

УДК 615.242:615.076.7-615.454.12

**БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА  
СТОМАТОЛОГИЧЕСКОГО ГЕЛЯ «ЭСТОФИТ ДЕНТА»****Воробьева В.М., Юрова В.А., Карабасова Е.Б., Жариков В.Н.***ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации, Барнаул, e-mail: vmv@agmu.ru*

Изучено высвобождение бензокаина из стоматологического геля «Эстофит Дента» на приборе «лопасть над диском». Установлено, что введение в среду высвобождения этанола в качестве имитатора липофильной фазы в концентрации 20% увеличивает высвобождение бензокаина с 40 до 70%. Микробиологическая оценка стоматологического геля проведена методом прямого контакта, который является модификацией метода серийных разведений, на 3 штаммах *Staphylococcus aureus*, 3 штаммах *Staphylococcus epidermidis*, 3 штаммах *Klebsiella*, 3 штаммах *Echerichia coli*, 6 штаммах *Candida*. Выявлено, что исследуемый экспериментальный препарат через 3 часа экспозиции обеспечивает подавление роста *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella* на 99,9%, *Echerichia coli* – 32,2%, *Candida* – 58,6%. После 24 часов контакта с гелем «Эстофит Дента» погибает 100% стафилококков; 99,9% клебсиелл и дрожжеподобных грибов рода *Candida*; 78,7% кишечной палочки. Стоматологический гель «Эстофит Дента» обеспечивает пролонгированное высвобождение бензокаина и проявляет выраженный антимикробный эффект в отношении клинических штаммов грампозитивных микроорганизмов: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*; грамотригативных палочек *Klebsiella pneumoniae*; дрожжеподобных грибов *Candida albicans*; умеренное антибактериальное действие в отношении *Echerichia coli*.

**Ключевые слова:** биофармацевтические методы, высвобождение, микробиология, стоматологический гель**BIOPHARMACEUTICAL AND MICROBIOLOGICAL EVALUATION  
OF DENTAL GEL «ESTOFIT DENTA»****Vorobyeva V.M., Yurova V.A., Karabasova E.B., Zharikov V.N.***Altai State Medical University, Barnaul, e-mail: vmv@agmu.ru*

Release benzocaine of dental gel «Estofit Denta» on the device «Paddle over disk» has been studied. It is established that their introduction into the environment of the release of ethanol as a simulator lipophilic phase at a concentration of 20% increases the release of benzocaine from 24 to 70%. Microbiological estimation of dental gel carried out by direct contact, which is a modification of the method of serial dilutions, 3 strains of *Staphylococcus aureus*, 3 strains of *Staphylococcus epidermidis*, 3 strains of *Klebsiella*, 3 strains *Echerichia coli*, 6 strains of *Candida*. It is established that the study an experimental drug after 3 hours of exposure suppresses the growth of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella* 99,9%, *Echerichia coli* – 32,2%, *Candida* to 58,6%. After 24 hours of contact with the gel «Estofit Denta» dies 100% of staphylococci; 99,9% of klebsiell and yeast-like fungi of the genus *Candida*; 78,7% of *Escherichia coli*. Dental gel «Estofit Denta» prolonged release benzocaine or exhibits a pronounced antimicrobial effect against clinical strains of gram-positive microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*; gram-negative rods *Klebsiella pneumoniae*; yeastlike fungi of *Candida albicans*; moderate antibacterial action against *Echerichia coli*.

**Keywords:** biopharmaceutical methods, release, microbiology, dental gel

Применение полимеров в фармацевтической технологии обусловило создание стоматологических пленок и гелей, обеспечивающих пролонгированное высвобождение лекарственных средств обезболивающего, антимикробного, противовоспалительного действия [8]. В результате совместных исследований кафедр фармацевтической технологии и микробиологии АГМУ в соответствии с принципами конструирования лекарственных препаратов для лечения заболеваний пародонта предложен состав экспериментального стоматологического геля, который получил условное название «Эстофит Дента». Действующими компонентами геля являются настойка календулы как противовоспалительное и антибактериальное средство и анестетик бензокаин. В качестве полимера-носителя в результате биофармацевтических исследований методом диализа выбран аквасорб А 380 [1, 5].

Определение фармацевтической доступности лекарственных препаратов по тесту «Растворение» традиционно используется при оценке качества пероральных лекарственных форм. Зарубежные фармакопеи предлагают использовать тест «Растворение» на приборе «лопасть над диском» для изучения кинетики высвобождения из пролонгированных лекарственных форм: трансдермальных пластырей и других трансдермальных систем, мазей, кремов и т.д. Принимая во внимание тот факт, что стоматологические гели должны обеспечивать пролонгированное высвобождение лекарственных веществ, изучение профилей высвобождения бензокаина из экспериментального препарата представляется актуальным. Другим требованием, которому должны отвечать стоматологические лекарственные препараты, является антимикробное действие в отношении широкого круга

микроорганизмов, обитающих в ротовой полости.

**Целью данной работы** являлась изучение профилей высвобождения бензокаина на приборе «лопасть над диском» и оценка антимикробной активности стоматологического геля «Эстофит Дента».

**Материалы и методы исследования**

Высвобождение бензокаина из стоматологического геля «Эстофит Дента» изучали методом Transdermal delivery system на приборе «Лопасть над диском» [3, 6]. Навеску геля (1,0 г) помещали в экстракционную ячейку, диаметр поверхности которой составлял 44 мм, и на ячейку закрепляли полупроницаемую мембрану. Ячейку погружали в диализную среду и опускали лопастьную мешалку так, чтобы между ячейкой и мешалкой расстояние составляло  $25 \pm 2$  мм. В качестве акцепторной среды использовали воду очищенную или спирта этилового растворы в концентрации 10, 15, 20 и 30% при температуре  $37 \pm 1$  °C в объеме 500 мл. На предварительном этапе исследований было установлено, что целлофановая мембрана марки «Купрофан» в спирте этиловом растворе 10, 15, 20 и 30% не теряет свойств полупроницаемости и не разрушается. Частота вращения лопасти составляла 50 об/мин. Отбор проб проводили через равные интервалы времени в объеме 5 мл, восполняя объем акцепторной средой. Оптическую плотность снимали на спектрофотометре Сору-50 при длине волны 284 нм (максимум поглощения бензокаина). Расчеты проводили с использованием определенного удельного показателя поглощения бензокаина при данной длине волны  $A_{1\text{см}}^{1\%} = 967,06 \pm 37,38$ .

Антибактериальную активность стоматологического геля «Эстофит Дента» оценивали методом прямого контакта, который является модификацией метода серийных разведений, на 18 клинических штаммах микроорганизмов, выделенных от больных и хранящихся в музее кафедры микробиоло-

гии АГМУ. В эксперименте использованы штаммы Staphylococcus aureus 391, Staphylococcus aureus 392, Staphylococcus aureus 393, Staphylococcus epidermidis 486, Staphylococcus epidermidis 385, Staphylococcus epidermidis 387, Klebsiella 171, Klebsiella 172, Klebsiella 404, Echerichia coli 167, Echerichia coli 4711, Echerichia coli 4712, Candida 475, Candida 453, Candida 341, Candida 473, Candida 310, Candida 309, которые населяют полость рта в различные периоды жизни человека [4, 7, 9].

Методика микробиологических исследований заключалась в следующем: культуры тест-микробов выращивали 4 часа при температуре  $37 \pm 2$  °C на сахарном бульоне. Исходная посевная доза составляла 50 млн микробных клеток суточной агаровой культуры. Далее 0,1 мл четырехчасовой бульонной культуры тест-микроба вносили в 1 мл исследуемого геля и параллельно в 1 мл натрия хлорида раствор 0,9% (контрольный опыт). Оптимальное время контакта микроорганизмов с изучаемым экспериментальным препаратом и в контроле составляло 3 и 24 часа. После контакта микроорганизмов с гелем «Эстофит Дента» и изотоническим раствором проводили посеы по 0,1 мл на поверхность мясопептонного агара в виде сплошного газона. Посевы инкубировали в термостате при температуре  $37 \pm 2$  °C в течение 24 часов. Рост культур в результате посевов контрольного опыта принимали за 100% [2].

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием программ Statistica 6.1 и Microsoft Excel. Результаты исследований ( $P = 95\%$ ) обрабатывали при помощи критерия Стьюдента по стандартным методикам ГФ XII изд.

**Результаты исследования и их обсуждение**

Кинетические кривые высвобождения бензокаина из стоматологического геля «Эстофит Дента» на приборе «лопасть над диском» в различные диализные среды представлены на рис. 1.

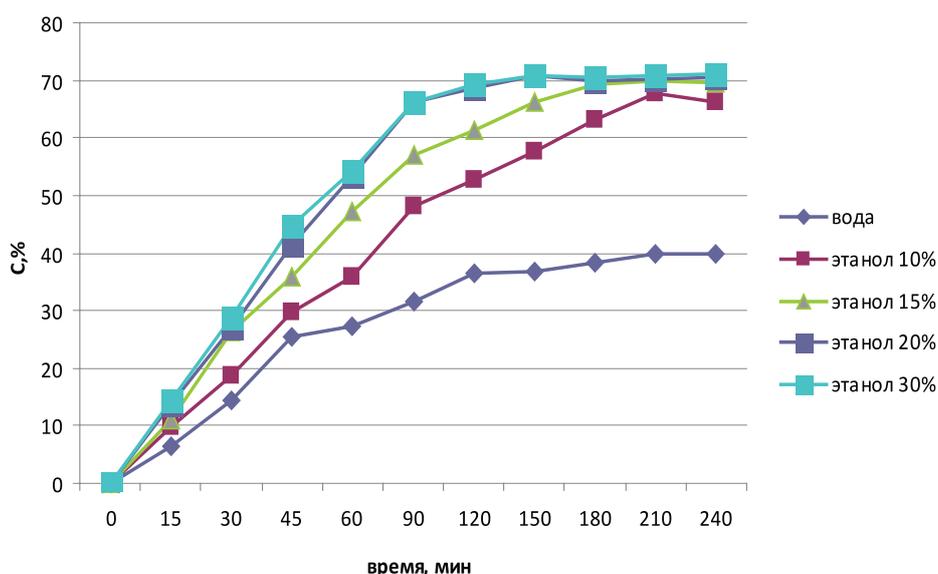


Рис. 1. Кинетические кривые высвобождения бензокаина из геля «Эстофит»Дента» на приборе «лопасть над диском»

Кинетические кривые, представленные на рис. 1, свидетельствуют о пролонгированном характере высвобождения бензокаина из стоматологического геля «Эстофит Дента». При использовании в качестве среды высвобождения воды очищенной из исследуемого препарата высвобождается за 45 мин  $25,54 \pm 1,39\%$ , за 2 часа  $36,37 \pm 1,11\%$ , за 3 часа  $38,45 \pm 2,45\%$  бензокаина. Сравнительный анализ профилей высвобождения бензокаина в воду очищенную и спирта этилового растворовы 10–30% позволяет сделать вывод о том, что введение этанола в состав ацепторной среды увеличивает высвобождение лекарственного вещества. Через 45 мин от начала эксперимента в диализную среду с добавлением 10% этанола высвобождается  $29,67 \pm 1,29\%$ , 15% этанола –  $36,00 \pm 1,08\%$ , 20% этанола –  $41,32 \pm 0,45\%$ , 30% этанола –  $44,76 \pm 0,63\%$  бензокаина соответственно. Более 70% бензокаина высвобождается из геля «Эстофит Дента» в ацепторную среду с добавлением 30% этанола через 2 часа, 20% этанола через 3 часа от начала эксперимента. Таким образом, при изучении профилей растворения бензокаина из стоматологического геля «Эстофит Дента» рационально часть ацепторной среды замещать этанолом.

Результаты микробиологических исследований свидетельствуют о том, что через 3 часа после контакта изучаемого геля с суспензией *Staphylococcus aureus* и последующего посева на мясопептонный агар наблюдался рост единичных ко-

лоний микроорганизмов, представленных *Staphylococcus aureus* 392. После двадцатичетырехчасового контакта с гелем рост всех культур *Staphylococcus aureus* подавлялся полностью, при этом при посеве контролей (натрия хлорида раствор 0,9%) как после 3 часов, так и после 24 часов контакта наблюдался обильный рост стафилококков ( $> 10^4$ ). Подавление роста штаммов *Staphylococcus aureus*, используемых в эксперименте, оценивается на 99,9% через 3 часа и 100% через 24 часа прямого контакта (рис. 2). Рост *Staphylococcus epidermidis* полностью подавлялся экспериментальным препаратом как через 3 часа, так и через 24 часа прямого контакта, в контролях количество колоний превышало  $10^4$ .

Грамотрицательные *Klebsiella pneumoniae* относятся к условно-патогенным микроорганизмам, входят в состав нормальной микрофлоры носоглотки и верхних дыхательных путей и могут в норме обнаруживаться на слизистой полости рта, при снижении иммунитета могут принимать участие в патологических процессах полости рта [7]. После внесения суспензий *Klebsiella pneumoniae* в гель «Эстофит Дента» наблюдался рост единичных колоний штаммов *Klebsiella* 172 и *Klebsiella* 404: 2 и 4 колонии после трехчасового контакта и 2 и 1 колонии после 24 часов контакта соответственно. Антибактериальная активность геля «Эстофит Дента» методом прямого контакта в отношении *Klebsiella pneumoniae* составляет 99,9%.

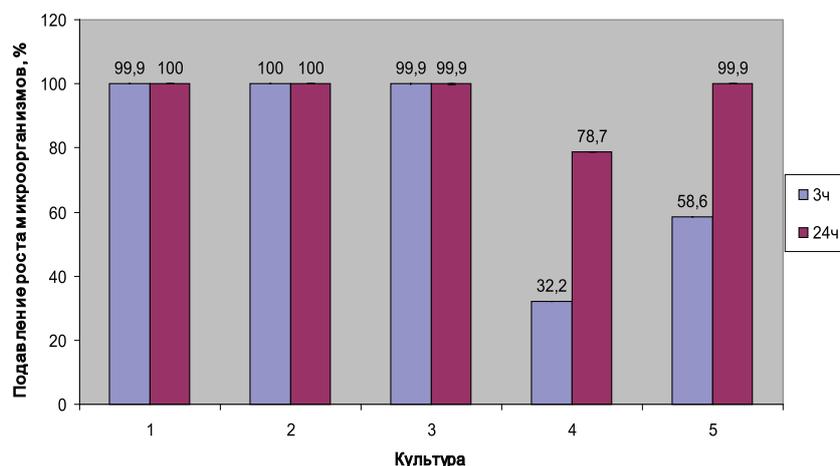


Рис. 2. Подавление роста микроорганизмов экспериментальным препаратом «Эстофит Дента» (метод прямого контакта):

1 – *Staphylococcus aureus*, 2 – *Staphylococcus epidermidis*, 3 – *Klebsiella*, 4 – *Echerichia coli*, 5 – *Candida*

Кишечная палочка является представителем транзиторной (случайной) микрофлоры, тем не менее этот условно-патогенный микроорганизм в некоторых случаях, преимущественно у пожилых людей, может принимать участие в патологических процессах полости

рта [7]. Через 3 часа инкубации было выявлено подавление исследуемым составом роста только одного штамма *Echerichia coli* 167, при этом на агаре наблюдался рост 336 колоний. Другие используемые в эксперименте штаммы обильно росли после 3 часов контакта

с исследуемым гелем. Через 24 часа после внесения в гели суспензий *Echerichia coli* наблюдался рост колоний при высеве всех штаммов, но рост был существенно меньше, чем в контроле (2840 и более 10<sup>4</sup> колоний соответственно). Обобщение полученных данных позволило сделать следующий вывод: антибактериальная активность экспериментального геля «Эстофит Дента» в отношении *Echerichia coli* методом прямого контакта составляет 32,2% через 3 часа, 78,7% – через 24 часа инкубации.

*Candida albicans* – это условно-патогенный микроорганизм, который часто вызывает поражение слизистой полости рта, особенно у грудных детей, а также у пожилых людей, носящих зубные протезы [7]. Антибактериальные свойства экспериментального препарата «Эстофит Дента» определяли по отношению к 6 штаммам *Candida albicans*, при этом в отношении 4 штаммов *Candida albicans* (341, 473, 310, 309) была выявлена выраженная антибактериальная активность. Через 3 часа контакта суспензии *Candida albicans* с экспериментальным препаратом рост микроорганизмов практически полностью отсутствовал, в то время как в контролях наблюдался обильный рост колоний. Через 24 часа контакта суспензии указанных микробов с испытуемым гелем рост дрожжеподобных грибов рода *Candida* также практически полностью отсутствовал, наблюдался рост 3 колоний на агаре штамма *Candida albicans* 475, в контролях с натрия хлоридом раствором изотоническим наблюдался обильный рост. Суммарная антимикробная активность экспериментального стоматологического геля «Эстофит Дента» в отношении *Candida albicans* составляет 58,6% через 3 часа и 99,9% через 24 часа прямого контакта.

### Закключение

В результате проведенных исследований установлено, что стоматологический гель «Эстофит Дента» обеспечивает пролонгированное высвобождение бензокаина и проявляет выраженный антимикробный эффект в отношении клинических штаммов грампозитивных микроорганизмов: коагулазоположительных *Staphylococcus aureus*, коагулазоотрицательных *Staphylococcus epidermidis*; грамнегативных палочек *Klebsiella pneumoniae*; дрожжеподобных грибов *Candida albicans*; умеренное антибактериальное действие в отношении *Echerichia coli*.

### Список литературы

1. Воробьева В.М., Шипунов Н.Н. Методологические подходы к конструированию стоматологических лекарственных препаратов для лечения заболеваний пародонта // Успехи современного естествознания. – 2004. – № 4. – С. 47–48.
2. Изучение антимикробной активности композиций на основе регенкура методом прямого контакта / В.М. Воробьева, Л.А. Крафт, Л.Ю. Бутакова, Е.А. Вичкуткина // Современные проблемы фармакологии и фармации: материалы Всероссийской науч.-практ. конф.: Сб. науч.работ. – Новосибирск, 2005. – С. 6–8.

3. Воробьева В.М., Турецкова В.Ф. Биофармацевтическая оценка лекарственных препаратов: учебно-методич. пособие. – Барнаул: Изд-во ГОУ ВПО «АГМУ», 2009. – 188 с.

4. Вичкуткина Е.А., Воробьева В.М., Крафт Л.А. Сравнительная оценка результатов микробиологического исследования композиций на основе гидрогеля регенкура // Фундаментальные исследования. – 2004. – № 4. – С. 95.

5. Жариков В.Н., Воробьева В.М. Биофармацевтические исследования при разработке стоматологического геля «Эстофит Дента» // Актуальные проблемы фармакологии и фармации: ежегодный сб. научных и метод. работ. – Вып. 10. – Барнаул, 2013. – С. 69–72.

6. Влияние пропиленгликоля на высвобождение полифенольных соединений из гелей сабельника болотного / Е.И. Климова, Н.Б. Демина, В.Ф. Охотникова, О.Л. Сайбель // Фармация. – 2008. – № 8 – С. 30–31.

7. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / под редакц. РАМН В.И. Покровского. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 768 с.

8. Рюмина Т.Е., Голованенко А.Л. Биофармацевтические исследования пленок лекарственных анестезирующего и реминерализирующего действия // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 1; URL: <http://www.science-education.ru/101-5430> (дата обращения: 24. 04. 2013).

9. Фомина И.П., Навашин С.М. Рациональная антибиотикотерапия. – М., 1982. – 284 с.

10. Dissolution test for transdermal patches // European Pharmacopoeia 6.0. – Vol. 1. – P. 275–278.

### References

1. Vorobyeva V.M., Shipunov N.N. Metodologicheskie podhody k konstruirovaniyu stomatologicheskikh lekarstvennykh preparatov dlja lechenija zabolevanij parodonta // Uspеhi sovremennogo estestvoznaniya (*Advances in current natural sciences*). 2004. no. 4. pp. 47–48.

2. Vorobyeva V.M., Kraft L.A., Butakova L.Ju., Vichkutkina E.A. Izuchenie antimikrobnj aktivnosti kompozicij na osnove regenкура metodom prjamoгo kontakta // Sovremennye problemy farmakologii i farmacii: materialy Vserossijskoj nauch.-prakt. konf.: Sb.nauch.rabot (Modern problems of pharmacology and pharmacy). Novosibirsk, 2005. pp. 6–8.

3. Vorobyeva V.M., Tureckova V.F. Biofarmaceuticheskaja ocenka lekarstvennyh preparatov: uchebno-metodich. posobie. Barnaul: Izd – vo GOU VPO AGMU, 2009. 188 p.

4. Vichkutkina E.A., Vorob'eva V.M., Kraft L.A. Sravnitel'naja ocenka rezul'tatov mикrобиологического issledovanija kompozicij na osnove gidrogelja regenкура // Scientific Journal «Fundamental research» (Fundamentalnie issledovaniâ). 2004. no. 4. pp. 95.

5. Zhariков V.N., Vorobyeva V.M. Biofarmaceuticheskie issledovanija pri razrabotke stomatologicheskogo gelja «Jestofit Denta» // Aktual'nye problemy farmakologii i farmacii: ezhegodnyj sb. nauchnyh i metod. rabot. Vypusk 10. Barnaul, 2013. pp. 69–72.

6. Klimova E.I., Demina N.B., Ohotnikova V.F., Sajbel' O.L. Vlijanie propilenglikolja na vysvobozhdenie polifenol'nyh soedinenij iz gelej sabel'nika bolotnogo // Farmacija (Pharmacy). 2008. no. 8 pp. 30–31.

7. Pozdeev O.K. Medicinskaja mikrobiologija (Medical microbiology) / Pod red.akad. RAMN V.I.Pokrovskogo. M.: GEOTAR-MED, 2002. 768 p.

8. Rjumina T.E., Golovanenko A.L. Biofarmaceuticheskie issledovanija plenok lekarstvennyh anestezirujushhego i remineralizirujushhego dejstvija // Sovremennye problemy nauki i obrazovanija (Modern problems of science and education). 2012. no.1; URL: <http://www.science-education.ru/101-5430> (data obrashhenija: 24. 04. 2013).

9. Fomina I. P. Navashin S.M. Racional'naja antibiotikoterapija. M., 1982. 284 p.

10. Dissolution test for transdermal patches // European Pharmacopoeia 6.0. Volume 1. pp. 275–278.

### Рецензенты:

Лампатов В.В., д.б.н., профессор кафедры фармакологии, ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Барнаул;

Федосеева Л.М., д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии с курсом органической и токсикологической химии, ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Барнаул.

Работа поступила в редакцию 19.07.2013.