

## БІОЛОГІЧНІ ВИПРОБУВАННЯ СТОМАТОЛОГІЧНИХ ФІТОЗАСОБІВ

Мацюк О. Д., Калюжная О. С., Вишне夫ська Л. І.

Національний фармацевтичний університет, м.  
Харків, Україна

**Вступ.** На сьогоднішній день у стоматології залишається актуальною проблема нестачі вітчизняних ефективних та безпечних лікарських засобів [1, 2]. Увагу розробників приваблюють стоматологічні фітозасоби через можливість поєднання різних груп біологічно активних речовин, що, у свою чергу, забезпечуватиме широкий спектр фармакологічної активності препарату; крім цього такі засоби володіють низькою токсичністю та незначним ризиком виникнення алергічних реакцій [3, 4].

На основі теоретичного обґрунтування та експериментальних досліджень, враховуючи мультисимптомність означених захворювань, нами було розроблено мазь емульсійну для лікування ангуліту та ополіскувач для порожнини рота для застосування при галітозі із поєднанням низки видів лікарської рослинної сировини, що створює передумови для розширення і посилення бажаного терапевтичного ефекту та багатоаспектності їх дії [3]. Препарати виготовляли на основі екстракту лопуха великого коренів рідного та хвощу польового, шавлії лікарської, цикорію дикого, подорожника великого, календули лікарської (ополіскувач для рота), та екстракту лопуха великого коренів густого дуба звичайного, календули лікарської, ефірної олії герані болотної та ефірної олії чайного дерева (мазь).

Серед показників, що характеризують якість препаратів та визначаються протягом фармацевтичної розробки, є мікробіологічна чистота, адже присутність мікроорганізмів у нестерильних препаратах може викликати зміни їх фізико-хімічних властивостей, зменшення або інактивацію терапевтичної дії, ризик інфікування споживача при контамінації препарату патогенною мікрофлорою [5].

Також важливим є контроль токсичності препарату, що зазвичай проводять на етапі доклінічних досліджень при визначенні його нешкідливості, використовуючи як моделі лабораторних тварин [6]. Останнім часом спостерігається тенденція заміни лабораторних тварин на інші адекватні біологічні моделі, зокрема біотестування на найпростіших [7, 8]. Доведено, що результати визначення токсичності препарату отриманні за допомогою найпростіших, мають високий коефіцієнт кореляції із даними подібних випробувань на мишах, пацюках, кролях та інших тваринах [8, 9].

Тому у фармацевтичній розробці стоматологічних фітозасобів, одним із напрямів наших експериментальних досліджень було проведення біологічних випробувань, зокрема аналізу мікробіологічної чистоти та визначення нешкідливості.

**Метою** роботи було дослідження мікробіологічної чистоти та визначення нешкідливості розроблених стоматологічних фітозасобів для лікування ангуліту та галітозу.

### Матеріали та методи

У випробуваннях використовували дослідні зразки розроблених фітозасобів - мазі емульсійної для лікування ангуліту (дослідний зразок 1) та ополіскувача для порожнини рота для застосування при галітозі (дослідний зразок 2).

Випробування мікробіологічної чистоти нестерильних лікарських засобів проводили згідно з методами, наведеними в загальних статтях ДФУ 2.0 [10]. Під час підготовки до проведення випробувань та власне випробувань використовували середовища, рекомендовані ДФУ: для підготовки тест-штамів бактерій та тест-штамів грибів - соєво-казеїновий бульйон та Сабуро-декстрозний бульйон, відповідно; для визначення ТАМС та ТУМС - соєво-казеїновий агар та Сабуро-декстрозний агар, відповідно; для випробування на окремі види мікроорганізмів *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa* - манітно-сольовий агар та цетримідний агар, відповідно.

Згідно вимог ДФУ проводили перевірку стерильності живильних середовищ, розчинника, ростових властивостей живильних середовищ та перевірку придатності методики визначення загального числа життєздатних клітин. Контролем при визначенні ростових якостей середовища служить стандартне середовище з гарантованими ростовими властивостями, на якому правильно проявляється кількісне та якісне зростання мікроорганізмів (морфологія колоній). Перевірка придатності методики визначення загального числа життєздатних клітин полягає у порівнянні результатів підрахунку числа тест-мікроорганізмів, отриманих в присутності випробуваного препарату і на контрольних висіваннях. Нейтралізацію антибактеріальних властивостей досліджуваних зразків проводили розведенням розчинником буферним розчином із натрію хлоридом та петоном рН=7,0 із інактиваторами 3 % полісорбату-80, 0,3 % лецитину, 0,1 % гістидину гідрохлориду.

При випробуванні мікробіологічної чистоти дослідних зразків використовували метод поверхневого висівання у чашки Петрі з соєво-казеїновим агаром (для ТАМС) та Сабуро-декстрозним агаром (для ТУМС). Для кожного розведення зразка готували по 2 чашки Петрі з кожним живильним середовищем. Чашки з соєво-казеїновим агаром інкубували при температурі 30-35 °С 3-5 діб, чашки з Сабуро-декстрозним агаром інкубували при температурі 20-25 °С 5-7 діб. Для кожного живильного середовища обчислювали середнє арифметичне значення числа колоній та визначали число КУО в 1 мл зразка.

Згідно ДФУ 2.4 критерії прийнятності, що базуються на загальному числі аеробних мікроорганізмів (ТАМС) і загальному числі дріжджових та плісневих грибів (ТУМС), наступні:

ТАМС не повинне перевищувати  $10^2$  КУО/г, ТУМС -  $10^1$  КУО/г. Також проводили випробування на відсутність *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa* [11].

Біотестування проводили на біологічній моделі монокультури клітин *Paramecium caudatum*, які мають малий життєвий цикл, високу швидкість розмноження, легко культивуються, що дозволяє відстежити їх реакцію на вплив препарату в ряді поколінь за короткий час [8, 12]. Інфузорії вирощували в живильному середовищі Лозина-Лозинського при температурі  $22 \pm 2$  °С, використовуючи для живлення дріжджову суспензію.

Для контролю токсичності препарату оцінювали вплив дослідних зразків на фізіологічних функцій культури (тест-параметр): зміна рухомості, загибель організму та швидкість розмноження (відмінність у концентрації живих клітин у дослідних та контрольній пробах). Оцінку зміни фізіологічних функцій інфузорій потрібно проводити в комплексі, так як функція зміни рухомості сумісно з функцією хемотаксису може збільшити наочність експерименту, загибель окремих клітин - надійніша реакція, але при її використанні неможливо виявити низькі концентрації токсикантів, тому для виявлення низьких концентрацій використовують тест-реакцію зниження швидкості розмноження, а для оцінки тривалої дії малих концентрацій діючих речовин може слугувати загибель експериментальних монокультур за визначений період часу (у хронічному досліді 72-96 год) [8]. Облік тест-параметрів здійснювали мікроскопуванням з використанням лічильної камери. Якщо токсичний ефект виявлено, то сила його прояву встановлюється виходячи з мінімального розведення, при якому даний токсичний ефект проявляється. Якщо тест-параметр не перевищений за жодного розведення (і у варіанті з нерозбавленою пробєю), то проба вважається нетоксичною [7, 9].

Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методиками та згідно вимог ДФУ [10, 11, 13].

### Результати та обговорення

Першим етапом біологічних випробувань засобу було аналіз мікробіологічної чистоти з метою визначити, чи відповідає препарат вимогам щодо мікробіологічної чистоти наведеним в ДФУ 2.4 статті 5.1.4.

Перед початком досліджень проводили перевірку ростових властивостей живильних середовищ. Результати перевірки ростових властивостей живильних середовищ (таблиця 1) показали, що вони відповідали за ростовими властивостями та витримували випробування на стерильність згідно вимог ДФУ 2.0, п. 2.6.12., а тест-мікроорганізми відповідали таксономічній характеристиці - морфологія колоній на середовищах та морфологія клітин при мікроскопуванні були типовими для відповідного штаму.

Перевірку придатності методики визначення загального числа життєздатних мікроорганізмів

здійснювали для дослідних зразків у розведенні 1:10 розчинником буферним розчином із інактиватором. Результати, одержані при підрахунку кожного з тест-мікроорганізмів у присутності та за відсутності обох випробовуваних зразків (таблиця 2), відрізняються не більше як у 1,12 разів (максимальне значення серед всіх значень), що відповідає критерію прийнятності (за вимогами має відрізнятися не більше ніж в 2 рази). Таким чином, метод поверхневого висівання на чашки по 1 мл з розведенням дослідних зразків 1:10 з інактиватором придатний для визначення кількості мікроорганізмів у 1 мл препарату та може використовуватися при проведенні випробування.

При випробуванні мікробіологічної чистоти дослідних зразків використовували метод поверхневого висівання у чашки Петрі з соєво-казеїновим агаром (для ТАМС) та Сабуро-декстрозним агаром (для ТУМС). Готували зразки, використовуючи методику, придатність якої була доведена. Дослідні зразки розроблених фітозасобів зберігали при кімнатній температурі, контроль мікробіологічної чистоти здійснювали кожні 6 місяців. Випробування мікробіологічної чистоти (таблиця 3) стоматологічних фітозасобів показало, що для кожного зразка загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) не більше  $10^2$  КУО/г, загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) не більше 10 КУО/г, не виявлено *P. aeruginosa* та *S. aureus* в 1 г, що відповідає вимогам ДФУ. На другому етапі біологічних випробувань проводили визначення нешкідливості дослідних зразків стоматологічних фітозасобів шляхом контролю їх токсичності при біотестуванні на моделі монокультури клітин *Paramecium caudatum*. Коли в клітину інфузорії потрапляє речовина, то вона стає сильно збудженою або навпаки менш рухливою, втрачає орієнтацію в просторі, змінює форму та розмір тіла, внаслідок токсичності дії порушуються функції поділу, потім клітини сповільнюються та гинуть. Досліджуючи зразки стоматологічних фітозасобів, звертали увагу на попередньо перераховані ознаки, які використовуються в якості основних тест-реакцій.

Контроль токсичності дослідних зразків стоматологічних фітозасобів шляхом біотестування (таблиця 4) показав, що культура *P. caudatum* була життєздатна при додаванні всіх зразків до культурального середовища протягом всього часу спостереження, характер руху клітин залишався у межах фізіологічної норми, швидкість розмноження клітин була вище, ніж в контролі, тобто тест-параметри не перевищені у нерозведених пробах. Таким чином, можна вважати, що дослідні зразки є нетоксичними.

### Висновки.

1. Результати дослідження зразків стоматологічних фітозасобів - мазі емульсійної для лікування ангуліту та ополіскувача для порожнини рота для застосування при галітозі, які зберігали за температури  $25 \pm 2$  °С упродовж 27 міс, за показником «мікробіологічна чистота» свідчать, що для кожного зразка загальне число аеробних

мікроорганізмів (ТАМС) не перебільшує  $10^2$  КУО/г, загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) не перебільшує 10 КУО/ г, не виявлено *P. aeruginosa* та *S. aureus* у 1 г, що відповідає вимогам ДФУ.

2. Контроль токсичності зразків розроблених стоматологічних фітозасобів шляхом біотестування на клітинах *P. caudatum* показав високі значення спостережуваних тест-параметрів - високі рухову активність клітин та швидкість їх розмноження, що свідчить про нетоксичність фітозасобів.

**Таблиця 1. Перевірка ростових властивостей живильних середовищ**

Тест-мікроорганізми	Живильні середовища	Умови культивування		Висновки
		температура, °С	тривалість, год	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Соєво-казеїнове	30-35	24-72	морфологія колоній та клітин типова
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Соєво-казеїнове	30-35	24-72	морфологія колоній та клітин типова
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Соєво-казеїнове	30-35	24-72	морфологія колоній та клітин типова
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Сабуро-декстрозне	20-25	24-120	морфологія колоній та клітин типова
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Сабуро-декстрозне	20-25	24-120	морфологія колоній та клітин типова
-	Соєво-казеїнове	30-35	24-72	зростання мікроорганізмів відсутнє
-	Сабуро-декстрозне	20-25	24-120	зростання мікроорганізмів відсутнє

**Таблиця 2. Перевірка придатності методики визначення загального числа життєздатних мікроорганізмів**

Назва зразка	Середнє число КУО в 1 мл зразка				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
Суспензія мікроорганізмів дослідний зразок 1 +	91	79	70	70	85
Суспензія мікроорганізмів дослідний зразок 2 +	88	81	68	67	82
Контрольна суспензія мікроорганізмів	96	85	72	75	88

**Таблиця 3. Випробування дослідних зразків стоматологічних фітозасобів на мікробіологічну чистоту**

Термін зберігання	Дослідний зразок 1 (мазь)				Дослідний зразок 2 (ополіскувач)			
	Загальна кількість, КУО/мл				Загальна кількість, КУО/мл			
	ТАМС	ТУМС	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	ТАМС	ТУМС	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Безпосередньо після виготовлення	менше 50	менше 10	Відсутні	Відсутні	менше 50	менше 10	Відсутні	Відсутні
Через 6 міс. зберігання	менше 50	менше 10	Відсутні	Відсутні	менше 50	менше 10	Відсутні	Відсутні
Через 12 міс. зберігання	менше 50	менше 10	Відсутні	Відсутні	менше 50	менше 10	Відсутні	Відсутні
Через 18 міс. зберігання	менше 50	менше 10	Відсутні	Відсутні	менше 50	менше 10	Відсутні	Відсутні
Через 24 міс. зберігання	менше 50	менше 10	Відсутні	Відсутні	менше 50	менше 10	Відсутні	Відсутні
Через 27 міс. зберігання	менше 50	менше 10	Відсутні	Відсутні	менше 50	менше 10	Відсутні	Відсутні

**Таблиця 4. Контроль токсичності дослідних зразків стоматологічних фітозасобів шляхом біотестування**

Дослідні зразки	Кількість клітин <i>P. caudatum</i>		Характер руху <i>P. Caudatum</i>	
	вихідна кількість	на 72 год спостереження	на початок спостереження	на 72 год спостереження
Зразок 1 (мазь)	5-10	більше 100	сповільнений рух	активний рух
Зразок 2 (ополіскувач)	5-10	більше 100	сповільнений рух	активний рух
Контроль (вода очищена)	5-10	30-40	активний рух	активний рух

**Biological testing of stomatological phytomedicines**  
**Matsiuk K. D., Kaliuzhnaia O. S., Vyshnevska L. I.**

**Introduction.** Taking into account the lack of complex stomatological phytomedicines on the domestic pharmaceutical market, the composition and technology of compositions with a combination of several types of medicinal plant raw materials were developed, which creates prerequisites for expanding and strengthening the desired therapeutic effect. On the basis of theoretical reasoning and experimental studies, we developed an emulsion ointment for the treatment of angulitis and a mouth rinse for use in halitosis. During the pharmaceutical development of dental phytoremedies, one of the directions of our experimental research was conducting biological tests, in particular the analysis of microbiological purity and the determination of harmlessness. **The purpose of the work** was to study the microbiological purity and determine the harmlessness of the developed stomatological phytomedicines for the treatment of angulitis and halitosis. **Materials and methods.** In the tests, experimental samples of the developed phytomedicines were used - emulsion ointment for the treatment of angulitis and mouth rinse for use in halitosis. Testing of microbiological purity of non-sterile medicinal products was carried out according to the methods given in the general articles of SPU 2.0. In accordance with the requirements of the SPU, the sterility of the nutrient media, the solvent, the growth properties of the nutrient media, and the suitability of the method for determining the total number of viable cells were checked. Biotesting was carried out on the biological model monoculture of *Paramecium caudatum*. Infusoria were grown in the Lozyn-Lozynsky nutrient medium at a temperature of  $22 \pm 2$  °C, using yeast suspension for nutrition. To control the toxicity of the drug, the effect of the test samples on the physiological functions of the culture was evaluated: change in motility, death of the organism and the rate of reproduction. **Results and discussion.** The results of testing the growth properties of the nutrient media showed that they met the growth properties and passed the sterility test in accordance with the requirements of SPU 2.0, and the test microorganisms met the taxonomic characteristics - the morphology of the colonies on the media and the morphology of the cells under microscopy were typical for the corresponding strain. The results of testing the suitability of the method for determining the total number of viable microorganisms showed that the method of surface seeding on 1 ml cups with a 1:10 dilution of test samples with an inactivator is suitable for determining the number

of microorganisms in 1 ml of the drug and can be used during testing. The microbiological purity test of stomatological phytomedicines showed that for each sample Total aerobic microbial count was no more than  $10^2$  CFU/g, the Total yeast and mold count was no more than 10 CFU/g, *P. aeruginosa* and *S. aureus* weren't detected in 1 g, which meets the requirements of the SPU. Control of the toxicity of experimental samples of stomatological phytomedicines by means of biotesting showed that the experimental samples are non-toxic.

**Conclusions.** 1. The results of the study of samples of stomatological phytomedicines - emulsion ointment for the treatment of angulitis and mouth rinse for use in halitosis, which were stored at a temperature of  $25 \pm 2$  for 27 months, according to the "microbiological purity" indicator, show that for each sample TAMC does not exceed  $10^2$  CFU/g, TYMC does not exceed 10 CFU/g, *P. aeruginosa* and *S. aureus* weren't detected in 1 g, which meets the requirements of the DFU. 2. Toxicity control of samples of developed stomatological phytomedicines by means of biotesting on *P. caudatum* cells showed high values of the observed test parameters - high motor activity of cells and the rate of their reproduction, which indicates the non-toxicity of phytoremedies.

**Keywords:** stomatological phytomedicines, the microbiological purity, biotesting

**References:**

1. Betzenna, T.S., Development of the composition and technology of the dental phytoremedial agent. Abstract of the dissertation for the degree of Candidate of Pharmaceutical Sciences, Kharkiv, 2016. 25 p.
2. Bicak, D. A., A Current Approach to Halitosis and Oral Malodor. A Mini Review. Open Dent. J. 2018. N 12. P. 322-330. <https://doi.org/10.2174/1874210601812010322>
3. Bogatu, S. I., Possibilities of phytotherapy in the complex treatment of halitosis. The VIII th International scientific and practical conference «Modern problems in science», November 09-12, 2020, Prague, Czech Republic. P. 521-525.
4. Gudz, N.I., Vlasenko, I.O., Development of the composition and technology of therapeutic and preventive toothpaste with antimicrobial and deodorizing properties. Pharmaceutical journal, 2021.Vol. 76. N. 2. P. 36-47. DOI: 10.32352/0367-3057.2.21.04
5. Lyapunov M., Bezugla O., Solovyov O. and others. Guidelines ST-N MOZU 42-4.2. 2011. Medicines. Quality risk management (ICH Q9). Kyiv. Ministry of Health of Ukraine. 2011. 26 p.
6. Lyapunov O., Bezugla Y., Pidpruzhnikov K., Zhemerova O., Solovyov N., Takhtaulova K. Guideline

- 42-3.0:2011. Medicines. Pharmaceutical development (ICH Q8). ed. M. Ministry of Health of Ukraine. 2011. 42 p.
7. Kordon T. I. Use of unicellular algae as indicator test systems for cytotoxicity determination. *Scientific Bulletin of Uzhgorod University: Series. Biology. Uzhhorod. Publishing House of UzhNU Hoverla*. 2012. Issue 32. P. 172–175.
8. Stepchenko L. M., Kryvaya O. A., Chumak V. O. Determination of the level of safety of Humilid during biotesting at ciliates. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*. 2020. 7(4). P. 210-214. doi: 10.32819/2019.74037
9. Illing R., Burkart C., Pfitzner D., et al. Ecotoxicity assessment using ciliate cells in millifluidic droplets. *Biomicrofluidics*. 2016. 10(2). 024115. doi: 10.1063/1.4944869
10. State Pharmacopoeia of Ukraine: in 3 v. State «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Centre for Quality of Medicines». 2nd edition. Kharkiv. State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Centre for Quality of Medicines». 2015. V. 1. 1128 p.
11. State Pharmacopoeia of Ukraine. State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Centre for Quality of Medicines». 2-nd edition. Addition 4. Kharkiv. State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Centre for Quality of Medicines». 2020. 600 p.
12. Fedorovska M. I., Polovko N. P., Strilets O. P. Study of antioxidant properties of dermatocosmetic products with plant substances on the biological model of *Paramecium caudatum*. *Ukrainian biopharmaceutical journal*, N. 2 (55). 2018. P. 22-25.  
<https://doi.org/10.24959/ubphj.18.165>
13. Yerina A. M. *Statistical modeling and forecasting: Teaching manual*. K. KNEU. 2001. 170 p.