

УДК 616.31-002:616.311.2-002:616.314.17-008.1:616-08

Н. С. КАВУШЕВСЬКА, Т. І. ТЮПКА, Ю. С. МАСЛІЙ

Національний фармацевтичний університет

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ СТОМАТОЛОГІЧНИХ ГЕЛІВ НА ОСНОВІ ЛІЗОЦИМУ

*Проведене дослідження антимікробної активності 18 зразків стоматологічних гелів на основі лізоциму. Експериментально встановлено, що найвищу антимікробну активність по відношенню до штамів *Staphylococcus aureus* ATCC 26923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Candida albicans* ATCC 885/653 виявляє гель № 2 (лізоциму гідрохлорид 0,3%; ГЕЦ 2,0%), який перевершує препарат порівняння Метрогіл Дента.*

Ключові слова: антимікробна активність, лізоцим, пародонтит, гінгівіт.

ВСТУП

Відомо, що у розвитку інфекційно-запальних захворювань пародонту важлива роль належить мікрофлорі. Росту мікробів в ротовій порожнині сприяють слаболужна реакція середовища, вологість, температура, а також анатомічні особливості зубоцелешної системи – багаточисельні складки, де на тривалий час затримуються залишки їжі, які представляють собою ідеальне середовище для мікроорганізмів [2, 4]. Факторами, що сприяють утворенню мікробного зубного нальоту є недостатнє самоочищення зубів, незадовільна гігієна порожнини рота, якісні та кількісні зміни рідини рота та слини, в тому числі лізоциму. В результаті впливу патогенних факторів відбувається формування зубної бляшки, і в тканинах ясен розвивається запалення. В подальшому при незадовільній гігієні порожнини рота відбувається збільшення зубної бляшки за рахунок розмноження у ній патогенної мікрофлори, а саме актиноміцетів, трепонем, грамнегативних паличок та коків [5, 7]. Мікроорганізми бляшки в результаті активного виділення різноманітних ферментів, які сприяють розвитку мікроциркуляторних порушень пародонту, запускають ряд запальних реакцій, викликають деполімеризацію глікозаміногліканів, білків тканин пародонту, в першу чергу – колагену. Такий механізм розвитку патологічного процесу займає важливе місце в патогенезі захворювань пародонту запального

та дистрофічно-запального походження. Виникнення запальних захворювань пародонту потребує обов'язкової місцевої медикаментозної терапії. З цією метою застосовують антимікробні, антибактеріальні та протизапальні лікарські засоби. Відомо, що дія лізоциму, який входить до складу слини, полягає в розщепленні глікозаміногліканів клітинних оболонок грампозитивних мікроорганізмів, чим пригнічує їх ріст. Менш чутливі до нього грамнегативні мікроорганізми. Також, захисна роль лізоциму полягає в запобіганні та порушенні здатності мікроорганізмів фіксуватися на поверхні зуба [4, 6]. Зазначені вище механізми розвитку запальних захворювань пародонту та протимікробні властивості лізоциму стали теоретичним підґрунтям для створення нового стоматологічного гелю на основі лізоциму. На кафедрі заводської технології ліків Національного фармацевтичного університету під керівництвом д-ра фарм. наук, професора Рубан О. А. для подальшого фармакологічного вивчення були розроблені зразки стоматологічних гелів різного кількісного та якісного складу на основі лізоциму.

Метою нашого дослідження стало вивчення антимікробної активності зразків гелю на основі лізоциму різного якісного та кількісного складу та їх складових.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом дослідження стали зразки різного якісного і кількісного складу на основі лізоциму (табл. 1).

© Н. С. Кавушевська, Т. І. Тюпка, Ю. С. Маслій, 2012

Таблиця 1

**ОБ'ЄКТИ ДОСЛІДЖЕННЯ
АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ**

Номер зразка	Склад зразка
1	Лізоциму гідрохлорид 0,2 %; ГЕЦ 2,0 %
2	Лізоциму гідрохлорид 0,3 %; ГЕЦ 2,0 %
3	Лізоциму гідрохлорид 0,4 %; ГЕЦ 2,0 %
4	Лізоциму гідрохлорид 0,2 %; карбопол 1,0 %
5	Лізоциму гідрохлорид 0,3 %; карбопол 1,0 %
6	Лізоциму гідрохлорид 0,4 %; карбопол 1,0 %
7	Лізоциму гідрохлорид 0,2 %; ГМПЦ 2,0 %
8	Лізоциму гідрохлорид 0,3 %; ГМПЦ 2,0 %
9	Лізоциму гідрохлорид 0,4 %; ГМПЦ 2,0 %
10	Лізоциму гідрохлорид 0,3 %; ГЕЦ 2,0 %; Д-пантенол 2,0 %
11	Лізоциму гідрохлорид 0,3 %; ГЕЦ 2,0 %; Д-пантенол 3,0 %
12	Лізоциму гідрохлорид 0,3 %; ГЕЦ 2,0 %; Д-пантенол 5,0 %
13	ГЕЦ
14	карбопол
15	ГМПЦ
16	Д-пантенол
17	Лізоциму гідрохлорид
18	Метрогил-Дента

Антимікробну активність досліджуваних зразків гелю на основі лізоциму вивчали методом дифузії в агар (методом «колодязів») [3].

Для дослідження використовували агар Мюллера-Хінтона (Дагестанський НДІ живильних середовищ; термін придатності середовища до XII 2011 р.). Згідно з рекомендаціями ВОЗ для оцінки активності субстанції використовували тест-штами *Staphylococcus aureus* ATCC 26923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Candida albicans* ATCC 885/653 [1]. Мікробне навантаження становило 10^7 мікробних клітин на 1 мл середовища, яке встановлювали за стандартом McFarland. Для роботи використовували 18-24-годинну культуру мікроорганізмів.

Визначення антимікробної активності проводили у двох шарах щільного живильного середовища, розлитого в чашки Петрі. У нижньому шарі використовували «голодні» не засіяні середовища (агар-агар, вода, солі). Нижній шар являв собою підкладку висотою 10 мм, на яку строго горизонтально встановлювали 3-6 тонкостінних циліндрів із нержавіючої сталі в діаметрі 8 мм та висотою 10 мм. Навколо циліндрів заливали верхній шар, який складався із живильного агаризованого середовища, розплавленого і охолодженого до 40 °С. У даний шар

вносили відповідний стандарт добової культури тест-мікробу. Попередньо верхній шар добре розмішували до утворення однорідної маси. Після застигання за допомогою стерильного пінцету циліндри витягували і на місце утворених лунок розміщували досліджувану субстанцію з урахуванням її об'єму (0,3 мл).

Об'єм середовища для верхнього шару коливався від 14 до 16 мл. Спочатку чашки Петрі підсушували протягом 30-40 хвилин за кімнатної температури, а потім поміщали в термостат на 18-24 години.

Про рівень антимікробної активності судили за діаметром зони затримки росту мікроорганізмів навколо лунки з досліджуваним зразком гелю, використовуючи наступні критерії:

- відсутність зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунки, а також зони затримки до 10 мм вказує на те, що мікроорганізм не чутливий до внесеної в лунку субстанції;
 - зони затримки росту діаметром 10-15 мм вказують на малу чутливість культури відносно досліджуваної субстанції;
 - зони затримки росту діаметром 15-25 мм розцінюються як показник помірної чутливості мікроорганізму відносно досліджуваної субстанції;
 - зони затримки росту, діаметр яких перевищує 25 мм, свідчить про високу чутливість мікроорганізмів відносно досліджуваної субстанції.
- Дослідження проводили в лабораторії біохімії мікроорганізмів і живильних середовищ ДУ «ІМІ ім. Мечникова НАМНУ» під керівництвом канд. біол. наук, ст. наук. співроб. Осолодченко Т. П.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ
ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

Результати, які одержані в експерименті, показали, що не один з досліджуваних зразків не проявляє антимікробної дії відносно штамів *Pseudomonas aeruginosa* та *Proteus vulgaris*.

Помірну антимікробну активність до штамів *Staphylococcus aureus* проявляли майже усі представлені зразки, але найвищі показники зафіксовані у зразків № 1, 2, 3 (зразки на ГЕЦ-основі), при цьому у ГЕЦ-основи (зразок № 13) теж встановлена помірна антимікробна активність до вказаного штаму (затримка росту складає $13,0 \pm 0,2$ мм).

Відносно штаму *Escherichia coli* слабку антимікробну активність мають зразки № 10-12, 15. Помірну антимікробна активність притаманна для зразків № 1-9. При цьому основи ГЕЦ та карбопол (зразки № 13, 14) не проявляють антимікробної дії, що вказує на те, що антибактеріальна активність до *Escherichia coli* зразків на

Таблиця 2

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ЗРАЗКІВ ГЕЛІВ НА ОСНОВІ ЛІЗОЦИМУ ТА ЇХ СКЛАДОВИХ, (М+М)

Номер зразка	Діаметр зони затримки росту мікроорганізмів, мм					
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 653/885
1	22,5±0,2	21,7±0,5	ріст	ріст	16,0±0,2	12,3±0,1
2	23,3±0,2	23,7±0,3	ріст	ріст	18,7±0,1	14,7±0,3
3	23,0±0,3	23,5±0,3	ріст	ріст	18,3±0,3	14,0±0,2
4	15,3±0,5	16,7±0,2	ріст	ріст	16,0±0,3	13,7±0,2
5	16,5±0,1	16,5±0,3	ріст	ріст	18,0±0,2	12,7±0,2
6	14,3±0,2	15,0±0,2	ріст	ріст	17,0±0,4	13,3±0,3
7	17,7±0,2	17,3±0,1	ріст	ріст	19,0±0,1	14,3±0,1
8	19,0±0,3	18,3±0,4	ріст	ріст	22,3±0,2	14,3±0,6
9	20,5±0,1	19,0±0,2	ріст	ріст	22,3±0,5	14,7±0,2
10	13,0±0,2	12,7±0,1	ріст	ріст	14,3±0,1	12,7±0,2
11	14,7±0,1	13,7±0,2	ріст	ріст	15,0±0,3	13,5±0,1
12	15,0±0,4	13,7±0,3	ріст	ріст	15,0±0,3	13,0±0,2
13	15,0±0,2	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст
14	13,3±0,4	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст
15	12,3±0,1	14,0±0,2	ріст	ріст	14,3±0,2	ріст
16	14,3±0,2	13,3±0,3	ріст	ріст	14,3±0,4	ріст
17	15,5±0,2	13,5±0,1	ріст	ріст	14,3±0,2	12,0±0,1
18	21,0±0,4	17,7±0,2	ріст	ріст	15,7±0,2	14,5±0,1

цих основах обумовлена наявністю у їх складі лізоциму гідрохлориду у різних концентраціях. Найбільша зона затримки росту *Escherichia coli* – 23 мм характерна для зразка № 2 з 0,3 % концентрацією лізоциму гідрохлориду.

Встановлено, що по відношенню до штаму *Bacillus subtilis* досліджувані зразки проявляють слабку або помірну активність, за виключенням зразків № 13 і 14, які не впливають на ріст вказаних бактерій.

Аналіз отриманих результатів дослідження свідчить також про слабку чутливість *Candida albicans* до дії усіх досліджуваних зразків, крім зразків № 13-16, які не проявляють протимікробної активності до вказаного штаму мікроорганізмів. Тобто, жодна з основ не впливає на ріст *Candida albicans*, а наявність антимікробної активності у зразків № 1-12 можна пояснити наявністю у їх складі лізоциму гідрохлориду, що не суперечить даним літературних джерел стосовно наявності у лізоциму антимікробної активності, яка зумовлена його здатністю каталізувати гідроліз β-(1-4) глікозидного зв'язку між N-ацетилмурамовою кислотою та N-ацетилглюкозаміном в молекулі пептидоглікану клітинної стінки бактерій, що викликає їх лізис. Тим самим створюється антибактеріальний бар'єр в організмі [4, 5, 6].

За сумарним антимікробним ефектом до усіх зазначених штамів мікроорганізмів найбільш

ефективними є зразки № 1-3. Це зразки, до складу яких входить ГЕЦ-основа та лізоциму гідрохлорид у концентраціях 0,2; 0,3 та 0,4 % відповідно. Вірогідної різниці між антимікробною активністю зразків з 0,3 та 0,4 % концентрацією лізоциму гідрохлориду не відмічено, тобто ефективною концентрацією лізоциму можна вважати 0,3 %. За антимікробною активністю зразок № 2 перевершує препарат порівняння Метрогіл Дента (зразок № 18).

ВИСНОВКИ

Найвищу антимікробну активність по відношенню до штамів *Staphylococcus aureus* ATCC 26923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Candida albicans* ATCC 885/653 проявляє гель № 2 (лізоциму гідрохлорид 0,3 % ; ГЕЦ 2,0 %) та перевершує препарат порівняння Метрогіл Дента.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ.

1. Бактеріологічний контроль поживних середовищ. Інформаційний лист МОЗ України № 05.4.1/1670, Київ, 2001.
2. Воложин А. И. Терапевтическая стоматология. Ч. 2. Болезни пародонта / подред. Г. М. Барера. – М., 2008. – С. 18-33.
3. Вивчення специфічної активності проти-мікробних лікарських засобів / Ю. Л. Во-

- ляньський, В. П. Ширококов, С. В. Бірюкова [та ін.]: [Метод. реком.] – К. – 2004. – 38 с.
4. Данилевский Н. Ф., Заболевания пародонта. / Н. Ф. Данилевский, А. В. Борисенко // – К. : Здоров'я, 2000. – С. 128-130.
 5. Подгаецкая О. Е. Этиология и патогенез хронического генерализованного пародонтита (Обзор литературы) / О. Е. Подгаецкая, С. А. Шнайдер // Буковинський медичний вісник. – 2007. – Т. 11, № 1. – С. 127-130.
 6. Роль защитных факторов организма в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта / А. А. Кулаков, О. А. Зорина, О. А. Борискина // Стоматология. 2010. – № 6. – С. 72-77.
 7. Свиринов В.В. Изучение состояния микробиоты полости рта при воспалительных заболеваниях пародонта и оценка возможности его коррекции с помощью стоматидина / В. В. Свиринов, В. О. Богданова, М. Д. Ардатская // Фарматека. – 2009. – № 19. – С. 56-63.

УДК 616.31-002:616.311.2-002:616.314.17-008.1:616-08

Н. С. Кавушевская, Т. И. Тюпка, Ю. С. Маслий.

**ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ
СТОМАТОЛОГИЧЕСКИХ ГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ЛИЗОЦИМА**

Проведено исследование антимикробной активности 18 образцов стоматологических гелей на основе лизоцима. Экспериментально установлено, что наиболее высокую антимикробную активность по отношению к штаммам *Staphylococcus aureus* ATCC 26923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Candida albicans* ATCC 885/653 проявляет гель № 2 (лизоцима гидрохлорид 0,3 % ; ГЕЦ 2 %), который превосходит препарат сравнения Метрогил Дента.

Ключевые слова: антимикробная активность, лизоцим, пародонтит, гингивит.

UDK 616.31-002:616.311.2-002:616.314.17-008.1:616-08

N. S. Kavushevskaya, T. I. Tyupka, J. S. Maslij.

**RESEARCH OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF STOMATOLOGICAL
GELS ON THE BASIS OF LYSOCIM**

Conducted research of antimicrobial activity 18 standards of stomatological gels on the basis of lysocim. It is experimentally set that the most high antimicrobial activity in relation to the cultures of *Staphylococcus aureus* ATCC 26923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Candida albicans* ATCC 885/653 shows gel № 2 (lysocim hydrochloride 0,3 % ; GEC 2 %) and superior to the reference drug Metrogyl Denta.

Key words: antimicrobial activity, lysocim, parodontit, gingivitis.

Адреса для листування:

61002 м. Харків, вул. Мельнікова, 12
Кафедра патологічної фізіології НФаУ
Тел. 8- 057-706-30-66

Надійшла до редакції:

26.11.2012