

УДК 615.454.2:543:866:614.35

## ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ МАЗІ НА ОСНОВІ ОФЛОКСАЦИНУ ТА НІМЕСУЛІДУ

Шматенко В.В.

Українська військово-медична академія

**Резюме.** Проведені мікробіологічні дослідження методом дифузії в агар щодо визначення антимікробної активності опрацьованого лікарського засобу (мазь) з метою встановлення оптимальної концентрації антибактеріальної діючої речовини.

**Ключові слова:** мікроорганізми, тест-культури, поживне середовище, лікарський засіб, офлоксацин, німесулід, мазь, антимікробна активність.

**Вступ.** Мікробіологічні дослідження відіграють важливу роль для вивчення етіології різноманітних патологічних захворювань, що супроводжуються рановим процесом, їх профілактики та лікування. Патогенні мікроорганізми, що домінують в ексудаті рани, є першопричиною запальних процесів в тканинах [4]. Вплив на патогенетичні ланцюги запалення в тканинах передбачає використання антибактеріальних та протизапальних засобів в комплексному лікуванні різних патологій. Корекція дисбіотичного зсуву направлена на ліквідацію надлишкового бактеріального обсіменіння ураженої ділянки шляхом застосування поєднання препаратів таких груп в одній лікарській формі. Тому предметом наших досліджень є встановлення концентрацій обраного нами лікарського засобу мікробіологічним методом [4].

Мікробіологічні дослідження були проведені на кафедрі мікробіології Харківської медичної академії післядипломної освіти під керівництвом проф. С.В. Бірюкової та доц. О.Б. Колокової згідно вимогам ДФУ та методичним рекомендаціям [1, 2].

**Матеріали та методи дослідження.** Матеріалами досліджень є мазь, що містить німесулід та офлоксацин. У всіх зразках концентрація німесулідів складає 1,0 % (згідно аналізу літератури). Нами проведені мікробіологічні дослідження щодо визначення оптимальної концентрації офлоксацину. При цьому кількість офлоксацину варіювала від 0,025 % до 0,1 %. Крок збільшення концентрації склав 2 рази (табл. 1).

Таблиця 1

### Концентрація діючих речовин в досліджуваних зразках

№ зразка	Основа	Лікарський засіб	Концентрація, %	
			Німесулід	Офлокаїн
1	Суспензійно-емульсійна основа м/в	мазь	1,0	0,025
2			1,0	0,05
3			1,0	0,1

Як препарат порівняння використовували препарат Офлоксин (виробництво „Дарниця”) з концентрацією офлоксацину 0,1 %.

Визначення антимікробної активності зразків проводили мікробіологічним методом дифузії в агарі на твердому поживному середовищі, який ґрунтується на здатності антибактеріальної речовини пригнічувати ріст мікроорганізмів [1, 2, 5]. Зони пригнічення росту тест-штамів мікроорганізмів випробовуваним зразком порівнювали з діаметрами зон пригнічення росту, які утворюються при використанні референтного препарату (Офлокаїн).

При проведенні досліджень використані еталонні тест-штами з американської типової колекції культур мікроорганізмів (США) (ATCC): *Escherichia coli* і *ATCC 10536 Klebsiella pneumoniae ATCC 10031* та штами тих самих мікроорганізмів, що були виділені у хворих із патологічними вогнищами запалення (табл. 2).

Таблиця 2

**Результати перевірки властивостей використаних тест-штамів**

№ з/п	Назва 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 при температурі 35 °С протягом 18-20 год на м'ясо-пептонному агарі. Поживні середовища перевіряли на стерильність та на ростові властивості згідно вимогам ДФУ.

Готували суспензії мікроорганізмів і визначали їх оптичну густина при 550 нм за допомогою денситометру „Densimat” в одиницях Мак Фарланда для визначення концентрації бактеріальної суспензії в КУО/мл. Відбирали гладкі, або рівномірно пігментовані колонії, характерним ростом і тинкторіальними властивостями при окрасці за Граммом, пересіювали їх на щільне живильне середовище того ж складу та інкубували в залежності 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 поживним середовищем соєво-казеїновий агар, перераховуючи на КУО/мл.

На наступному етапі визначення антимікробної активності досліджуваного зразка мазі відповідне розплавлене агаризоване поживне середовище, охоложене 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 поживному середовищі за допомогою стерильного металевого пробійника з внутрішнім діаметром 6 мм та зовнішнім діаметром 8 мм робили лунки в двошаровій товщі агаризованого поживного середовища. Після цього в лунки вносили по 50 мкл зразку 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 при кімнатній температурі протягом 1 год, після чого інкубували при  $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$  протягом (18–24) год. Діаметри зон затримки росту тест-культур вимірювали штангенциркулем з точністю до 1 мм. Випробування проводили в п'яти повторях.

При проведенні мікробіологічних досліджень важливим моментом є товщина агарового шару в чашці Петрі. Дотримання цих вимог необхідне в 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 повинна дорівнювати  $4,0 \pm 0,5$  мм, що досягається при внесенні в чашку Петрі діаметром 90 мм 20 мл агару, діаметром 100 мм – 25 мл агару та діаметром 150 мм – 60 мл агару.

Мікробіологічні дослідження включали наступні етапи: підготовлену суспензію (1 мл) з невідомою бактеріальною концентрацією вносили в підготовлену ампулу АРІ (з 5 мл 0,85 % розчином NaCl) та перемішували, потім поміщали ампулу в зчитуючий блок і реєстрували цифрове значення Мак Фарланда. Якщо дане 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 повинна бути чистою зовні та протерта перед використанням (табл. 3).

Таблиця 3

**Відповідність одиниць Мак Фарланда оптичній густині**

Стандарт Мак Фарланда	Бактеріальна концентрація $\times 10^8$ мл	Теоретична оптична густина при 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 проводилося тестування приладу: брали ампули McFarland Standart 6 шт по 5 мл (0,5, 1, 2, 3, 4, 5) та по черзі поміщали їх в денсимат. Тестування проводили кожен раз після чистки приладу.

Отримані результати порівнювали з даними, наведеними в табл. 3 та склали пропорцію відповідно до одержаних результатів.

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

Результати дослідження та їх обговорення. При вимірюванні (з точністю до 1мм) зон затримки росту тест-культур орієнтувалися на зону повного пригнічення видимого росту тест-мікроорганізмів (табл 4).

Таблиця 4

**Антимікробна активність опрацьованого ЛЗ в порівнянні з референтним препаратом по відношенню до тест-штамів мікроорганізмів**

№ з/п зразку	Діаметр зони пригнічення росту тест-штаму (мм)		Середнє статистичне значення		Статистична значущість різниці в активності випробовуваного зразка у порівнянні з референтним зразком
	10 <sup>7</sup> КУО/мл в верхньому шарі поживного середовища		E.coli	K.pneumoniae	
1	E. coli	K. pneumoniae	23,91 ± 0,1	25,64 ± 0,1	незначуща
	24,37	25,22			
	24,05	25,14			
	23,67	26,11			
	24,32	26,18			
2	23,19	25,53	25,50 ± 0,2	26,39 ± 0,2	незначуща
	25,24	26,22			
	25,67	26,16			
	25,50	26,41			
	25,24	26,43			
3	25,86	26,36	25,44 ± 0,1	26,19 ± 0,1	незначуща
	25,64	26,16			
	25,36	26,14			
	25,15	26,18			
	25,14	26,31			
Офлокаї	25,91	26,17	25,08 ± 0,1	26,21 ± 0,1	незначуща
	25,13	26,55			
	25,11	26,18			
	25,05	26,11			
	25,04	26,15			
	25,11	26,07			

Примітка: кількість вимірів n = 5, P = 95 %.

Визначення активності опрацьованого лікарського засобу порівняно з активністю референтного зразка проводили відповідно „заданого рівня ймовірності” за ДФУ, рівного 95 % (P) [3].

Аналіз отриманих даних показав, що при збільшенні концентрації офлоксацину від 0,025 до 0,1 % призводить до поступового, але незначного збільшення зон пригнічення росту тест-культур. Так, при концентрації офлоксацину 0,025 % діаметр зон пригнічення складає 23,91 мм для E. coli та 25,64 мм для K. pneumoniae відповідно. Збільшення концентрації офлоксацину в 2 рази (від 0,025 до 0,05 %) призводить до збільшення зон пригнічення росту для мазі в 0,95 рази для E. coli та в 0,97 рази для K. pneumoniae. При цьому зони

пригнічення змінюється від 25,24 до 25,86 мм для *E. coli* та від 26,22 до 26,36 мм для *K. pneumoniae*. Подальше збільшення концентрації офлоксацину від 0,05 до 0,1% не призводить до значного збільшення антимікробної активності лікарського засобу. При цьому діаметри зон затримки росту складають 25,44 мм для *E. coli* та 26,19 мм для *K. pneumoniae* відповідно. Отже, нами обрана концентрація офлоксацину у кількості 0,05 % у складі мазі.

Необхідно відмітити, що зразок 2 виявляє значно більшу антимікробну активність ніж референтний препарат. Так, зона пригнічення росту тест-культур складає 25,08 для *E. coli* та 26,21 для *K. pneumoniae*. Аналізуючи даний результат, можна зробити висновок, що поєднання в одній лікарській формі субстанцій антибактеріальної та протизапальної дії призводить до синергетичної антимікробної дії лікарського засобу. Отже, зразок 2 з концентрацією офлоксацину 0,05 % виявляють більш виражену антимікробну активність ніж референтний препарат.

Для більш точного встановлення оптимальної концентрації офлоксацину нами проведені подальші дослідження щодо деталізації концентрації. Нами обраний зразок лікарського засобу 2 із вмістом офлоксацину від 0,03 до 0,1 % з кроком збільшення офлоксацину 0,01 % (табл. 5).

Аналіз одержаних результатів, які наведено в табл. 5., свідчить, що зони пригнічення росту тест-культур в межах обраних концентрацій збільшуються від 23,12 до 25,38 для *E. coli* та від 26,26 до 26,55 для *K. pneumoniae*.

Таблиця 5

**Антимікробна активність опрацьованого ЛЗ по відношенню до тест-штамів мікроорганізмів**

Лікарський засіб	Концентрація офлоксацину, %	Діаметр зони пригнічення росту тест-штаму (мм)	
		<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>10<sup>7</sup> КУО/мл в верхньому шарі поживного середовища</i>			
мазь	0,03	23,12 ± 0,1	26,26 ± 0,1
	0,04	24,37 ± 0,2	26,39 ± 0,1
	0,05	25,38 ± 0,3	26,55 ± 0,2
	0,06	25,18 ± 0,2	26,51 ± 0,2
	0,07	25,18 ± 0,3	25,15 ± 0,1
	0,08	24,19 ± 0,2	25,07 ± 0,3
	0,09	24,25 ± 0,2	24,89 ± 0,1
	0,1	24,21 ± 0,1	24,59 ± 0,1

Примітка: кількість вимірів n = 5, P = 95 %.

При подальшому збільшенні концентрації офлоксацину відбувається поступове зменшення зон пригнічення росту тест-культур, а саме до 24,21 для *E. coli* та до 24,59 для *K. pneumoniae*. Тому, дані результати є підтвердженням попередніх досліджень для опрацьованого лікарського засобу, що встановили концентрацію офлоксацину 0,05 %.

**Висновки:**

1. Одержані результати свідчать про високу антимікробну активність опрацьованого лікарського засобу у порівнянні з референтним препаратом

Офлокаїн по відношенню до *Escherichia coli* ATCC 10536 та *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031.

2. В ході проведених мікробіологічних досліджень щодо встановлення ефективної терапевтичної концентрації копозиції офлоксацин – німесулід у складі опрацьованого лікарського засобу комплексної ранозагоювальної дії показали, що композиція з концентрацією офлоксацину та німесуліду 0,05 % та 1,0 % відповідно має оптимальну антимікробну активність.

#### **Література:**

1. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів (Методичні рекомендації). – Київ, – 2004. – 39 с.

2. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2.1890-04). – С. 314-316.

3. Клиника микробиологической антимикробной химиотерапии. - 2004, том 6, №4.

3. Державна фармакопея України – Х.:PIPEГ, – 2001. – 556 с.

4. Komman K.S. di Giovine F.S. Genetik variations in cytokine expression:a risk factor for severity of adult // Ann. Periodontol. – 1998. – P. 327-338.

5. European Pharmacopoeia. – 4-th ed. – Strasbourg: Council of Europe, – 2003. – 2416 p.

### **ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ МАЗИ НА ОСНОВЕ ОФЛОКСАЦИНА И НИМЕСУЛИДА**

**Шматенко В.В.**

**Резюме.** Проведенные микробиологические исследования методом диффузии в агар с целью определения антимикробной активности проработанного лекарственного средства (мазь) и установления оптимальной концентрации антибактериального действующего вещества.

**Ключевые слова:** микроорганизмы, тест-культуры, питательная среда, лекарственное средство, офлоксацин, нимесулід, мазь, антимикробная активность.

### **RESEARCH ANTIMIKROBIAL ACTIVITY OINMENT ON THE BASIS OF OFLOXACIN AND NIMESULIDE**

**V.Shmatenko**

**Summary.** Conducted microbiological research agar diffusion method to determine the antimicrobial activity of processed product (ointment) to determine the optimal concentration of antimicrobial active ingredient.

**Keywords:** microorganisms, the test culture, culture medium, the drug, ofloxacin, nimesulide, ointment, antimicrobial activity.