



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **143151** (13) **U**
(51) МПК (2020.01)
C12Q 1/00
G01N 1/28 (2006.01)
C12R 1/46 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2020 01144</p> <p>(22) Дата подання заявки: 21.02.2020</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.07.2020</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2020, Бюл.№ 13</p>	<p>(72) Винахідник(и): Лобань Галина Андріївна (UA), Фаустова Марія Олексіївна (UA), Ананьєва Майя Миколаївна (UA), Басараб Ярослав Олексійович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ, вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)</p>
--	--

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ ДІЇ ЕКСТРАКТУ ПРОТЕФЛАЗИДУ ЩОДО STREPTOCOCCUS SANGUINIS У МІКРОФЛОРИ ПЕРІІМПЛАНТАТНОЇ ДІЛЯНКИ ПРИ ІНФЕКЦІЙНО-ЗАПАЛЬНИХ УСКЛАДНЕННЯХ ОДОНТОІМПЛАНТАЦІЇ

(57) Реферат:

Спосіб визначення протимікробної дії екстракту протейфлазиду щодо Streptococcus sanguinis у мікрофлорі періімплантатної ділянки при інфекційно-запальних ускладненнях одонтоімплантації включає готування дослідних та контрольних зразків мікроорганізмів. Для антибактеріальної дії щодо Streptococcus sanguinis використовують робочий розчин протейфлазиду в кількості 1,0 см³, що містить не менше 0,32 мг флавоноїдів в перерахунку на рутин і не менше 0,3 мг суми карбонових кислот в перерахунку на яблучну кислоту. Для інокуляції використовують мікробну суспензію, еквівалентну 1,0 за стандартом МакФарланда, розведена в 100 разів у фізіологічному розчині. Після чого концентрація мікроорганізмів в ній становить 3×10¹⁰ КУО/см³, по 0,1 см³ інокулюма вносять в кожну пробірку, що містить по 1,0 см³ відповідних розведень робочого розчину, і в одну пробірку з 1,0 см³ поживного бульйону без екстракту, як "негативний контроль". Далі пробірки закривають стерильними пробками і інкубують в звичайній атмосфері при температурі 37 °С протягом 20-24 год. з подальшим визначенням мінімальної концентрації протейфлазиду шляхом посіву мікроорганізмів з поживного бульйону на поживний агар, далі посіви інкубують в звичайній атмосфері при температурі 35 °С протягом 20-24 год.

UA 143151 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до медичної мікробіології, та може бути призначена для визначення ступеня протимікробної дії екстракту протейфлазиду щодо *Streptococcus sanguinis* у мікрофлорі періімплантатної ділянки при інфекційно-запальних ускладненнях одонтоімплантації.

5 В 60-70 роках минулого століття флора різних біотопів тіла людини вважалася сапрофітною чи умовно-патогенною. Однак в даний час реєструється значне зниження рівня популяційного імунітету в багатьох країнах світу, на тлі чого стрімко розповсюджуються опортуністичні інфекції. Передумовами до цього слугували забруднення навколишнього середовища, зміна характеру харчування, стреси і значне поширення вірусних персистуючих інфекцій в організмі людини.
10 Парадоксальними на перший погляд виявилися випадки тяжких інфекційних станів, етіологічними факторами яких слугували мікроорганізми, що відносяться до нормофлори ротової порожнини [1]. Описані численні випадки захворювань, викликаних *Streptococcus sanguinis*, серед яких підгострий інфекційний ендокардит, абсцеси головного мозку, хронічний афтозний стоматит (пов'язаний з L-формами даного збудника) [2, 3].

15 Одонтоімплантація належить до розповсюджених методів заміщення дефектів зубних рядів. В наш час спостерігають стрімкий розвиток даної методики. Висока функціональність, естетичність та довговічність роблять її методом вибору більше, ніж 2 млн. осіб щорічно. Однак, на тлі розширення показань та широкого розповсюдження детальної імплантації серед пацієнтів кількість ускладнень, що виникають на різних її етапах, збільшується. Періімплантатний мукозит
20 в середньому виникає у 43 % випадків, а періімплантит - у 22 %. Дані ускладнення можуть виникнути внаслідок реакції організму на введений імплантат чи при інфікуванні операційної рани як у ранній післяопераційний період, так і у віддалені терміни після протезування.

Особлива увага науковців до препаратів рослинного походження обумовлена їх меншою токсичністю та досить широким спектром антибактеріальної та протівірусної дії [7, 4]. Оскільки
25 виникнення асоційованих інфекцій сприяє створенню умов, за яких звичайна антибіотикотерапія є неефективною. Це дає змогу розглядати препарати, діючою речовиною яких є флавоноїди екстракту протейфлазиду, як перспективу пошуку нових засобів ефективного лікування інфекційних хвороб [5]. Даний екстракт отримують шляхом спиртового екстрагування (96 %-й спирт) рослинної сировини - диких злаків *Calamagrostis epigeios* та *Deschampsia caespitosa*, з
30 яких вилучаються стійкі молекулярні комплекси трицину, апигеніну, лютеоліну та кверцитину [6]. Протейфлазид сприяє підвищенню неспецифічної резистентності організму до вірусної та бактеріальної інфекції шляхом продукції ендогенних α - і γ -інтерферонів до фізіологічно активного рівня. Крім того, він запобігає накопиченню продуктів переокислення ліпідів, пригнічуючи перебіг вільнорадикальних процесів. Екстракт є модулятором апоптозу та посилює
35 дію апоптозіндукувальних речовин, що сприяє його значній антиоксидатній активності.

Серед тих, що відомі, стосовно заданої тематики, є: спосіб профілактики періімплантних мукозитів, що полягає у використанні для виконання аплікацій орального фітогелю з рослинним екстрактом, який відрізняється тим, що як оральний фітогель використовують мукозо-адгезивний фітогель "Галсодент" з вмістом (8-15)% концентрату соєвих α -галактоцукрів таким
40 чином: за тиждень до операції імплантації роблять щоденні аплікації гелю на слизову оболонку порожнини рота в кількості 0,5-1,0 мл, а після операції - протягом 1-2 тижнів. Пат. на корисну модель 109453 Україна, МПК А61С 13/00, А61К 36/66(2006.01), А61Р 1/04(2006.01). СПОСІБ ПРОФІЛАКТИКИ ПЕРІІМПЛАНТНИХ МУКОЗИТІВ / Автори: Левицький Анатолій Павлович (UA); Давиденко Ігор Анатолійович (UA); Сенніков Олег Миколайович (UA); Макаренко Ольга
45 Анатоліївна (UA); Селіванська Ірина Олександрівна (UA); Дробязго Михайло Георгійович (UA); Дем'яненко Світлана Олександрівна (UA); Заявник та патентовласник: ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ СТОМАТОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", вул. Рішельєвська, 11, м. Одеса, 65026 (UA). - № u201601906; Заявл. 29.02.2016; Опубл. 25.08.2016, бюл. № 16/2016.

50 Також відомий спосіб визначення антибактеріальної активності меду відносно *Staphylococcus aureus*, при якому готують однакові за об'ємом розчини меду в м'ясо-пептонному бульйоні 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, засівають культурою тест-штаму *Staphylococcus aureus*, інкубують протягом 24-48 годин при 37 °С і далі здійснюють перепосів засіяних розчинів меду на тверде живильне середовище, інкубують перепосіви протягом 24-48 годин при 37 °С і
55 визначають антибактеріальну активність меду по відношенню до *Staphylococcus aureus* за критеріями: перепосіви, в яких не виявили ріст колоній, вважають пригніченими розчином меду із бактерицидними властивостями, перепосіви з виявленим ростом колоній мікроорганізмів, вважають пригніченими розчином меду із бактериостатичними властивостями, а перепосіви з виявленим інтенсивним ростом колоній мікроорганізмів вважають утвореними розчином меду
60 без антибактеріальної дії, який відрізняється тим, що додатково готують аналогічні за об'ємом

розчини меду в м'ясо-пептонному бульйоні 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 та контрольний зразок м'ясо-пептонного бульйону, які засівають культурою тест-штаму *Staphylococcus aureus*, причому як тверде живильне середовища використовують жовтково-сольовий агар, а перепосів засіяних та інкубованих розчинів меду і контрольного зразка м'ясо-пептонного бульйону на жовтково-сольовий агар та їх наступну інкубацію проводять для кожного розчину меду і контрольного зразка м'ясо-пептонного бульйону, при цьому використовують мед, що зберігався в умовах, які виключають зміни хімічного складу меду та його фізичних і антибактеріальних властивостей, причому кінцеве визначення антибактеріальної активності меду по відношенню до *Staphylococcus aureus* здійснюють, виходячи з концентрацій меду, що виявляють бактеріостатичну дію за критеріями: перепосіви з виявленим слабким ростом колоній мікроорганізмів, вважають пригніченими розчином меду із помірними бактеріостатичними властивостями, а перепосіви з виявленим помірним ростом колоній мікроорганізмів, вважають пригніченими розчином меду із слабкими бактеріостатичними властивостями. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що кожен розчин меду в м'ясо-пептонному бульйоні та контрольний зразок м'ясо-пептонного бульйону готують кількістю 2 мл, а їх засів проводять 1-ю краплею 18-годинної культури тест-штаму мікроорганізму *Staphylococcus aureus* з розведенням м'ясо-пептонним бульйоном до 10^5 - 10^6 м.т./мл. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що як мед, антибактеріальну активність якого визначають, використовують мед, що не піддавався температурному впливу вище 37°C , та дії хімічних сполук. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що слабкий ріст колоній мікроорганізмів визначають при кількості колоній від 1 до 10, помірний ріст колоній мікроорганізмів визначають при кількості колоній від 11 до 100, а інтенсивний ріст колоній мікроорганізмів визначають при кількості колоній більше 100. Пат. на корисну модель 129688 Україна, МПК G01N 33/02 (2006.01). G01N 33/554(2006.01). C12Q 1/04. СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ МЕДУ ПО ВІДНОШЕННЮ ДО *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* / Лісогурська Ольга Вікторівна (UA); Лісогурська Діна Володимирівна (UA); Фурман Світлана Володимирівна (UA); Кривий Михайло Миколайович (UA); заявник та патентовласник: ЖИТОМИРСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРОЕКОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, бульвар Старий, 7, м. Житомир. 10008 (UA). - № u201804450; Заявл. 23.04.2018; Опубл. 12.11.2018. бюл. № 21/2018.

Найбільш близьким до запропонованого є спосіб визначення протимікробної активності композиту нанодисперсного кремнезему та полігексаметиленгуанідину гідрохлориду, що включає готування дослідних та контрольних зразків мікроорганізмів, при цьому дослідні зразки готують послідовно з добових культур мікроорганізмів культивуванням їх на скошеному щільному середовищі протягом 18-24 годин при 37°C з наступним отриманням бактеріальних та грибкових суспензій згідно зі стандартом мутності 0,5 по МакФарланду, при їх розведенні 1:5 отримують дослідні суспензії мікроорганізмів, одночасно з дослідними готують зразки позитивного контролю росту мікроорганізмів на поживному середовищі - без додавання композиту нанодисперсного кремнезему та полігексаметиленгуанідину гідрохлориду, зразки негативного контролю росту мікроорганізмів, які готують на поживному середовищі з додаванням робочих суспензій досліджуваних мікроорганізмів з витримкою протягом 24 годин при 4°C без внесення дослідного композиту, та зразки контролю чистоти середовища і препаратів, результати яких порівнюють з ростом мікроорганізмів дослідних зразків, визначають мінімальну пригнічуючу концентрацію препарату по відношенню до досліджуваного мікроорганізму як першу концентрацію, при якій відсутній видимий ріст мікроорганізмів, а мінімальну бактерицидну та фунгіцидну концентрацію препарату відносно досліджуваного мікроорганізму визначають за першою концентрацією, при якій у нанесених на щільне середовище бактеріальних та грибкових суспензіях виявлений ріст менше 200 колонієутворюючих одиниць. Пат. на корисну модель 124890 Україна, МПК G01N 33/15(2006.01), G01N 1/28(2006.01). СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ КОМПОЗИТУ НАНОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ ТА ПОЛІГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНІДИНУ ГІДРОХЛОРИДУ / Автори: Чекман Іван Сергійович (UA); Балко Олександр Богданович (UA); Воронні Євген Пилипович (UA); Дорошенко Анна Ігорівна (UA); Дорошенко Андрій Михайлович (UA); заявник та патентовласник: НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка. 13, м. Київ, 01601 (UA). - № u201711216; Заявл. 16.11.2017; Опубл. 25.04.2018. бюл. № 8/2018.

В основу корисної моделі поставлена задача дослідити протимікробну активність екстракту протефлазиду щодо *Streptococcus sanguinis* у мікрофлорі періімплантатної ділянки при інфекційно-запальних ускладненнях одонтоімплантації.

Поставлена задача вирішується створенням способу визначення антибактеріальної активності екстракту протефлазиду, що включає готування дослідних та контрольних зразків

мікроорганізмів, та відрізняється тим, що для антибактеріальної дії щодо *Streptococcus sanguinis* використовують робочий розчин протезфлазиду в кількості 1,0 см³, що містить не менше 0,32 мг, флавоноїдів в перерахунку на рутин і не менше 0,3 мг суми карбонових кислот в перерахунку на яблучну кислоту, для інокуляції використовують мікробну суспензію, еквівалентну 1,0 за стандартом МакФарланда, розведену в 100 разів у фізіологічному розчині, після чого концентрація мікроорганізмів в ній становить 3×10^{10} КУО/см³, по 0,1 см³ інокулюма вносять в кожну пробірку, що містить по 1,0 см³ відповідних розведень робочого розчину, і в одну пробірку з 1,0 см³ поживного бульйону без екстракту, як "негативний контроль", далі пробірки закривають стерильними пробками і інкубують в звичайній атмосфері при температурі 37 °С протягом 20-24 год. з подальшим визначенням мінімальної концентрації протезфлазиду шляхом посіву мікроорганізмів з поживного бульйону на поживний агар, далі посіви інкубують в звичайній атмосфері при температурі 35 °С протягом 20-24 год.

Спосіб здійснюється наступним чином: в розчині 1 мл протезфлазиду знаходиться екстракт (1:1), що містить не менше 0,32 мг флавоноїдів в перерахунку на рутин і не менше 0,3 мг суми карбонових кислот в перерахунку на яблучну кислоту; допоміжна речовина - спирт етиловий 96 %. Робочий розчин в кількості 1,0 см³ за допомогою мікропіпетки зі стерильним наконечником вносять в першу пробірку, що містить 1,0 см³ бульйону. Ретельно перемішують і новим стерильним наконечником переносять 1,0 см³ розчину в бульйоні в наступну пробірку з 1,0 см³ бульйону. Цю процедуру повторюють для приготування всього необхідного ряду розведень. З останньої пробірки 1,0 см³ бульйону видаляють. Таким чином, отримують ряд пробірок з розчинами протезфлазиду, концентрації яких відрізняються в сусідніх пробірках в 2 рази.

Для інокуляції використовують мікробну суспензію, еквівалентну 1,0 за стандартом МакФарланда, розведену в 100 разів у фізіологічному розчині, після чого концентрація мікроорганізмів в ній становить 3×10^{10} КУО/см³. По 0,1 см³ інокулюма вносять в кожну пробірку, що містить по 1,0 см³ відповідних розведень робочого розчину, і в одну пробірку з 1,0 см³ поживного бульйону без екстракту, як "негативний контроль". Інокулюм вносять в пробірки з розведеннями одразу після приготування.

Пробірки закривають стерильними пробками і інкубують в звичайній атмосфері при температурі 37 °С протягом 20-24 год. Бактерицидна мінімальна концентрація протезфлазиду визначається шляхом посіву мікроорганізмів з поживного бульйону на поживний агар виробництва Державного дослідного підприємства Інституту продовольчих ресурсів НААН України. Посіви інкубують в звичайній атмосфері при температурі 35 °С протягом 20-24 год. Для визначення наявності росту мікроорганізму пробірки з посівами не переглядають у прохідному світлі, в порівнянні з "негативним" контролем, оскільки при змішуванні поживного бульйону та розчину, що містить флавоноїди, утворюється помутніння. Враховуючи цей факт, визначається виключно бактерицидна мінімальна концентрація (МБК) та мінімальна фунгіцидна концентрація (МФК) протезфлазиду шляхом посіву мікроорганізмів з поживного бульйону на поживний агар.

Досліджувані клінічні штами *Streptococcus sanguinis*, виявилися чутливими до дії екстракту протезфлазиду, повне знищення якого відбувалося у присутності 0,01 мкг/мл флавоноїдів у перерахунку на рутин. У свою чергу, 96 % спирт, який входить до складу даного екстракту, також чинив бактерицидну дію щодо досліджуваних клінічних штамів мікроорганізмів, однак його МБЦК були достовірно нижчими за МБЦК екстракту протезфлазиду (креслення: МБЦК екстракту протезфлазиду та 96 % спирту для клінічних штамів мікроорганізмів (n=5), мкг/мл, Примітка: * - достовірність різниці показників МБЦК екстракту протезфлазиду до показників МБЦК 96 % спирту, $p < 0,05$).

Отримані дані свідчать про те, що: екстракт протезфлазиду володіє протимікробною дією щодо клінічних штамів мікроорганізмів *Streptococcus sanguinis*, що колонізують слизову оболонку пацієнтів з інфекційно-запальними ускладненнями одонтоімплантації. МБЦК екстракту протезфлазид значно нижча, за МБЦК 96 % спирту, що підтверджує безпосередню протимікробну дію флавоноїдів, що входять до складу досліджуваного екстракту. Це робить його перспективним для застосування у профілактиці та комплексному лікуванні інфекційно-запальних ускладнень одонтоімплантації. Тому використання отриманих результатів в медицині та пошук нових препаратів на основі флавоноїдів є досить перспективним для подальших досліджень.

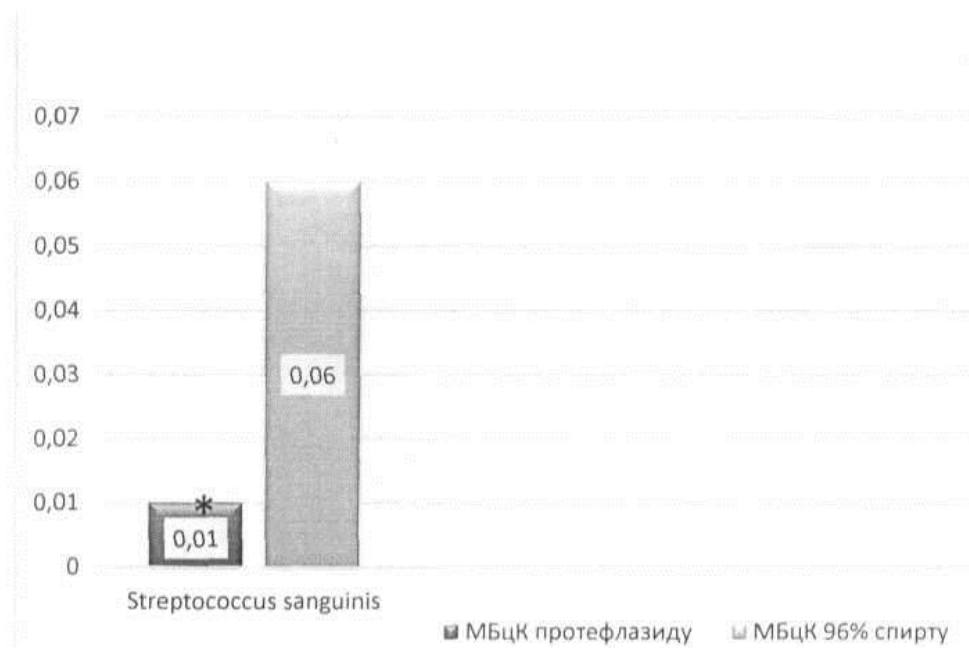
Джерела інформації:

1. Gürel H.G., Basciftci F.A., Arslan U. Transient bacteremia after removal of a bonded maxillary expansion appliance // American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. -2009. -Т. 135. - № 2. – С. 190-193.

2. S. Paik. Identification of Virulence Determinants for Endocarditis in *Streptococcus sanguinis* by Signature-Tagged Mutagenesis / S. Paik, L. Senty, S. Das [et al.] // *Infection And Immunity*. - 2005. - V. 73, No. 9. - P. 6064-6074
- 5 3. X. Ge. Identification of *Streptococcus sanguinis* genes required for biofilm formation and examination of their role in endocarditis virulence / X. Ge, T. Kitten, Z. Chen [et al.] // *Infection And Immunity*. - 2008. - V. 76, No. 6. - P. 2551-2559
- 10 4. Оценка эффективности препарата Протефлазид при лечении папилломавирусной инфекции: мета-анализ результатов многолетних клинических исследований / В.В. Каминский. М.Н. Шалько, В.С. Михайлов [и др.] // *Медицинские аспекты здоровья женщины*. - 2015. № 6 (92). - С. 5-14.
- 15 5. Протефлазид: специфическая активность в отношении вируса гепатита С в доклинических исследованиях; эффективность и безопасность при лечении гепатитов В и С в клинической практике (систематический обзор) / А.Н. Печенка, А.И. Гриневич. Т.А. Кручко [и др.] // *Клиническая инфектология и паразитология*. - 2015. - № 2(13). - С. 78-97.
6. Протигрипозний ефект N-стеароїлетаноламіну / Н.М. Гула, А.А. Чумак, С.Л. Рибалко. Д.Б. Старосила [та ін.] // *Журнал національної академії медичних наук України*. 2014. - Т. 20. № 4. - С. 393-401.
- 20 7. Balunas M. J. Drug discovery from medicinal plants / M. J. Balunas, A. D. Kinghorn // *Life Sci*. - 2005. - Vol. 78. - P. 431-441.
8. Global trends in emerging infectious diseases / K. E. Jones. N. G. Patel. M. A. Levy [et al.] // *Nature*. - 2008. - Vol. 451, № 71. - P. 990-993.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 25 Спосіб визначення протимікробної дії екстракту протефлазиду щодо *Streptococcus sanguinis* у мікрофлорі періімплантатної ділянки при інфекційно-запальних ускладненнях одонтоімплантації, що включає готування дослідних та контрольних зразків мікроорганізмів, який **відрізняється** тим, що для антибактеріальної дії щодо *Streptococcus sanguinis*
- 30 використовують робочий розчин протефлазиду в кількості 1,0 см³, що містить не менше 0,32 мг флавоноїдів в перерахунку на рутин і не менше 0,3 мг суми карбонових кислот в перерахунку на яблучну кислоту, для інокуляції використовують мікробну суспензію, еквівалентну 1,0 за стандартом МакФарланда, розведена в 100 разів у фізіологічному розчині, після чого концентрація мікроорганізмів в ній становить 3×10^{10} КУО/см³, по 0,1 см³ інокулюма вносять в кожну пробірку, що містить по 1,0 см³ відповідних розведень робочого розчину, і в одну пробірку
- 35 з 1,0 см³ поживного бульйону без екстракту, як "негативний контроль", далі пробірки закривають стерильними пробками і інкубують в звичайній атмосфері при температурі 37 °С протягом 20-24 год. з подальшим визначенням мінімальної концентрації протефлазиду шляхом посіву мікроорганізмів з поживного бульйону на поживний агар, далі посіви інкубують в звичайній атмосфері при температурі 35 °С протягом 20-24 год.



Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601