

ОРИГІНАЛЬНА СТАТТЯ

УДК 616.314.163-74:615.46:678+57.013+579

МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ КОМПОЗИЦІЇ З АРГІНІНОМ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ ІЗ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ПАРОДОНТА

Куваєв О.С., Борисенко А.В., Відерська Г.В., Леснухіна Г.Л.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

Актуальність. Для комплексного лікування хворих на генералізований пародонтит застосовують різноманітні антибактеріальні препарати (антисептики, антибіотики, протигрибкові і антипротозойні препарати), протизапальні препарати, препарати кальцію, антирезорбенти тощо. На сьогоднішній день серед цих засобів привертають увагу препарати, які впливають на метаболізм оксиду азоту. Для клінічного використання була запропонована фармакологічна композиція, що містить кардіоаргінін. Перед клінічним застосуванням даної композиції важливо було виявити її антибактеріальну дію.

Мета: визначення антибактеріальної дії запропонованої медикаментозної композиції на стандартні штами мікроорганізмів та змішану мікрофлору пародонтальних кишень.

Матеріали та методи: для визначення антибактеріальної дії було обрано стандартні штами мікроорганізмів та змішану мікрофлору пародонтальних кишень хворих на генералізований пародонтит. Для визначення протимікробної дії використовували метод дифузії в агар (метод «колодязів»).

Результати. Медикаментозна композиція Х не показала значних антимікробних особливостей. Мет-рогіл дента подіяв на усі мікроорганізми, з проявленням малої чутливості до препарату. Досліджувана медикаментозна композиція М проявила найбільш виразний антибактеріальний ефект стосовно стандартних штамів мікроорганізмів та змішаної мікрофлори пародонтальних кишень хворих на генералізований пародонтит.

Висновки. Високий антибактеріальний ефект модифікованої медикаментозної композиції стосовно змішаної мікрофлори пародонтальних кишень дає підстави для її використання в комплексному лікуванні хворих на генералізований пародонтит.

Ключові слова: медикаментозна композиція з кардіоаргініном, мікробіологічні дослідження, антибактеріальна активність.

Актуальність. Для комплексного лікування хворих на генералізований пародонтит застосовують різноманітні антибактеріальні препарати (антисептики, антибіотики, протигрибкові і антипротозойні препарати), протизапальні препарати, препарати кальцію, антирезорбенти тощо [7, 8, 12, 14, 19, 21]. Вони мають мембраностабілізуючу дію і, таким чином, справляють пародонтопротекторну дію. На сьогоднішній день серед цих засобів привертають увагу препарати, які впливають на метаболізм оксиду азоту [1-4]. Він приймає участь в багатьох біологічних процесах: кровообігу і нормалізації артеріального тиску, діяльності центральної і вегетативної нервової системи, обмінних процесах, активізації імунітету і т.д. [5, 9, 10, 13, 18, 22, 24]. Показано, що одним з важливих інтимних потенціалів розвитку захворювань пародонта є прояви NO-залежної ендотеліальної дисфункції [16].

З метою впливу на ці важливі процеси метаболізму в тканинах пародонта в комплексному лікуванні хворих на

генералізований пародонтит можна застосувати препарати аргініну, оскільки L-аргінін є джерелом утворення оксиду азоту. Для клінічного використання була запропонована фармакологічна композиція, яка містить кардіоаргінін (сіроп), стоматологічний гель “Холісал” і ефірну олію м’яти перцевої (деклараційний патент України на корисну модель № 97987 від 10.04.2015 р). Проте перед клінічним застосуванням даної композиції важливо було виявити чи має вона антибактеріальну дію стосовно стандартних штамів мікроорганізмів та змішаної мікрофлори пародонтальних кишень.

Метою даного дослідження було визначення антибактеріальної дії запропонованої медикаментозної композиції на стандартні штами мікроорганізмів та змішану мікрофлору пародонтальних кишень хворих на генералізований пародонтит.

Матеріали і методи дослідження.

Для порівняльного дослідження визначення чутливості мікрофлори були використані наступні препарати:

1. Медикаментозна композиція Х (кардіоаргінін, гель «Холісал», олія перцевої м'яти – згідно деклараційного патенту України на корисну модель № 97987 від 10.04.2015 р).

2. Медикаментозна композиція М (кардіоаргінін, гель «Холісал», олія перцевої м'яти, у яку додатково доданий метрогіл дента).

3. Метрогіл дента – стоматологічний гель для ясен – протимікробний препарат для комплексного лікування і профілактики деяких інфекційно-запальних захворювань порожнини рота.

Методика визначення чутливості стандартних штамів мікроорганізмів до вказаних препаратів. Для визначення антибактеріальної дії було обрано стандартні штами мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* (ATCC 27923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 27922) а також дріжджеподібні гриби роду *Candida albicans* (ATCC 10231). Референтні тестові штами мікроорганізмів отримано з музею живих культур Київського НДІ епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського. Характеристика використаних мікроорганізмів наведена в табл. 1.

Матеріал змішаної мікрофлори для мікробіологічного дослідження отримували із пародонтальних кишень хворих на генералізований пародонтит. Його забирали кореневою голкою із стерильною ватною турундою. У пародонтальну кишеню вводили кореневу голку із стерильною турундою. Після взяття матеріалу турунду вносили в стерильний 1% м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) і поміщали в термостат на 24 год. при $t = 37^{\circ}\text{C}$. Добова культура мікроорганізмів була інокульована відповідно до стандарту Мак Фарланда, що містить $1,5 \cdot 10^8$ КУО/мл [6].

Для визначення протимікробної дії досліджуваних медикаментозних засобів використовували метод, оснований на здатності речовин проникати в товщу агару – метод дифузії в агар (метод «колодязів») [2,6].

Спочатку, у стерильні чашки Петрі було розлито 10 мл «голодного» агару. Після охолодження нижнього шару

агару на ньому встановили на однаковій відстані один від одного циліндри (внутрішній діаметр – $6,0 \pm 0,1$ мм), відповідно досліджуваних препаратів. Навколо циліндрів заливали верхній шар – 13 мл розтопленого та охолодженого до $45\text{--}50^{\circ}\text{C}$ агару, змішаного з мікроорганізмами (в окремі чашки окремі стандартні штами та окремо зі змішаною мікрофлорою пародонтальних кишень). Інокулянт мікроорганізмів вносили у кількості 1 мл. Після охолодження верхнього шару агару циліндри виймали, поверхню застиглої м'ясо-пептонної агару (МПА) протягом 30–40 хв. підсушували при кімнатній температурі з напіввідкритими кришками. Препарати вносили в утворені лунки в кількості 30 мкл, з подальшою інкубацією в термостаті [2, 20]. Тривалість інкубації чашок з бактеріями – 24 год за температури 35°C , з грибами – 48–72 год за температури $28\text{--}30^{\circ}\text{C}$. Діаметр зон затримки росту вимірювали з точністю до 1 мм. Оцінку антибактеріальної активності матеріалів визначали за розміром (у мм) зон затримки росту мікроорганізмів навколо кожного зразка [17, 23]. Ступінь антибактеріальної активності досліджуваних препаратів оцінювали за величиною зон пригнічення росту мікроорганізмів згідно параметрів:

1. Зона затримки росту діаметром до 8 мм або її відсутність вказує на те, що мікроорганізми не чутливі до внесеного у лунку препарату;

2. Зона затримки росту діаметром 8–13 мм вказує на малу чутливість культури;

3. Зона затримки росту діаметром 13–18 мм вважається показником чутливості мікроорганізмів;

4. Зона затримки росту діаметром більше 18 мм свідчить про високу чутливість мікробів [11, 23].

Кожен з експериментів для статистичної достовірності повторювали 3 рази. Визначали середнє арифметичне значення для кожної із досліджуваних груп антибактеріальних препаратів та середню статистичну похибку [15].

Результати дослідження та їх обговорення.

В результаті проведеного дослідження, було порівняно антимікробні властивості медикаментозних композицій та препарату порівняння. Антимікробні засоби

Таблиця 1.

Характеристика музейних тест-штамів мікроорганізмів

Мікроорганізми	Кількість штамів	Джерела мікроорганізмів
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1	Музей живих культур Київського НДІ епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	1	-/-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	-/-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1	-/-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1	-/-

Таблиця 2.

Визначення антимікробної дії досліджуваних препаратів: зони затримки росту (мм)

Досліджувані препарати	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	Змішана мікрофлора
Метрогіл дента	$9,3 \pm 0,3$	$11,7 \pm 0,3$	$12 \pm 0,5$	$12 \pm 0,5$	$13,3 \pm 0,5$	$10,7 \pm 0,3$
Композиція Х	-	$9 \pm 0,5$	$8,3 \pm 0,3$	$8,7 \pm 0,7$	$7,7 \pm 0,5$	$7,7 \pm 0,7$
Композиція М	$10,7 \pm 0,3$	$12,7 \pm 0,5$	$17,3 \pm 0,3$	$14,7 \pm 0,3$	$14,7 \pm 0,5$	$12,7 \pm 0,3$



Рис. 1. Зони затримки росту тест культури Staphylococcus aureus: 1 - Метрогіл дента, 2 – медикаментозна композиція X, 3 – медикаментозна композиція M



Рис. 4. Зони затримки росту тест культури Candida albicans: 1 - Метрогіл дента, 2 – медикаментозна композиція X, 3 – медикаментозна композиція M



Рис. 2. Зони затримки росту тест культури Staphylococcus epidermidis: 1 - Метрогіл дента, 2 – медикаментозна композиція X, 3 – медикаментозна композиція M



Рис. 5. Зони затримки росту тест культури Escherichia coli: 1 - Метрогіл дента, 2 – медикаментозна композиція X, 3 – медикаментозна композиція M



Рис. 3. Зони затримки росту тест культури Pseudomonas aeruginosa: 1 - Метрогіл дента, 2 – медикаментозна композиція X, 3 – медикаментозна композиція M



Рис. 6. Зони затримки росту тест культури змішаної мікрофлори пародонтальних кишень: 1 - Метрогіл дента, 2 – медикаментозна композиція X, 3 – медикаментозна композиція M

проявили різноманітну антимікробну активність на тест-культури стафілококів, ешеріхії, псевдомонади, кандиди та змішану мікрофлору пародонтальних кишень. Результати представлені у табл. 2 та на рис. 1-6.

Медикаментозна композиція Х, як і в попередніх дослідженнях не показала значних антимікробних особливостей. Комплекс був не дієвим до *P. aeruginosa*, а до усіх інших мікроорганізмів – зони затримки росту в середньому коливались від 7,7 до 9 мм.

Метрогіл дента подіяв на усі мікроорганізми, з проявленням малої чутливості до препарату. Синьо-гнійна паличка була найменш чутливою до даного препарату, зони затримки росту не перевищували 10 мм, а середнє значення дорівнювало 9,3±0,3 мм. *E. coli* була більш чутливою, відсутність росту сягала 11,7±0,3 мм. Даний препарат мав найбільший антимікробний ефект як до грибів, так і до стафілококів, максимальні зони пригнічення росту досягали 14 мм в діаметрі. Затримка росту змішаної мікрофлори під дією метрогіл дента в середньому становила 10,7±0,3 мм. При цьому спостерігали зони зміни типу колоній та її кольору, які досягали 2 см, що можна пояснити пригніченням частини представників мікрофлори.

Досліджувана медикаментозна композиція М проявила найбільш виразний антибактеріальний ефект. Усі мікроорганізми були чутливими до даного комплексу. Псевдомонади, як і в попередніх випадках, проявили найбільшу стійкість до препарату, середнє значення затримки росту дорівнювало 10,7±0,3 мм. Кишкова паличка була більш чутливою до даної композиції, зони відсутності росту в середньому відповідали значенню 12,7±0,5 мм. Чутливість стафілококів була краще виражена, ніж у грамнегативних бактерій, відповідно – 14,7±0,5 мм. Найвища ефективність досліджуваної медикаментозної композиції виявлена на кандидах, протимікробна дія становила – 17,3±0,3 мм. Змішана мікрофлора була найбільш чутливою до медикаментозної композиції з додаванням метрогіл дента, а зона затримки росту досягала 12,7±0,5 мм.

Висновки

Аналіз отриманих результатів показав, що додаткове уведення до складу запропонованої медикаментозної композиції метрогіл дента покращує її антибактеріальну активність. Варто відмітити виразну протигрибкову дію композиції, а саме її вплив на дріжджоподібні гриби. Високий антибактеріальний ефект модифікованої медикаментозної композиції стосовно змішаної мікрофлори пародонтальних кишень дає підстави для її використання в комплексному лікуванні хворих на генералізований пародонтит.

Конфлікт інтересів - відсутній.

ЛІТЕРАТУРА

1. Белоус А. М. Клеточные механизмы сосудистой патологии (обзор литературы) // А. М. Белоус, В. А. Малахов // Журн. АМН України. – 1998. – 4, № 4. – С. 581–596.
2. Бойко Н.Н. Скрининг антимикробных свойств спиртоводных вытяжек из некоторых видов растительного сырья содержащего хинонпроизводные / Бойко Н.Н., Зайцев А. И., Ослодченко Т.П. // *Annals of Mechnikov Institute*. – 2014. – N 4. – С. 67-71.

3. Ванін А. Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиола — две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах/ А. Ф. Ванін // *Биохимия*. – 1998. – № 7. – С. 924–930.
4. Ванін А. Ф. Оксид азота в биологии: история, состояние и перспективы исследований/ А. Ф. Ванін // *Биохимия*. – 1998. – № 7. – С. 867–869.
5. Ванін А. Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях/ А. Ф. Ванін // *Вестн. РАМН*. – 2000. – № 4. – С. 3–5.
6. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів. Методичні рекомендації / Ю.Л. Волянський та ін. – Київ, 2004. – 38 с.
7. Вишняк Г.Н. Генерализованные заболевания пародонта (пародонтоз, пародонтит)/ Г.Н. Вишняк. - Киев, 1999. - 216 с.
8. Герелюк В.І. Роль ліпідних медіаторів у перебігу генералізованого пародонтиту та ефективність їх корекції в комплексному лікуванні: : автореф. дис. ... д-ра мед. наук: спец.: 14.01.22 «Стоматологія»/ В.І. Герелюк. – Івано-Франківськ, 2001. – 36 с.
9. Гоженко А. И. Роль оксида азота в регуляции микроциркуляции и агрегатного состояния крови/ А. И. Гоженко, С. Г. Котюжинская, А. И. Котюжинский // *Укр. мед. альманах*. – 2000. – № 1. – С. 13–17. 7.
10. Гоженко А. И. Роль оксида азота в механизмах воспаления/ А. И. Гоженко, В. П. Бабий, С. Г. Котюжинская, И. В. Николаевская // *Эксперим. и клин. мед.* – 2001. – № 3. – С. 13–17
11. Гоцуля Т.С. Дослідження антимікробної та протигрибкової активності серед галогенідів 1-алкіл-4-(5-нітрофуран-2-іл)-метиленаміно-4н-1,2,4-тріазолу та їх диметильних аналогів / Т.С. Гоцуля. О.І. Панасенко, Є.Г. Книш, О.М. Ачкасова// *Запорожский медицинский журнал*. – 2011. – №5. – С. 140-142.
12. Данилевский Н.Ф. Заболевания пародонта./ Н.Ф. Данилевский, А.В. Борисенко. – Киев: Здоров'я, 2000. – 464 с.
13. Желнін Є.В. Хірургічна санація порожнини рота в осіб, що зазнали дії іонізуючого випромінювання: автореф. дис. ... канд. мед. наук: спец.: 14.01.22 «Стоматологія»/ Є.В. Желнін. – Київ, 2006. – 20 с.
14. Мащенко І.С. Заболевания пародонта./ І.С. Мащенко. – Днепропетровск: КОЛО, 2003. – 272 с.
15. Міцнер О. П. Оброблення клінічних і експериментальних даних у медицині / О. П. Міцнер, Ю. В. Вороненко, В. В. Власов. – К. : Вища шк., 2003. – 350 с.
16. Назарян Р.С. Патогенетичне обґрунтування корекції аліментарного фактора у комплексному лікуванні хвороб пародонта: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: спец.: 14.01.22 «Стоматологія»/ Р.С.Назарян. – Київ, 2006. – 40 с.
17. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам / Семина Н.А. и др. // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* – 2004. – Том 6. – № 4. – С.306-359.
18. Петренко Ю.М. Новые источники окиси азота, их возможная физиологическая роль и значение./ Ю.М. Петренко, Д.А. Шашаурин, В.Ю. Титов // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2001.- №2. – С.72-79.
19. Поворознюк В.В. Костная система и заболевания пародонта./ В.В. Поворознюк, И.П. Мазур. – Киев, 2003. – 446 с.
20. Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів»: 05.04.2007, № 167 – Офіц. вид. – Київ: МОЗ України, 2007. – 70 с.
21. Середюк І.Н. Клініко-патогенетичні особливості застосування протизапальних засобів та ангіопротекторів в комплексному лікуванні генералізованого пародонтиту: автореф. дис. ... канд. мед. наук: спец.: 14.01.22 «Стоматологія»/ І.Н.Середюк. - Київ, 2005. - 20 с.
22. Сосунов А.А. Оксид азота как межклеточный посредник./ А.А. Сосунов // *Соровский образовательный журнал*. - 2000. – т.6. -№12. – С.27-34.
23. Angelina M. de Almeida. Synthesis and antimicrobial activity of novel amphiphilic aromatic amino alcohols / Angelina M. de Almeida, Thiago Nascimento, Bianca S. Ferreira, Pedro P. de Castro, Venial. Silva, Claudio G. Diniz, Mireille Le Hyaric // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2013. – №23. – P. 2883–2887.
24. Zamora R., Vodovotz V., Billiar T.R. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases/ R. Zamora, V. Vodovotz, T.R. Billiar // *Molec. Med.* — 2000. — Vol. 6, № 5. — P. 347-373.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ КОМПОЗИЦИИ С АРГИНИНОМ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПАРОДОНТА

Куваяев А.С., Борисенко А.В., Видерская А.В., Леснухина А.Л.

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

Актуальность. Для комплексного лечения больных генерализованным пародонтитом применяют различные антибактериальные препараты (антисептики, антибиотики, противогрибковые и антипротозойные препараты), противовоспалительные препараты, препараты кальция, антирезорбентов и др. На сегодняшний день среди этих средств привлекают внимание препараты, влияющие на метаболизм оксида азота. Для клинического использования была предложена фармакологическая композиция, содержащая кардио-аргинин. Перед клиническим применением данной композиции важно было выяснить ее антибактериальное действие.

Цель: определение антибактериального действия предложенной медикаментозной композиции на стандартные штаммы микроорганизмов и смешанную микрофлору пародонтальных карманов.

Материалы и методы. Для определения антибактериального действия были избраны стандартные штаммы микроорганизмов и смешанная микрофлора пародонтальных карманов больных генерализованным пародонтитом. Для определения противомикробного действия использовали метод диффузии в агар (метод «колодцев»).

Результаты. Медикаментозная композиция X не показала значительных антибактериальных свойств. Метрогил дента подействовал на все микроорганизмы, с проявлением малой чувствительности к препарату. Исследуемая медикаментозная композиция M проявила наиболее выразительный антибактериальный эффект в отношении стандартных штаммов микроорганизмов и смешанной микрофлоры пародонтальных карманов больных генерализованным пародонтитом.

Выводы. Высокий антибактериальный эффект модифицированной медикаментозной композиции по отношению к смешанной микрофлоре пародонтальных карманов дает основания для ее использования в комплексном лечении больных генерализованным пародонтитом.

Ключевые слова: медикаментозная композиция с кардиоаргином, микробиологические исследования, антибактериальная активность.

MICROBIOLOGICAL SUBSTANTIATION OF DRUG COMPOSITION WITH ARGININE FOR THE TREATMENT OF PATIENTS WITH PERIODONTAL DISEASE

A.S.Kuvayev, A.V. Borysenko, A.V.Viderskaya, A.L. Liesnykhina

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Urgency. For a complex treatment of patients with generalized periodontitis using various antimicrobial (antiseptics, antibiotics, antifungal and antiprotozoal drugs), anti-inflammatory drugs, calcium supplements, antiresorbative and others. Today, among these drugs attract the attention of medicaments affecting the metabolism of nitric oxide. For clinical use it has been proposed pharmacological composition containing cardioarginin. Before clinical usage of this composition, it was important to investigate its antibacterial action.

Aim. To determine the antibacterial action of the proposed pharmacological composition to the standard strains of microorganisms and mixed microflora of periodontal pockets.

Materials and methods. To determine the antibacterial activity were selected standard strains of microorganisms and mixed microflora of periodontal pockets of patients with generalized periodontitis. To determine antimicrobial effect using agar diffusion method ("wells" method).

Results. Pharmacological composition X showed no significant antibacterial properties. Metrogil denta had an effect on all microorganisms, with the appearance of a low sensitivity to the drug. The study pharmacological composition M has shown the most impressive antibacterial effect on standard strains of microorganisms and mixed microflora of periodontal pockets of patients with generalized periodontitis.

Conclusions. The high anti-bacterial effect of the modified drug formulation with respect to the mixed microflora of periodontal pockets gives reason for its use in treatment of patients with generalized periodontitis.

Keywords: pharmacological composition with cardioarginin, microbiological investigation, antibacterial activity.