Annals of Mechnikov Institute, N 1, 2014
www.imiamn.org.ua /journal.htm

УДК: 615.454.2:616.65:001.891.5

ДОСЛІДЖЕННЯ НА МІКРОБІОЛОГІЧНУ ЧИСТОТУ СУПОЗИТОРІЇВ "ФІТОПРОСТ" І "ТАМСУЛОПРОСТ"

Гриценко В. І., Рубан О. А., Осолодченко Т. П.

[1]Національний фармацевтичний університет, м. Харків
[2]ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України»,

Проблема лікування захворювань передміхурової залози останнім часом набуває все більшої актуальності. Доброякісна гіперплазія простати і хронічний простатит є найбільш розповсюдженими урологічними захворюваннями чоловіків.

Сучасні схеми лікування цих патологій поєднують препарати різних фармакотерапевтичних груп, серед яких чільне місце посідають α_1-адреноблокатори, що впливають на α-рецептори, зменшують або повністю ліквідують м'язовий тонус простатичної частини уретри та шийки сечового міхура [1, 2].

На сучасному етапі лікування пацієнтам рекомендована комплексна медикаментозна терапія, яка включає фітотерапевтичні засоби. Препарати рослинного походження мають високу біодоступність, широкий спектр терапевтичної дії, можуть застосовуватись пацієнтами впродовж тривалого часу [3, 4].

Найбільш оптимальною лікарською формою для лікування захворювань передміхурової залози є супозиторії. Препарати у формі супозиторіїв мають більшу біодоступність, їх анатомічна близькість до органу-мішені забезпечує терапевтичну дію безпосередньо у простаті. Серед лікарських засобів для лікування урологічних захворювань чоловіків в нашій країні домінують продукти виробництва іноземних фармвиробників, тому, розробка ефективних, безпечних і доступних вітчизняних препаратів з комплексною терапевтичною дією залишається актуальним завданням.

З метою створення нових вітчизняних простатопротекторів в Національному Фармацевтичному університеті розроблені ректальні супозиторії на основі твердого жиру "Тамсулопрост" (містять у своєму складі α_{1A}-адреноблокатор тамсулозину гідрохлорид) і "Фітопрост" (містять фітокомпозицію з екстрактів плодів пальми Сабаль, кореню кропиви і насіння гарбуза). У зв'язку з тим, що розроблені супозиторії не містять антибактеріальних речовин і консервантів, їх зберігання потребує ретельного контролю [5].

Метою нашої роботи стало мікробіологічне дослідження стерильності супозиторіїв "Тамсулопрост" і "Фітопрост" для лікування захворювань передміхурової залози.

Об'єкти і методи досліджень

Об'єктами досліджень стали супозиторії "Фітопрост" і "Тамсулопрост", виготовлені на основі твердого жиру методом виливання.

Для проведення випробувань препаратів на мікробіологічну чистоту використовували живильні середовища виробництва Махачкалінського заводу: тіогліколеве напіврідке середовище, середовище Сабуро, поживний бульон, поживний агар. Середовища готували відповідно вимогам виробника (кількість порошку на літр, pH середовища, умови автоклавування тощо), кожна серія перевірялась на ростові якості відповідно до нормативних документів. З метою випробування живильних середовищ на відповідність ростових властивостей середовища інокулювали невеликою кількістю відповідних тест-штамів мікроорганізмів (10^{-6} в розведенні за стандартом Mc-Farland). Облік тест-культури відповідного мікроорганізму на даному середовищі проводили через 18-20 годин і підтверджували її придатність для дослідницької роботи. На середовище Сабуро засівали *Candida albicans*, на живильний агар – *Pseudomonas aeruginosa* і *Bacillus subtilis*, на середовище Чистовича - *Staphylococcus aureus*, на Ендо – *Escherichia coli*. Тіогліколеве середовище витримували в термостаті при температурі 35^0С три доби.

Для ідентифікації патогенних мікроорганізмів (*S.aureus, P.aeroginosa*, інші) використовували середовище Чистовича, кровяний агар, середовище Ендо.

Матеріали і методи досліджень

Мікробіологічні дослідження ректальних супозиторіїв проводили на базі лабораторії біохімії мікроорганізмів та живильних середовищ ДУ «ІМІ НАМН».

Для визначення ефективності консервуючої дії розроблених лікарських препаратів використовували біологічний метод, наведений у Державній Фармакопеї України (ДФУ), п. 5.1.3. та наступні тест-штами мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus ATCC 6538*; *Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027*; *Candida albicans ATCC 885/653*.

Бактерії при температурі 35^0С культивували протягом 18-24 год. на поживному бульйоні (ДФУ, п. 2.6.13), C. albicans – при температурі від 20^0С до 25^0С протягом 48 год. на середовищі Сабуро (ДФУ, п. 2.6.13). Готували робочі суспензії монокультур тест-мікроорганізмів у стерильному 0,9 % розчині натрію хлориду.

Зразки препаратів при ретельному перемішуванні контамінували монокультурою одного із тест-мікроорганізмів, забезпечуючи мікробне навантаження 10^7 КУО/мл. Зразки зберігали 28 діб при температурі від 20^0С до 25^0С, захищаючи від впливу світла.

Від кожного дослідного зразка відбирали проби одразу після контамінації, через 2, 7, 14 і 28 діб та робили висіви на густі живильні середовища для визначення числа життєздатних клітин мікроорганізмів (бактерій і грибів).

Annals of Mechnikov Institute, N 1, 2014
www.imiamn.org.ua /journal.htm

Критерієм оцінки ефективності консервуючої дії було зниження числа життєздатних клітин мікроорганізмів у препаратах за визначений період часу після їх контамінації. Відповідно до вимог ДФУ існує два критерії оцінки ефективності антимікробних консервантів за логарифмом росту мікроорганізмів після інокулювання препаратів: критерій А – зниження кількості життєздатних клітин протягом 7-и діб та критерій В - зниження кількості життєздатних клітин протягом 14-и діб.

З метою оцінки антимікробної активності у вигляді логарифму зменшення кількості життєздатних бактерій, кожний препарат інокулювали певною кількістю тест-штамів. Облік проводили на 2, 7, 14 і 28 добу. Критерієм оцінки антибактеріальної ефективності консервантів вважається зменшення кількості життєздатних колоній клітин мікроорганізмів за певний період після контамінації .

Відповідно з вимогами ДФУ в препаратах для місцевого застосування логарифм зменшення кількості життєздатних колоній бактерій через 2 доби повинен складати не меньше 2-х, через 7 діб – не меньше 3-х, в подальшому кількість життєздатних клітин бактерій не повинна збільшуватись. Логарифм зменшення кількості життєздатних клітин грибів за 14 діб повинен складати не менше 2-х. Ці показники відповідають критерію «А». У відповідності з критерієм «В» в препаратах для місцевого застосування логарифм кількості життєздатних колоній за 14 діб повинен складати не менше 3-х, в подальшому кількість життєздатних колоній не повинна збільшуватись. Логарифм зменшення кількості життєздатних клітин грибів за 14 діб повинен складати не менше 1 і в подальшому не збільшуватись.

Дослідження на мікробіологічну чистоту (відсутність росту умовно-патогенних мікроорганізмів та кількість в 1 мл/ г препараті сапрофітних форм) проводили методом прямого посіву на рідкі живильні середовища. Розливали стерильно у пробірки тіогліколеве середовище та рідке середовище Сабуро по 10,0 мл. У кожну із пробірок вносили по 1 мл (1,0 г) досліджуваного препарату. Посіви інкубували 28 днів на тіогліколевому середовищі у термостаті при температурі 35^0С, посіви на рідкому середовищі Сабуро при температурі 25^0С. [6,7].

Результати та їх обговорення

Випробування на мікробіологічну чистоту проводили методом прямого посіву на рідкі живильні середовища. Дані представлені в таблиці 1.

Таблиця 1 - Випробування препаратів на мікробіологічну чистоту

Препарати	**Умови культивування (розведення препаратів в буфері 1:5)**	
	тіогліколеве середовище 14 днів при 35^0С	**рідке середовище Сабуро 14 днів при 25^0С**
"Фітопрост"	ріст мікроорганізмів	немає зростання
"Тамсулопрост"	ріст мікроорганізмів	немає зростання

Дані таблиці 1 наглядно демонструють, що після 14 днів інкубації при культивуванні на тіогліколевому середовищі, відмічено ріст мікроорганізмів. На середовищі Сабуро росту мікроорганізмів та грибів не спостерігали.

З метою ідентифікації мікроорганізмів стерильно в пробірки розливали тіогліколеве середовище і рідке середовище Сабуро по 9,0 мл. В кожну з пробірок вносили по 1 мл (1 г) досліджуваного препарату. Посіви інкубували 14 днів на тіогліколевому середовищі в термостаті при температурі 35^0С, посіви на рідкому середовищі Сабуро – при температурі 25^0С і висівали на живильні середовища через 2 доби, 7 діб, 14 діб. Результати проведених досліджень представлені в таблиці 2.

Як видно з даних таблиці 2, по морфології колоній і біологічним властивостям виділені мікроорганізми можна віднести до роду *Bacillus sp*. На диференціальних середовищах (середовище Чистовича, Эндо, живильний агар с дефібринованою кров'ю) зростання мікроорганізмів кишкової групи і патогенних стафілококів не спостерігалось.

Таблиця 2 - Ідентифікація мікроорганізмів при дослідженні на мікробіологічну чистоту

Препарати	**Зростання мікроорганізмів на живильних середовищах**				
	Чисто вича	**Ендо**	**Кров'яний агар**	**Сабуро**	**Живильний агар**
"Фітопрост"	х	х	ріст мікроорганізмів	х	ріст мікроорганізмів
"Тамсулопрост"	х	х	ріст мікроорганізмів	х	ріст мікроорганізмів

Примітка: х - ріст мікроорганізмів відсутній.

Annals of Mechnikov Institute, N 1, 2014
www.imiamn.org.ua /journal.htm

При дослідженні методом глибокого посіву, який полягає в додаванні препарату в кількості 1,0 г (або 1,0 мл) в агар і поверхневого посіву (1,0 г) на агар визначали кількість життєздатних клітин мікроорганізмів і грибів. Дані експерименту представлені в таблиці 3.

Таблиця 3 - Дослідження на мікробіологічну чистоту методом прямого посіву на чашках

Препарати	**Кількість мікроорганізмів за десятичним логарифмом ступеню зростання при культивуванні на твердих живильних середовищах**			
	Метод глибокого посіву 1 г (мл) препарату (х10)		**Метод поверхневого посіву 1 г(мл) препарату (х10)**	
	Живильний агар 35^0C 3 доби	**Сабуро 25^0C 5 діб**	**Живильний агар 35^0C 3 діб**	**Сабуро 25^0C 5 діб**
"Фитопрост"	$1,5x10^2$	ріст грибів відсутній	$1,3x10^2$	ріст грибів відсутній
"Тамсулопрост"	$1,7x10^2$	ріст грибів відсутній	$1,8x10^2$	ріст грибів відсутній

Дані таблиці 3 показують, що дослідження при глибокому та поверхневому посіву препаратів на чашках Сабуро показали відсутність росту грибів. При культивуванні на живильному агарі було відмічено ріст мікроорганізмів, але їх кількість на 1 г препарату не перевищує 10^3 КОЕ/мл, що відповідає вимогам ДФУ.

З метою оцінки антимікробної активності у вигляді логарифму зменшення кількості життєздатних бактерій, кожний препарат інокулювали певною кількістю тест-штамів. Облік проводили на 2, 7, 14 і 28 добу. Критерієм оцінки антибактеріальної ефективності консервантів вважали зменшення кількості життєздатних колоній клітин мікроорганізмів за певний період після контамінації.

В таблицях 4 і 5 наведено критерій оцінки антимікробної активності у вигляді логарифму зменшення кількості життєздатних бактерій.

Таблиця 4 - Ефективність супозиторіїв "Фітопрост"

Експозиція	**Вимоги ДФУ**		**Логарифм кількості мікроорганізмів**		
	Кількість бактерій КОЕ/мл Lg зменшення	**Кількість грибів КОЕ/мл Lg зменшення**	***Staphylococcus aureus ATCC 6538***	***Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027***	***Candida albicans ATCC 885/653***
Мікробне навантаження	10^6	10^6	5,44	5,74	5,39
Первинний посів Lg	-	-	0,74	1,04	0,68
2 доби	2	-	2,95	2,51	1,07
7 діб	3	-	НВ	4,44	3,31
14 діб	-	2	НВ	НВ	НВ
28 діб	НЗ	НЗ	НВ	НВ	НВ

*НЗ – мікроорганізми не збільшуються;
*НВ – мікроорганізми не виділяються.

Як видно з даних таблиці 4, на 7-у добу культивування логарифм числа життєздатних клітин грибів складає 3,31 для *Candida albicans*. На 14-у і 28-у добу життєздатні клітини *Candida albicans* не виявлялись. Після 2-ї доби культивування логарифм числа колоній мікроорганізмів складає 2,95 для *Staphylococcus aureus* і 2,51 для *Pseudomonas aeruginosa*. На 7-у добу для *Pseudomonas aeruginosa* логарифм числа життєздатних клітин складає 4,44. На 7-у, 14-у і 28-у добу інкубації колонії *Staphylococcus aureus* не виявлялись.

Дослідження данного зразка супозиторіїв показало, що він відповідає критерію «А», згідно вимогам ДФУ.

Таблиця 5 - Ефективність супозиторіїв "Тамсулопрост"

Експозиція	Вимоги ДФУ		Логарифм кількості мікроорганізмів (КОЕ/мл)		
	Кількість бактерій КОЕ/мл Lg зменшення	**Кількість грибів КОЕ/мл Lg зменшення**	***Staphylococcus aureus ATCC 6538***	***Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027***	***Candida albicans ATCC 885/653***
Мікробне навантаження	10^6	10^6	5,44	5,74	5,39
Первинний посів Lg	-	-	0,59	0,67	0,69
2 доби	2	-	2,91	2,3	1,9
7 діб	3	-	4,44	4,44	3,16
14 діб	-	2	НВ	НВ	3,7
28 діб	НЗ	НЗ	НВ	НВ	НВ

*НЗ – мікроорганізми не збільшуються;
*НВ – мікроорганізми не виділяються.

Дані таблиці 5 наглядно ілюструють, що після 7-и діб культивування логарифм кількості життєздатних клітин грибів *Candida albicans* складає 3,16. Клітини грибів реєструвались на 14-у добу культивування (3,7). На 2-у добу культивування логарифм числа життєздатних клітин мікроорганізмів (*Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*) більше 2-х і складає 2,91 і 2,3. На 7-у добу логарифм дорівнює 4,44. На 14-у і 28-у добу інкубації мікроорганізми не реєструються. На 28-у добу клітини грибів і мікроорганізмів не виділяються. Результати досліджень даного зразка супозиторіїв показали, що він відповідає критерію «А» згідно вимогам ДФУ.

Висновки

1. Результати випробувань на мікробіологічну чистоту дослідних зразків ректальних супозиторіїв "Фітопрост" і "Тамсулопрост" для лікування захворювань передміхурової залози показали, що життєздатних клітин грибів не виявлені, кількість життєздатних клітин мікроорганізмів не перевищувала 10^3 КОЕ/мл в 1 г препарату, що відповідає показникам норми.
2. Згідно результатів досліджень штами *S. aureus, P aeruginosa* , а також представники сімейства *Enterobacteriacea sp*. не виявлені.
3. Проведені дослідження ефективності антимікробних консервантів, згідно яким доведено, що дослідні зразки відповідають критерію «А» за вимогами Державної Фармакопеї України.
4. Виходячи з результатів проведених досліджень, зразки супозиторіїв "Фітопрост" і "Тамсулопрост" за мікробною чистотою відповідають вимогам Державної Фармакопеї України.

References

1. Alyaev U.G., Vinarov A.Z., Locshin K.L., Spivac L.G. The choice of treatment for patients with benign prostatic hyperplasia: Monograph. - Kostroma: OAS "Kostroma", 2005. - 175 p.
2. Barry MJ, Meleth S, Lee JY, et al. Effect of increasing doses of saw palmetto extract on lower urinary tract symptoms: a randomized trial. JAMA. 2011;306(12). P. 1344-1351.
3. Guidelines "Study of the specific activity of antimicrobial medicines" Kiev, 2004 – 38 p.
4. Keating G.M. Dutasteride/Tamsulosin: in benign prostatic hyperplasia. Drugs Aging. 2012; 29(5):P. 405-19.
5. Methodological guidelines "Determination of the sensitivity of microorganisms to antibiotics" Ministry of Public Health of Ukraine, Kiev – 2007, № МВ 9.9.5-143-2007.
6. Bacteriological control of culture media. Newsletter Ministry of Public Health of Ukraine № 05.4.1/1670, Kiev, 2001 – 45 p.
7. Vays R.F., Phingelman F. Phytotherapy. - Guide: Tr. from germ. - M.: "Medicine", 2004. - 552 p.

УДК: 615.454.2:616.65:001.891.5

ДОСЛІДЖЕННЯ НА МІКРОБІОЛОГІЧНУ ЧИСТОТУ СУПОЗИТОРІЇВ "ФІТОПРОСТ" І "ТАМСУЛОПРОСТ"

Гриценко В. І., Рубан О. А., Осолодченко Т. П.

Результати випробувань на мікробіологічну чистоту дослідних зразків супозиторіїв "Тамсулопрост" і "Фітопрост" для лікування захворювань передміхурової залози показали, що життєздатних клітин грибів в препаратах не виявлено, кількість життєздатних клітин мікроорганізмів відповідає показникам норми. В ході досліджень на ефективність антимікробних консервантів, встановлено, що дослідні зразки відповідають вимогам Державної Фармакопеї України.

Ключові слова: мікробіологічні дослідження, супозиторії, передміхурова залоза.

УДК: 615.454.2:616.65:001.891.5

ИССЛЕДОВАНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ СУППОЗИТОРИЕВ "ФИТОПРОСТ" И "ТАМСУЛОПРОСТ"

Гриценко В.И., Рубан Е.А., Осолодченко Т.П.

Результаты испытаний на микробиологическую чистоту исследуемых образцов суппозиториев "Тамсулопрост" и "Фитопрост" для лечения заболеваний предстательной железы показали, что жизнеспособных клеток грибов в препаратах не выявлено, количество жизнеспособных клеток микроорганизмов отвечает показателям нормы. В ходе исследований на эффективность антимикробных консервантов установлено, что исследуемые образцы отвечают требованиям Государственной Фармакопеи Украины.
Ключевые слова: микробиологические исследования, суппозитории, предстательная железа.

UDC: 615.454.2:616.65:001.891.5

RESEARCH ON MICROBIOLOGICAL PURITY OF “PHYTOPROST” AND “TAMSULOPROST” SUPPOSITORIES

Gritsenko V.I., Ruban O.A., Osolodchenko T.P.

Results of the tests on microbiological purity of the test samples of "Tamsuloprost" and "Phytoprost" suppositories for the treatment of prostate diseases have shown that no viable cells of fungi were found in the preparations, the number of viable cells of microorganisms is within a norman rate. Studying the effectiveness of antimicrobial preservatives it was found that the test samples meet criterion of the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine.
Keywords: microbiological testing, suppositories, prostate.