

УДК 615.454.2:581.135.5:001.891.5

Т. Г. Ярних, Ю. В. Левачкова, В. М. Чушенко

Національний фармацевтичний університет

БІОЛОГІЧНІ ВИПРОБУВАННЯ ПРЕПАРАТУ МЕЛАНІЗОЛ

Метою даного дослідження було проведення біологічних випробувань, а саме вивчення мікробіологічної чистоти препарату Меланізол у період напрацювання та в процесі зберігання. Експериментальні дослідження мікробіологічної чистоти проводили методом мембранної фільтрації відповідно до ДФУ. Крім цього, проведені мікробіологічні дослідження з вивчення ефективності антимікробних консервантів показали, що препарат не потребує введення антимікробних консервантів.

Ключові слова: метронідазол; чайного дерева олія; песарії; супозиторії; мікробіологічна чистота; консерванти

ВСТУП

Серед інфекційно-запальних захворювань жіночої репродуктивної сфери превалюють запальні процеси, етіологічним чинником яких виступають умовно-патогенні бактерії та гриби, що є складовою частиною нормальної мікрофлори [2, 8]. Порушення мікроекології піхви – бактеріальний вагіноз (БВ) є найбільш розповсюдженим станом у жінок репродуктивного віку.

Лікування БВ найчастіше передбачає відновлення нормальної мікрофлори піхви і усунення причини, що викликала дисбактеріоз (у випадках запальних та інфекційних захворювань) [10, 12, 16].

Найбільша ефективність у лікуванні БВ належить препаратам групи імідазолів та лінкозамінів, які мають виражені антианаеробні властивості [13]. Нітроімідазоли, серед яких препаратом вибору є метронідазол, чинять бактерицидний ефект відносно тих мікроорганізмів, ферментні системи яких здатні відновлювати нітрогрупу. Активні відновлені форми препаратів порушують реплікацію ДНК і синтез білка в мікроорганізмах, інгібують тканинне дихання. Разом з системною препаратом нітроімідазолу у вигляді розчинів для ін'єкцій, супозиторіїв, вагінальних таблеток і гелів надають виражену місцеву антибактеріальну дію, у зв'язку з чим вони широко застосовуються в гінекологічній практиці [13, 14, 15].

Проте на ринку України недостатньо комбінованих препаратів на основі метронідазолу. Для створення комбінованого препарату на основі синтетичної субстанції метронідазолу було обрано субстанцію природного походження, а саме чайного дерева олію.

Ефірна олія чайного дерева чинить антисептичну, протигрибкову, противірусну, протизапальну, регенеруючу та імуностимулюючу дію. Олія ефективно

пригнічує ріст таких бактерій, як стафілококи, пневмококи, гонококи, кишкова паличка і ряду інших, а також грибової флори [9].

Дезінфікуючі властивості вказаної олії використовують у вигляді екстемпоральних лікарських форм: розчинів для спринцювання та змащування, тампонів, вагінальних супозиторіїв.

Відомо, що мікроорганізми при тривалому контакті з ефірними оліями практично не виробляють до них стійкості, а застосування деяких ефірних масел з антибіотиками підвищує бактерицидну активність останніх в 4-10 разів [14].

Проведені дослідження з вивчення антибактеріальної активності метронідазолу з ефірною олією чайного дерева за даними мікробіологічного скринінгу дозволили встановити синергїдну дію між ними. А це, в свою чергу, дозволило знизити кількість метронідазолу у песаріях до 0,250 г, т. я. песарії виявляють таку ж антимікробну дію як і 0,500 г метронідазолу, який вже випускається фармацевтичною промисловістю [5].

Зважаючи на вищевикладене, на кафедрі технології ліків Національного фармацевтичного університету розроблений препарат у формі песаріїв, до складу якого входять метронідазол та олія чайного дерева під умовною назвою «Меланізол» [11]. При виробництві, пакуванні, зберіганні і розповсюдженні готової лікарської форми мають бути вжиті відповідні заходи для забезпечення її мікробіологічної чистоти [3, 4].

Песарії відносяться до лікарських засобів, які у процесі виробництва не стерилізують і які можуть бути контаміновані мікроорганізмами. Кількісний та видовий склад мікрофлори у песаріях може бути різний: стафілококи, кишкові бактерії, спорові палички, *Pseudomonas*, *Salmonella* та ін.

Одним із етапів стандартизації препарату є визначення його мікробіологічної чистоти. Випробу-

© Ярних Т. Г., Левачкова Ю. В., Чушенко В. М., 2014

Таблиця 1

**ВИЗНАЧЕННЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ЧИСТОТИ ПРЕПАРАТУ «МЕЛАНІЗОЛ»
МЕТОДОМ ПРЯМОГО ПОСІВУ НА ЧАШКАХ**

Зразки песаріїв	Кількість мікроорганізмів за десятичним логарифмом ступеня росту при культивуванні на твердих поживних середовищах			
	метод глибинного посіву		метод поверхневого посіву 1 г препарату	
	поживний агар 35 °С три доби	Сабуро 25 °С п'ять діб	поживний агар 35 °С три доби	Сабуро 25 °С п'ять діб
1	2,3 ± 0,7	Ріст грибів відсутній	1,5 ± 0,3	Ріст грибів відсутній
	2,2 ± 0,5	Ріст грибів відсутній	1,7 ± 0,5	Ріст грибів відсутній
	1,9 ± 0,6	Ріст грибів відсутній	1,9 ± 0,7	Ріст грибів відсутній
2	2,1 ± 0,8	Ріст грибів відсутній	2,2 ± 0,8	Ріст грибів відсутній
	1,8 ± 0,5	Ріст грибів відсутній	1,6 ± 0,4	Ріст грибів відсутній

вання мікробіологічної чистоти (МБЧ) нестерильних лікарських засобів насамперед призначене для того, щоб визначити, чи задовольняє препарат вимогам щодо мікробіологічної чистоти наведеним в ДФУ 1.0, 5.1.4 [3].

Метою даного дослідження було провести біологічні випробування, а саме вивчити мікробіологічну чистоту препарату «Меланізол» у період напрацювання та в процесі зберігання для встановлення терміну його придатності. Крім цього, провести дослідження з вивчення антимікробної активності препарату з метою визначення необхідності введення консервантів до його складу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для проведення мікробіологічних досліджень було розроблено зразки препарату у вигляді песаріїв, які містили метронідазол та чайного дерева олію у концентраціях 0,250 г та 0,100 г відповідно. Мікробіологічні дослідження песаріїв проводили на базі ДУ «Інститут мікробіології та імунології НАМН ім. І. І. Мечникова».

Визначення загального числа аеробних мікроорганізмів проводять методом мембранної фільтрації відповідно до ДФУ 1.4, 2.6.12 «Мікробіологічна чистота нестерильних лікарських засобів: визначення числа мікроорганізмів».

Для випробування на МБЧ використовували поживні середовища Махачкалінського заводу поживних середовищ з відповідним терміном придатності. Ростові властивості поживних середовищ перевіряли відповідно до ДФУ 1.4, 2.6.13. Всі культури мікроорганізмів відповідали таксономічному визначенню штаму, а морфологія колоній при культивуванні на середовищах та морфологія клітин при мікроскопії були типовими.

Крім цього, необхідно було перевірити препарат «Меланізол» на антимікробну активність, що б дозволило визначити необхідність введення до його складу антимікробних консервантів.

Відсутність або присутність введення до складу песаріїв консервантів необхідно обґрунтувати, ви-

користовуючи методику ефективності антимікробних консервантів, наведених у ДФУ 1.4, 5.1.3. Методика базується на введенні в дослідні зразки песаріїв певної кількості заражених тест-мікроорганізмів та визначенні їх через певні проміжки часу. Згідно з вимогами ДФУ використовували тест-штами *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 та *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 885/653, *Aspergillus* ATCC 16404 [1, 6, 7].

Критерієм оцінки ефективності антимікробних консервантів є зменшення числа життєздатних колонієутворюючих одиниць за певний період після контамінації. У відповідності до вимог ДФУ у препаратах для місцевого застосування логарифм зменшення числа життєздатних колоній бактерій через 2 доби повинен складати не менше двох, через 7 діб – не менше трьох, а в подальшому число життєздатних клітин бактерій не повинно збільшуватися. Логарифми зменшення життєздатних клітин грибів за 14 діб повинні складати не менше двох – все це відповідає вимогам ДФУ [3, 4].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Визначення мікробіологічної чистоти проводили методом прямого посіву на рідкі поживні середовища та методом глибинного та поверхневого висівання на чашки. Отримані нами результати представлені у табл. 1.

Як видно з табл. 1, проведені дослідження показали відсутність зростання грибів на зразках препарату. Кількість мікроорганізмів на 1 г препарату не перевищувала 10³ КОЕ/мл, що відповідає вимогам ДФУ.

Для встановлення мікробіологічної стабільності песаріїв у процесі зберігання протягом 27 міс. проводили аналіз на мікробіологічну чистоту. Результати аналізу препарату показали, що зростання числа життєздатних мікроорганізмів протягом двох років не відбувається.

Експериментальні дані по дослідженню антимікробної активності зразків песаріїв наведені в табл. 2.

Результати досліджень показали, що через 7 діб інкубування логарифм числа життєздатних клітин

Таблиця 2

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ ЗРАЗКІВ ПЕСАРІЇВ «МЕЛАНІЗОЛ»

Експозиція	Вимоги ДФУ		Логарифм числа мікроорганізмів (КУО/мл)			
	число бактерій КУО/мл Lg зменшення	число грибів КУО/мл Lg зменшення	Staphylococcus aureus ATCC 6538	Pseudomonas aeruginosae ATCC9027	Candida albicans ATCC 885/653	Aspergillus niger ATCC 16404
Мікробне навантаження	10 ⁶	10 ⁶	3,5 × 10 ⁻⁵ (5,54)	4,5 × 10 ⁻⁵ (5,66)	2,2 × 10 ⁻⁵ (5,34)	2,5 × 10 ⁻⁵ (5,39)
Первинний посів	–	–	5,3 × 10 ⁻⁴ (0,82)	5,2 × 10 ⁻⁴ (0,95)	4,9 × 10 ⁻⁴ (0,65)	5,1 × 10 ⁻⁴ (0,69)
2 доби	2	–	3,1 × 10 ⁻³ (2,05)	2,3 × 10 ⁻³ (2,3)	1,5 × 10 ⁻⁴ (1,17)	1,2 × 10 ⁻⁴ (1,31)
7 діб	3	–	0,7 × 10 ⁻² (3,7)	1,8 × 10 ⁻² (3,41)	2,4 × 10 ⁻² (2,96)	1,5 × 10 ⁻³ (2,22)
14 діб	–	2	НВ	НВ	0,4 × 10 ² (3,74)	0,3 × 10 ² (3,95)
28 діб	НУ	НУ	НВ	НВ	НВ	НВ

НУ – мікроорганізми не зростають; НВ – мікроорганізми або гриби не виділяються.

Candida albicans складає 2,96, а *Aspergillus niger* – 2,22, через 14 діб контамінації складають 3,74 та 3,95 відповідно. Клітини грибів не виділяються через 28 діб інкубування. Через дві доби інкубування логарифм числа життєздатних клітин мікроорганізмів був більше 2-х і складав 2,05 для *Staphylococcus aureus* та 2,3 для *Pseudomonas aeruginosa*. Через 7 діб контамінації логарифм життєздатних клітин складав для *Staphylococcus aureus* 3,7, для *Pseudomonas aeruginosa* цей показник складав 3,41. На 14 та 28 добу інкубування мікроорганізми не реєструвалися. Тобто дослідження даних зразків песаріїв показало, що життєздатних клітин грибів не знайдено. Загальна кількість життєздатних мікроорганізмів не перевищує допустиму межу – не більше 10³ бактерій і не більше 10² грибів уграмі препарату, а це відповідає критерію «А» відповідно до вимог ДФУ.

Результати досліджень показали, що загальне число життєздатних аеробних мікроорганізмів складає: ТАМС не більше 10² КУО /г; ТУМС не більше 10⁻¹ КУО/г. Відсутність *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г та відсутність *Staphylococcus aureus* в 1 г відповідно до ДФУ 1.0, 5.1. 4.

Таким чином, препарат «Меланізол» у період напрування та протягом 2 років задовольняє вимогам щодо мікробіологічної чистоти і не потребує введення до його складу антимікробних консервантів.

ВИСНОВКИ

1. Проведені дослідження з вивчення мікробіологічної чистоти нестерильного препарату Меланізол методом мембранної фільтрації в період напрування та в процесі зберігання показали, що препарат задовольняє вимогам ДФУ щодо мікробіологічної чистоти протягом двох років.
2. Результати дослідження антимікробної активності песаріїв Меланізол показали, що препарат

Меланізол не потребує введення до його складу антимікробних консервантів.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ
ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Бактеріологічний контроль поживних середовищ. Інформаційний лист МОЗ України № 05.4.1/1670. – К., 2001.
2. Головкин В. А. Лекарственные средства для наружной терапии воспалений мочеполовых органов / В. А. Головкин, А. В. Головкин, В. В. Головкин. – Запорожье, 2003. – С. 73-87.
3. Державна фармакопея України. – Доп. 1. / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2004. – 520 с.
4. Державна фармакопея України. – Доп. 4. / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 4-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2011. – 538 с.
5. Левачкова Ю. В. Експериментальне обґрунтування вибору діючих речовин песаріїв для застосування в гінекології / Ю. В. Левачкова // УБФЖ. – 2009. – № 5 (5). – С. 20-23.
6. Методичні вказівки «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів». – МОЗ України. – К., 2007. – № МВ 9.9.5-143-2007.
7. Методичні рекомендації «Вивчення специфічної активності антимікробних лікарських засобів». – К., 2004. – С. 38.
8. Новиков А. И. Инфекции, передаваемые половым путем и экзоцервикс / А. И. Новиков, А. В. Кононов, И. Г. Ваганов. – М.: Медицина, 2002. – 175 с.
9. Основы практической аромологии / Под ред. проф. А. Г. Башуры. – Х.: Вид-во «Прапор», 1999. – 160 с.

10. Современные вопросы инфектологии в акушерстве и гинекологии / Под ред. В. К. Чайки. – Донецк, 2000. – С. 5.
11. Ярних Т. Г. Вивчення структурно-механічних та осмотичних властивостей песаріїв із метронідазолом та олією чайного дерева / Т. Г. Ярних, Ю. В. Левачкова, В. М. Чушенко // Укр. журн. клін. та лабораторної медицини. – 2010. – Т. 5, № 3. – С. 24-26.
12. Boyel D. C. Is bacterial vaginosis with cervical intraepithelial neoplasia? / D. C. Boyel, S. E. Barton, S. Uthayarumar et al. // Int. J. Gynecol. Cancer. – 2003. – Vol. 2. – P. 159-161.
13. Inceboz T. Comparative in vitro cytotoxic effects of ornidazole, metronidazole and ciprofloxacin against *Trichomonas vaginalis* trophozoites / T. Inceboz, U. Inceboz, S. Ozturk // J. Chemother. – 2004. – Vol. 16. – P. 459-462.
14. Meri T. Resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole: report of the first three cases from Finland and optimization of in vitro susceptibility testing under various oxygen concentrations / T. Meri, T. S. Jokiranta, L. Suhonen et al. // J. Clin. Microbiol. – 2000. – Vol. 38. – P. 763-767.
15. Pennenoat G., Treatment of genital infections in gynecology / G. Pennenoat, M. L. Yoly-Guillou // Gynecol. Obstet Fertil. – 2002. – Vol. 30. – P. 744-746.
16. Sobel J. D. Suppressive antibacterial therapy with 0,75 % metronidazole vaginal gel to prevent recurrent bacterial vaginosis / J. D. Sobel, D. Ferris, J. Schwabke // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2006. – Vol. 194, № 4. – P. 283-289.

УДК 615.454.2:581.135.5:001.891.5**Т. Г. Ярних, Ю. В. Левачкова, В. Н. Чушенко****БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕПАРАТА МЕЛАНИЗОЛ**

Целью данного исследования было провести биологические испытания, а именно изучить микробиологическую чистоту препарата Меланизол во время наработки и в процессе хранения. Экспериментальные исследования микробиологической чистоты проводили методом мембранной фильтрации в соответствии с ГФУ. Кроме этого, проведенные микробиологические исследования по изучению эффективности антимикробных консервантов показали, что препарат не требует введения антимикробных консервантов.

Ключевые слова: метронидазол; чайного дерева масло; пессарии; микробиологическая чистота; консерванты

UDC 615.454.2:581.135.5:001.891.5**T. G. Yarnykh, Yu. V. Levachkova, V. M. Chushenko****BIOLOGICAL RESEARCH OF PREPARATION MELANISOL**

The aim of this research was to conduct biological tests, namely to study the microbiological cleanliness of preparation of Melanisol during preparing and in the process of storage. Experimental researches of microbiological cleanness conducted the method of membrane filtration in accordance with SPU. Except it, the conducted microbiological researches showed on the study of efficiency of antimicrobial preservatives, that preparation did not require introduction of antimicrobial preservatives.

Key words: metronidazole; tea tree oil; pessaries; microbiological cleanness; preservatives

Адреса для листування:

61146, м. Харків, вул. Блюхера, 4.

Тел. (050) 135-42-86.

E-mail: lejuva@mail.ru.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції

16.06.2014 р.