

УДК 616.926-008.87

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ КОМБІНОВАНИХ ПРЕПАРАТІВ НА КЛІНІЧНІ ШТАМИ МІКРООРГАНІЗМІВ, ВИДІЛЕНИХ ВІД ХВОРИХ З БАКТЕРІАЛЬНИМ ВАГІНІТОМ

Асланян М.А. *, Бобрицька Л.О*., Солонина Н. Л., Осолодченко Т. П., Кучма І. Ю.

*Національний Фармацевтичний університет МОЗ України, вул. Пушкінська 53, м. Харків, Україна
Державна Установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України». Вул. Пушкінська 14-16, м. Харків, 69057, Україна

Метою дослідження було розробити та вивчити комбінації з фламіном та мірамістином у складі комбінованих лікарських препаратів для лікування бактеріальних вагінітів. В результаті досліджень у 47 хворих на бактеріальний вагініт із патологічного матеріалу було виділено та ідентифіковано 72 штами мікроорганізмів. Всі виділені клінічні штами мікроорганізмів від хворих з бактеріальним вагінітом були досліджені на чутливість до комбінованого препарату у формі супозиторіїв з фламіном та мірамістином. Найбільшу чутливість до препаратів виявили клінічні -штами мікроорганізмів: *Staphylococci saureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Peptococcus niger*. Підсумовуючи результати проведених експериментальних досліджень комбінованих зразків зі складом фламіну та мірамістином можна заключити, що найбільш ефективними по відношенню до різноманітних клінічних штамів мікроорганізмів та грибів є комбінація фламіну 0,05 г, мірамістину 0,02 г (зразок № 1), що дає можливість розробити комбінований препарат для використання при бактеріальних вагінітах.

Бактеріальний вагініт у ряді випадків є причиною розвитку тяжкої інфекційної патології статевих органів плода та новонароджених дітей, що може зашкоджувати здоров'ю майбутнього покоління. Етіологія та епідеміологія бактеріальної інфекції у вагітних, імунопатогенетичні механізми, які впливають на появу носійства мікроорганізмів та грибів роду *Candida* в піхві остаточно не визначені. Все це іноді призводить до помилок у діагностиці та інтерпретації результатів лабораторних досліджень, наслідком яких є неадекватне призначення препаратів [1, 2].

Провідна роль в профілактиці та лікуванні інфекційних захворювань належить антибактеріальним хіміопрепаратам (антибіотикам, сульфаніламидам, діамінопіримідинам, хінолінам тощо). Проте, поряд з бактеріцидною або бактеріостатичною дією, при лікуванні антибактеріальними препаратами спостерігаються численні негативні побічні ефекти - зниження біохімічної активності кишкової мікрофлори, що приводить до розвитку дисбіозу, збільшення

кількості резистентних штамів збудників, ризик розвитку алергічних реакцій, імунологічні порушення [3-8].

При неспецифічних бактеріальних вагінітах терапевтичний ефект відмічений у препаратів групи нітроїмідазолів та їх комбінацій, які рекомендовані у вигляді інтравагінальних свічок, таблеток, тампонів. В останні роки актуальним став пошук шляхів розширення практичного застосування рослинних речовин, зокрема, що містять флавоноїди. Відомо, що флавоноїди відрізняються широким спектром фармакологічної дії та з успіхом застосовуються при лікуванні серцево-судинних, спазмолітичних, протизапальних, діуретичних, антимікробних та інших захворювань. З величезної кількості робіт, присвячених дослідженню флавоноїдів, відомо, що ці речовини входять до складу препарату «Фламін», який містить суму флавоноїдів не менше 70,0 % (жовчогінний засіб), мазь «Аренарину» 1 % (природний антибіотик аренарин), що володіє антимікробною активністю щодо грамозитивних бактерій при хімічних, термічних опіках очей. В якості антибактеріального засобу широкого спектра дії до розроблених комбінацій було включено мірамістин, який використовується при різноманітних захворюваннях [8-11].

Метою дослідження було вивчити антибактеріальну дію комбінацій з фламіном та мірамістином для розробки ефективного лікарського засобу при лікуванні бактеріального вагініту.

Матеріали та методи

Штами мікроорганізмів були отримані з нативного матеріалу (слизова вагіни або вагінальний секрет). Під спостереженням знаходилося 64 жінки віком від 17 до 42 років, у яких був поставлений діагноз бактеріальний вагініт. Матеріал відбирали в гінекологічному відділенні медичного центру «Евіва» стерильними тампонами одноразового призначення та протягом 2,0-2,5 годин доставляли в лабораторію. Вивчення антибактеріальних властивостей комбінованих препаратів проводили в лабораторії біохімії та біотехнології ДУ «ІМІ НАМН». Ідентифікацію мікрофлори вагінального секрету проводили відповідно до нормативних документів [12]. Всього було виділено та ідентифіковано 72 штами мікроорганізмів. Посіви культивували 48-72 години при температурі 37°C, посіви на гриби витримували при кімнатній температурі. Для виділення анаеробних мікроорганізмів використовували відповідні поживні середовища, а також посіви інкубували в анаеростаті без повітря з комерційними пакетами Anaerobes upplement (виробництво BD Difco) для редукції середовища. Визначення антибактеріальної активності досліджуваних зразків препаратів проводили за методом дифузії в агар в модифікації «колодязів» [13].

Для визначення антибактеріальної активності дослідних зразків мікробне навантаження становило 10^8 мікробних клітин на мл середовища. Приготування суспензії з певною концентрацією мікроорганізмів проводили з використанням приладу Densi-La-Meter (виробництва PLIVA-Lachema, Чехія; довжина хвилі 540

нм). Суспензію готували згідно інструкції до приладу та інформаційного листа №163-2006"Стандартизація приготування мікробних суспензій", м. Київ. [14].

Для лікування поєднаних інфекційно-запальних захворювань (мікст-інфекцій) в організмі людини розроблено комбінований лікарський препарат у формі супозиторіїв. Було виготовлено кілька зразків композицій, розрахованих методом найменших квадратів з наступним складом:

1. склад № 1: фламину 0,05 г, мірамистину 0,02 г
2. склад № 2: фламину 0,04 г, мірамистину 0,015 г
3. склад № 3: фламину 0,06 г, мірамистину 0,025 г.

Результати та обговорення

В результаті досліджень у хворих на бактеріальний вагініт із патологічного матеріалу було виділено 72 штами мікроорганізмів (табл. 1).

Таблиця 1 - Вміст мікрофлори слизової оболонки вагіни

Штами мікроорганізмів	Кількість мікроорганізмів	
	абсолютна	відносна, %
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	9,7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9	12,6
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4	5,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	6,9
<i>Escherichia coli</i>	11	15,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	12,6
<i>Haemophilus ssp</i>	6	8,3
<i>Candida albicans</i>	14	19,4
<i>Peptococcus niger</i>	2	2,8
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1	1,4
<i>Fusobacterium spp.</i>	4	5,5
Всього	72	100

У 47 жінок мікрофлора вагіни була виділена в асоціації. Найбільша частка належала *Staphylococcus epidermidis* (12,6 %), *Escherichia coli* (15,3 %), *Klebsiella pneumoniae* (12,6 %), *Candida albicans* (19,4 %). Також були виділені *Staphylococcus aureus* (9,7 %), *Enterococcus faecalis* (6,9 %), *Streptococcus agalactiae* (5,5 %). Частка

анаеробних мікроорганізмів складала 9,7 %.

Всі виділені клінічні штами мікроорганізмів від хворих з бактеріальним вагінозом були досліджені на чутливість до комбінованого препарату у формі супозиторіїв з фламіном та мірамистином (табл. 2).

Таблиця 2 - Антимікробна активність капсул до клінічних штамів мікроорганізмів

Штами мікроорганізмів	Діаметри зон затримки росту мікроорганізмів, мм (n=3, M±m)		
	1	2	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	24,0±1,0	21,0±1,0	20,0±1,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	25,0±2,0	22,0±1,0	21,0±1,0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	23,0±1,0	20,0±1,0	21,0±1,0
<i>Enterococcus faecalis</i>	22,0±1,0	20,0±1,0	20,0±1,0
<i>Escherichia coli</i>	20,0±1,0	17,0±1,0	18,0±1,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22,0±1,0	19,0±1,0	18,0±1,0
<i>Haemophilus ssp</i>	20,0±1,0	15,0±1,0	16,0±1,0
<i>Candida albicans</i>	18,0±1,0	15,0±1,0	15,0±1,0
<i>Peptococcus niger</i>	24,0±1,0	20,0±1,0	18,0±1,0
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	23,0±1,0	20,0±1,0	19,0±1,0
<i>Fusobacterium spp.</i>	22,0±1,0	20,0±1,0	18,0±1,0

Як видно з таблиці 2, зразки ліків трьох складів характеризуються антимікробною дією відносно до клінічних штамів мікроорганізмів та грибів. Отримані результати показують, що композиція № 1, яка містить флавіну 0,05 г, мірамістину 0,02 г, проявляє антимікробну активність відносно анаеробних та аеробних мікроорганізмів та грибів, як зразків № 2 та № 3, які містять флавіну 0,04 г, мірамістину 0,015г, а також флавіну 0,06 г, мірамістину 0,025г. Діаметри зон затримки росту зразка № 1 по відношенню до *Staphylococcus aureus* складала 24-25 мм на відміну від зразків № 2 та № 3 – 20-21 мм, для *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*- 22-23 мм, тоді як для № 2 та № 3 – 19-21 мм. Аналіз отриманих у мікробіологічному дослідженні результатів дозволяє зробити висновок, що рослинна субстанція флавіну, в поєднанні з мірамістином, з терапевтичною дозою 0,05г та 0,02 г, розширює спектр їх антибактеріальної дії до аеробних бактерій та грибів за рахунок власних антибактеріальних властивостей та

сінергізму.

Найбільшу чутливість до препаратів виявили клінічні штами мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Peptococcus niger* (діаметр зони затримки росту складає 25,5-23,5 мм).

Враховуючи результати попередніх досліджень антимікробної активності капсул на музейні штами мікроорганізмів та клінічні штами мікроорганізмів, що представлено у даному експерименті, для подальшого вивчення обрано склад композиції № 1 (флавін 0,05 г, мірамістин 0,02).

Для визначення бактериостатичних властивостей досліджуваних препаратів було проведено визначення МПК (мінімально-пригнічуючої концентрації) складу зразків комбінацій № 1, № 2, № 3 по відношенню до аеробних мікроорганізмів та грибів (табл. 3).

Таблиця 3 - МПК флавіну та його композицій до клінічних штамів мікроорганізмів

Штами мікроорганізмів	МПК, мкг/мл		
	1	2	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	20,5±1,5	30,0±1,5	35,0±2,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	20,5±1,5	35,0±1,5	35,0±2,5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	35,5±2,0	45,0±1,5	40,0±2,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	40,0±2,5	55,0±2,5	55,0±2,5
<i>Escherichia coli</i>	40,0±2,5	60,0±1,5	55,0±2,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	35,0±1,5	45,0±1,5	40,0±2,5
<i>Haemophilus ssp</i>	30,0±1,5	35,0±1,5	40,0±2,5
<i>Candida albicans</i>	30,0±1,5	40,0±1,5	40,0±3,0

Дані, які наведені в таблиці 3 наглядно демонструють, що склад зразку № 1 (флавіну 0,05 г, мірамістину 0,02 г), який був обраний для подальшого дослідження проявляє бактериостатичну дію по відношенню до широкого кола мікроорганізмів, а також грибів роду *Candida*. МПК для стафілококів складала 20,0-22,0 мкг/мл, для стрептококів 35,0-40,0 мкг/мл, для кишкової групи 35,0-40,0, для грибів 30,0 мкг/мл на відміну від таблеток № 2 та № 3, де МПК було вище та становило 40,0-55,0 мкг/мл.

Підсумовуючи результати проведених експериментальних досліджень комбінованих зразків зі складом флавіну та мірамістином можна заключити, що найбільш ефективними по відношенню до різноманітних клінічних штамів мікроорганізмів та грибів є комбінація флавіну 0,05 г, мірамістину 0,02 г (зразок № 1), що дає можливість розробити комбінований препарат для ефективного терапевтичного застосування при бактеріальному вагініті.

References

1. Reznichenko G.I. Influence of environmental factors on the state of the city urbanizovanogomicrobiocenosis and

for inflammatory diseases of the genital organs of women [Text] / G.I.Reznichenko U.G. Reznichenko // Zbornik scientific papers Asotsiatsiia kusher gynecologists of Ukraine. - K., 2003 - pp 264-267.

2. Aktipkin, G. Normalization mikroekologicheskogo status of pregnant women and infants - residents of large industrial cities - the way of prevention of health disturbances deteyrannevozrosta [Text] / G. Aktipkin, G. Reznichenko GI Reznichenko // Perinatology and pediatrics - 2005. - №1 / 2 pp 11-14.

3. The worldhealth report 2013 – World health statistics 2013 [Electronic resource]. – World Health Organization. – Mode of access

[:http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2013_Full.pdf](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2013_Full.pdf).

4. Feshenko, Yu. I. Antibiotikorezistentnist mikroorganizmiv. Stan and Roads virishennya problem is the [Text] / Yu.I. Feshenko, M. I. Gumenyuk, O. Denisov//Ukrainian chemotherapeutic magazine.- 2010. - № 1-2 (23). - P.4-10.

5. Rivera, A. M. Current concepts in antimicrobial therapy against select gram-positive organisms: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, penicillin-resistant *Pneumococci*, and vancomycin-resistant *Enterococci* [Text]

/ A. M. Rivera, H. W. Boucher // Mayo Clin. Proc. – 2011. – Vol. 86, N 12. – P. 1230–1243.

6. Hawkey, P. M. The growing burden of antimicrobial resistance [Text] / P. M. Hawkey // J. Antimicrob. Chemother. – 2008. – Vol. 62, Suppl 1. – P. 1–9.

7. Dyachenko, S.V. Pharmacoepidemiological bases antibiotic treatment of common diseases [Tekst] / SV Dyachenko // Khabarovsk. Univ. Center SEI HPE DVGUMU, 2010. - 402 p.

8. Sidorenko, S.V. Molecular basis of antibiotic resistance [Tekst] / S.V. Sidorenko, V. I. Tishkov // Advances of Biological Chemistry. - T. 44. - 2004. - S. 263-306.

9. A patent for korisnu model number № 97298 (Ukraine) Likarsky zasib zhovchoginnoi dii [Tekst] / MA Aslanyan, LO Bobritskaya, O. Nazarov, N. Popov, V. I. Litvinenko.-Bull № 5.

10. Pharmacological Study of hepatoprotective activity pills "Lavaflam" [Tekst] / S. M. Drogovoz, A.V. Kononenko, Y.B. Lar'yanovska, M. A. Aslanyan, K. O. Calco. - 2015. - P.26.

11. The current state and prospects of biotechnological production of antibiotics [Text] / T. S. Todosiychuk, T. I. Izdebska, A. Gromyko, V. Fedorenko // Biological Studies/ Studia Biologica.- 2011.- Vol5, №1. - P.159-172.

12. On approval guidelines "Determining the sensitivity of microorganisms to antibiotics": Decree of the Ministry of Health of Ukraine of 05.04.2007. № 167 [Electronic resource] / -Access: <http://mozdocs.kiev.ua/view.p> -6958.

13. General and sanitary microbiology techniques with microbiological studies [Text]: Ouch. manual / Ed. A. Labinskaya, L.P. Blenkovoy, A. Eshina. -Moscow: Medicine, 2004. - P.216-2.

14. Standartizatsiya prigotovannya mikrobnih suspenziy [Text] / Y. L. Volyansky, L.G. Mironenko, S. V. Kalinichenko [that in.] // Informatsiy nysheet about innovations in sistemi receptionists Health Protection of Ukraine № 163-2006, K.: (Ukrmedpatentinform), 2006. - 10p.-(Normative documents of Ministry of Health of Ukraine; Ukrainian Centre for Scientific Medical Information and patent-license work .Informatsiy nysheet).

INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY COMBINED PREPARATIONS FOR CLINICAL STRAINS OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM PATIENTS WITH BACTERIAL VAGINIT
Aslanian M. A., Bobritskaya L. O., Solonina N. L., Osolodchenko . T. P., Kuchma I. Y.

The problem of bacterial vaginit in some cases the cause of severe infectious diseases genitalia of the fetus and newborn, which can impair the health of future generations. It is noted that the treatment of antibacterial agents observed numerous negative side effects- reducing the biochemical activity of the intestinal microflora, abuse microbiota, leading to the development of dysbiosis, increasing the number of resistant strains of pathogens, the risk of allergic reaction and immunological disorders. A study was conducted towards finding effective combinations of drugs from different pharmacological groups means to create a combination of drugs. The **aim of the study** was to develop and explore and Flamini combination of miramistin combined medicines to treat bacterial vaginit. As a **result** of studies in patients with

bacterial vaginit pathological material was isolated and identified 72 strains of microorganisms (*Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Enterococcus spp*, *Escherichia coli*, *Haemophilus sssp*, *Candida albican* and various strains of anaerobic microorganisms. For the combined treatment of infectious and inflammatory diseases (mixed infections) in humans the combined drug tablet form. All clinical strains of microorganisms isolated from patients with bacterial vaginit were tested for sensitivity to the combined preparation in tablet form with Flamini and miramistin. The greatest sensitivity to the drugs found clinical strains of microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Peptococcus niger* (diameter zone growth retardation is 25,5-23,5 mm). composition tablets number 1 (0.05 g Flamini, miramistini 0.02 g), which was selected for further study shows bacteriostatic effect against a wide range of microorganisms and fungi Rod *Candida*. IPC for *Staphylococcus sp* was 20-25 pg / mL for *Streptococcus sp* 35,0-40,0 mg / ml, for intestinal group 35,0-40,0 for fungi 30,0 mg / ml unlike pills number 2 and number 3, where the IPC was higher and amounted to 40,0 -55,0 mg / ml. Summing up the results of experimental studies capsules combined with the composition Flamini and miramistin becon cluded that the most effective eagainst the different clinical strains of microorganism sand fungi is a combination Flamini 0,05g, miramistin 0,02 (tablets number1), giving opportunity to develop drug combinations for use in bacterial vaginit.

Key words: vaginitis, clinical isolates, mikroorganisms, activity, antimicrobial drugs.