



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **144153** (13) **U**  
(51) МПК (2020.01)  
**C12Q 1/00**  
**G01N 1/28** (2006.01)  
**G01N 33/15** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<p>(21) Номер заявки: <b>u 2020 01130</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>21.02.2020</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>11.09.2020</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.09.2020, Бюл.№ 17</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Лобань Галина Андріївна (UA), Басараб Ярослав Олексійович (UA), Фаустова Марія Олексіївна (UA), Ананьєва Майя Миколаївна (UA)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ, вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)</b></p>
--	--

**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ ДІЇ ЕКСТРАКТУ ПРОТЕФЛАЗИДУ ЩОДО КОСУРІА KRISTINAE У МІКРОФЛОРИ ПЕРИІМПЛАНТАТНОЇ ДІЛЯНКИ ПРИ ІНФЕКЦІЙНО-ЗАПАЛЬНИХ УСКЛАДНЕННЯХ ОДОНТОІМПЛАНТАЦІЇ**

**(57) Реферат:**

Спосіб визначення протимікробної дії екстракту протефлазиду щодо *Cosuria kristinae* у мікрофлорі періімплантатної ділянки при інфекційно-запальних ускладненнях одонтоімплантації, що включає готування дослідних та контрольних зразків мікроорганізмів. Для антибактеріальної дії щодо *Cosuria kristinae* використовують робочий розчин протефлазиду в кількості 1,0 см<sup>3</sup>, 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<sup>10</sup> КУО/см<sup>3</sup>, по 0,1 см<sup>3</sup> інокулюма вносять в кожну пробірку, що містить по 1,0 см<sup>3</sup> відповідних розведень робочого розчину, і в одну пробірку з 1,0 см<sup>3</sup> 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.

UA 144153 U



Корисна модель належить до медицини, а саме до медичної мікробіології, та може бути призначена для визначення ступеня протимікробної дії екстракту протейфлазиду щодо *Cosuria kristinae* 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 Пародоксальними на перший погляд виявилися випадки тяжких інфекційних станів, етіологічними факторами яких слугували мікроорганізми, що належать до нормофлори ротової порожнини [1]. Після детального філогенетичного та хемотаксономічного аналізу *Cosuria kristinae* відносно нещодавно була винесена із роду *Microsoccus* до самостійного роду *Cosuria* [2]. Зазвичай їх вважають непатогенними комесалами організму людини, які досить потужно 15 колонізують слизові оболонки порожнини рота. Проте, у пацієнтів з імунодефіцитними станами та цукровим діабетом вони можуть поводити себе як умовно-патогенні збудники і призводити до бактеріємій, а також вторинних бактеріальних інфекцій, що розвиваються на тлі первинних вірусних [2, 3]. За даними закордонних літературних джерел збудниками інфекційно-запальних ускладнень одонтоімплантації є саме представники нормальної мікрофлори порожнини рота, які 20 за умов потрапляння у зону контакту імплантату з кісткою та при порушенні опірності організму здатні викликати патологічні процеси в періімплантатних тканинах.

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, 25 на тлі розширення показань та широкого розповсюдження дентальної імплантації серед пацієнтів кількість ускладнень, що виникають на різних її етапах, збільшується.

Періімплантатний мукозит 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. 30

Особлива увага науковців до препаратів рослинного походження обумовлена їх меншою токсичністю та досить широким спектром антибактеріальної та противірусної дії [7, 4]. Оскільки виникнення асоційованих інфекцій сприяє створенню умов, за яких звичайна антибіотикотерапія є неефективною. Це дає змогу розглядати препарати, діючою речовиною яких є флавоноїди екстракту протейфлазид, як перспективу пошуку нових засобів ефективного лікування 35 інфекційних хвороб [5]. Даний екстракт отримують шляхом спиртового екстрагування (96 %-й спирт) рослинної сировини - диких злаків *Salamadrostis epigeios* та *Deschampsia caespitosa*, з яких вилучаються стійкі молекулярні комплекси трицину, апігеніну, лютеоліну та кверцитину [6]. Протейфлазид сприяє підвищенню неспецифічної резистентності організму до вірусної та 40 бактеріальної інфекції шляхом продукції ендogenous α- і γ-інтерферонів до фізіологічно активного рівня. Крім цього, він запобігає накопиченню продуктів переокислення ліпідів, пригнічуючи перебіг вільнорадикальних процесів. Екстракт є модулятором апоптозу та посилює дію апоптозіндукувальних речовин, що сприяє його значній антиоксидатній активності.

Серед тих, що відомі, є спосіб моделювання *in vitro* мікробіомів ротової порожнини для визначення факторів вірулентності пародонтопатогенних мікроорганізмів, що включає використання моделі твердої тканини зуба, який відрізняється тим, що у пробірці розміщують рідке середовище з факторами росту або антимікробними засобами, тверду фазу у вигляді розрізаного вздовж зуба людини, на котрому спіралью фіксують нитку колагену, фазу з тканини печінки та створюють анаеробні умови для культивування шляхом внесення розплавленого парафіну на поверхню середовища з наступним дослідженням факторів вірулентності пародонтопатогенних мікроорганізмів, наприклад активності колагенази, гемолізинів, лецитинази. Пат. на корисну модель 109350. Україна. МПК G09B 23/28. СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ МІКРОБІОМІВ РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ *IN VITRO* ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ФАКТОРІВ ВІРУЛЕНТНОСТІ ПАРОДОНТОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ /Смоляр Ніна Іванівна (UA); Корнійчук Олена Петрівна (UA); Федечко Йосип Михайлович (UA); Дацко Василь Андрійович (UA); заявник та патентовласник: ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО, вул. Пекарська, 69. м. Львів. 79010 (UA), - № u201601289; Заявл. 15.02.2016; Опубл. 25.08.2016, бюл. № 16/2016. 45

Також відомим є спосіб визначення факторів патогенності штамів *F.tularensis in vitro*, що 60 включає виділення, культивування, зараження клітин периферійної крові людини і оцінку

результатів, який відрізняється тим, що культивують виділений із периферійної крові людини пул лейкоцитів, що містить основні типи клітин запалення та імунної системи, клітини заражають безпосередньо після виділення, співкультивують зі збудником протягом 2-24 годин. препарати фіксують і фарбують різними барвниками, визначають клітини-мішені, а характер і ступінь цитопатичних змін встановлюють по прискоренню і посиленню інтенсивності розвитку апоптозу нейтрофілів, деструкції моноцитів-макрофагів, наявності цитоскелетів мононуклеарних фагоцитів. Пат. на корисну модель 37715 Україна. МПК G01N 33/53 (2006.01), C12Q 1/00. СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ФАКТОРІВ ПАТОГЕННОСТІ ШТАМІВ *F.TULARENSIS* IN VITRO / Стопчанська Алла Григорівна (UA); Пархоменко Наталія Борисівна (UA); Пилипенко Наталія Василівна (UA); Джуртубаева Галина Миколаївна (UA); Костюченко Людмила Сергіївна (UA); заявник та патентовласник: УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ПРОТИЧУМНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. І.І.МЕЧНИКОВА, вул. Церковна. 2/4, м. Одеса, 65003 (UA). - № u200807308; Заявл. 27.05.2008; Опубл. 10.12.2008, бюл. № 23/2008.

Найбільш близьким аналогом 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 °С 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 °С 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 по відношенню до 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); Воронін 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 поставлено задачу дослідити протимікробну активність екстракту протефлазиду щодо *Cosuria kristinae* у мікрофлорі периімплантатної ділянки при інфекційно-запальних ускладненнях одонтоімплантації.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі визначення протимікробної дії екстракту протефлазиду щодо *Cosuria kristinae* у мікрофлорі периімплантатної ділянки при інфекційно-запальних ускладненнях одонтоімплантації, що включає готування дослідних та контрольних зразків мікроорганізмів, згідно з корисною моделлю, для антибактеріальної дії щодо *Cosuria kristinae* використовують робочий розчин протефлазиду в кількості 1,0 см<sup>3</sup>, 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<sup>10</sup> КУО/см<sup>3</sup>, по 0,1 см<sup>3</sup> інокулюма вносять в кожну пробірку, що містить по 1,0 см<sup>3</sup> відповідних розведень робочого розчину, і в одну пробірку з 1,0 см<sup>3</sup> 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.

Спосіб здійснюється наступним чином: в розчині 1 мл протефлазиду 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 см<sup>3</sup> за допомогою мікропіпетки зі стерильним наконечником вносять в першу пробірку, що містить 1,0 см<sup>3</sup> бульйону. Ретельно перемішують і новим стерильним наконечником переносять 1,0 см<sup>3</sup> розчину в бульйоні в наступну пробірку з 1,0 см<sup>3</sup> бульйону. Цю процедуру повторюють для приготування всього необхідного ряду розведень. З останньої пробірки 1,0 см<sup>3</sup> бульйону видаляють. Таким чином, отримують ряд пробірок з розчинами протейфлазиду, концентрації яких відрізняються в сусідніх пробірках в 2 рази.

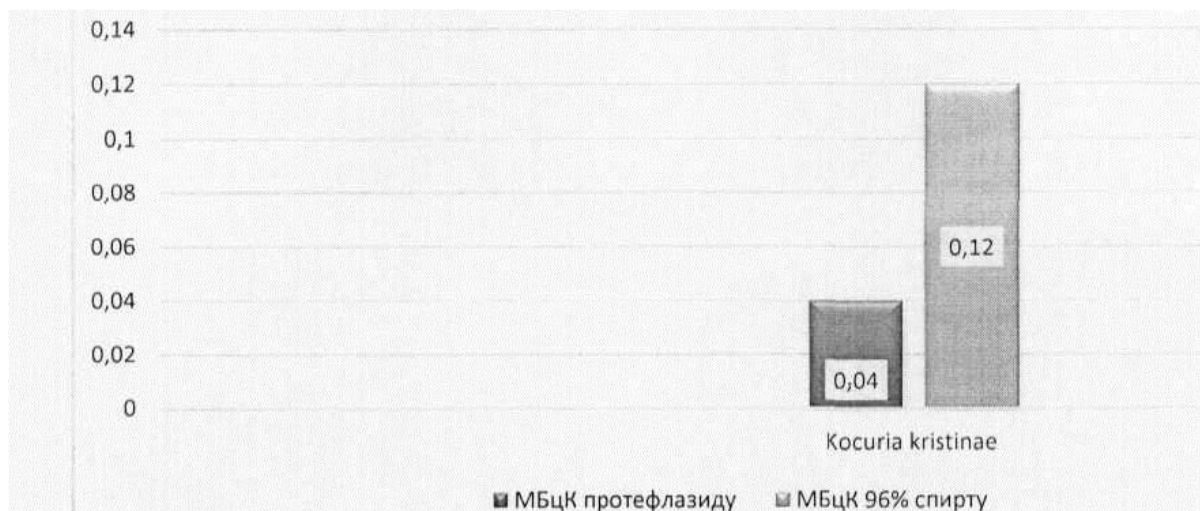
Для інокуляції використовують мікробну суспензію, еквівалентну 1,0 за стандартом МакФарланда, розведену в 100 разів у фізіологічному розчині, після чого концентрація мікроорганізмів в ній становить 3×10<sup>10</sup> КУО/см. По 0,1 см<sup>3</sup> інокулюма вносять в кожну пробірку, що містить по 1,0 см<sup>3</sup> відповідних розведень робочого розчину, і в одну пробірку з 1,0 см<sup>3</sup> 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 протейфлазиду 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 світлі, що проходить, 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) протейфлазиду, шляхом посіву мікроорганізмів з поживного бульйону на поживний агар.

Досліджувані клінічні штами *Kocuria kristinae*, виявилися чутливими до дії екстракту протейфлазиду, МБцК протейфлазиду щодо нього складала 0,04 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 протейфлазиду (табл.).

Таблиця

МБцК екстракту протейфлазиду та 96 % спирту для клінічних штамів мікроорганізмів (n=5), мкг/мл



Примітка: \* - достовірність різниці показників МБцК екстракту протейфлазиду до показників МБцК 96 % спирту, p<0,05.

Отримані дані свідчать про те, що: екстракт протейфлазиду має протимікробну дію щодо клінічних штамів мікроорганізмів *Kocuria kristinae*, що колонізують слизову оболонку пацієнтів з інфекційно-запальними ускладненнями одонтоімплантації. МБцК екстракт протейфлазид 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. Ahmed N. et al. Kocuria kristinae, an unusual pathogen causing opportunistic infections in patients with malignancy //Indian journal of medical microbiology. - 2014. - Т. 32. - №. 4. - С 456.
3. Citro R. et al. Kocuria kristinae endocarditis related to diabetic foot infection //Journal of medical microbiology. - 2013. - Т. 62. - №. 6. - С 932-934.
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.
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. Гриневиц, 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.
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

Спосіб визначення протимікробної дії екстракту протефлазиду щодо *Kocuria kristinae* 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 *Kocuria kristinae* використовують робочий розчин протефлазиду в кількості 1,0 см<sup>3</sup>, 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<sup>10</sup> КУО/см<sup>3</sup>, по 0,1 см<sup>3</sup> інокулюма вносять в кожну пробірку, що містить по 1,0 см<sup>3</sup> відповідних розведень робочого розчину, і в одну пробірку з 1,0 см<sup>3</sup> 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 М. Шамоїна

---

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