, 2014. - January 7, 2015-Sheffield: Science and education LTD, 2014/2015. - Vol. 20. - 104 p.
4. Pertsev I.M. Pharmaceutical and medico-biological aspects of drugs in two volumes / I.M. Pertsev, L.D. Shevchenko. - Kharkov.: NFAU publishing house, 1999. - 448 p.
5. Labzioui 3. Development of isuchenie oleogel argan oil / Labzioui 3., Suslin S.N. // *Vestnik RUDN Series Medicine* - 2013.- №2, C15-19.