



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **144156** (13) **U**
(51) МПК (2020.01)
G01N 33/15 (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)
C12Q 1/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2020 01148</p> <p>(22) Дата подання заявки: 21.02.2020</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.09.2020</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.09.2020, Бюл.№ 17</p>	<p>(72) Винахідник(и): Лобань Галина Андріївна (UA), Басараб Ярослав Олексійович (UA), Ананьєва Майя Миколаївна (UA), Фаустова Марія Олексіївна (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 STAPHYLOCOCCUS WARNERI У МІКРОФЛОРИ ПЕРІІМПЛАНТАТНОЇ ДІЛЯНКИ ПРИ ІНФЕКЦІЙНО-ЗАПАЛЬНИХ УСКЛАДНЕННЯХ ОДОНТОІМПЛАНТАЦІЇ

(57) Реферат:

Спосіб визначення протимікробної дії екстракту протефлазиду щодо Staphylococcus warneri у мікрофлорі періімплантатної ділянки при інфекційно-запальних ускладненнях одонтоімплантації, згідно з корисною моделлю, для антибактеріальної дії щодо Staphylococcus warneri 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 3×10¹⁰ КУО/см³, по 0,1 см³ інокулюма вносять в кожную 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 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 144156 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до медичної мікробіології, та може бути призначена для визначення ступеня протимікробної дії екстракту протейфлазиду щодо *Staphylococcus warnei* 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]. *Staphylococcus warnei*, на відміну від коагулазопозитивних представників цього роду, не має настільки широкого спектра факторів патогенності. Однак відомо, що встановлення бреккет-систем, імплантатів зубів. знімних і незнімних ортопедичних конструкцій
15 для заміщення дефектів зубних рядів часто супроводжуються заселенням їх поверхню умовно-патогенною мікрофлорою, головним чином саме коагулазонегативними стафілококами, з наступним розвитком опортуністичних інфекцій [2,3]. Крім цього пусковим механізмом може слугувати порушення цілісності слизової оболонки ротової порожнини в результаті стоматологічних маніпуляцій, таких як професійна гігієна, препарування зубів тощо, а також
20 нависаючі краї пломб та ортопедичні конструкції, що не відповідають вимогам і можуть травмувати ясна.

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
30 після проточування.

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
35 екстракту протейфлазид, як перспективу пошуку нових засобів ефективного лікування інфекційних хвороб [5]. Даний екстракт отримують шляхом спиртового екстрагування (%% -й спирт) рослинної сировини - диких злаків *Calamagrostis epigeios* та *Deschampsia caespitosa*, з яких вилучаються стійкі молекулярні комплекси трицину, апигеніну, лютеоліну та кверцитину [6]. Протейфлазид сприяє підвищенню неспецифічної резистентності організму до вірусної та
40 бактеріальної інфекції шляхом продукції ендогенних 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, стосовно завданої тематики, є: полівалентний оральний гель для лікування і профілактики післяімплантатійних ускладнень у вигляді орального мукозо-
45 адгезивного гелю, який відрізняється тим, що містить такі компоненти у наступному співвідношенні:

Прополіс	20 %
Остеовіт	20 %
Метродент	20 %
Хлоргексидин	20°%
Діоксид кремнію	20°%.

[Пат.на корисну модель 10153.3 Україна, МПК А61К 31/00. Полівалентний оральний гель для лікування і профілактики післяімплантатійних ускладнень / Автори: Борисенко Анатолій Васильович (UA); Столяр Вікторія Григорівна (UA); Заявник та патентовласник: Борисенко Анатолій Васильович (UA); Столяр Вікторія Григорівна (UA). -№ u201411415; Заявл. 20.10.2014; Опубл. 25.09.2015, бюл. № 18/2015.]

Також відомий спосіб профілактики та лікування запальних ускладнень періімплантатних тканин при дентальній імплантації шляхом комплексного застосування озонотерапії з
55 протизапальними засобами органічного походження, який відрізняється тим, що призначають

вплив на ділянки післяопераційної тканини озono-повітряною сумішшю з концентрацією озону 10 мг/л протягом 2-3 хв і послідовні аплікації тонким шаром апігелю, який містить прополіс, віск, що отримані із забрусу, а також кедрову олію 2-3 рази на день, експозицією 10-15 хв курсом 7-10 днів. [Пат. на корисну модель 101130 Україна, МПК А61Н 33/14(2006.01), А61К 9/66(2006.01), А61К 35/56 (2015.01). А61L 101/10(2006.01). Спосіб профілактики та лікування запальних ускладнень періімплантатних тканин при дентальній імплантації / Автори: Кравченко Людмила Сергіївна (UA); Пасечник Олександр Владиславович (UA); Заявник та патентовласник: Одеський національний медичний університет, пров. Валіховський, 2, м. Одеса, 65082 (UA). -№ u201502573; Заявл. 23.03.2015; Опубл. 25.08.2015, бюл. № 16/2015.]

Як найближчий аналог вибрано 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 досліджуваної о 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 (ІД): 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). № u01711216: Заявл. 16.11.2017; Опубл. 25.04.2018, бюл. № 8/2018.]

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

Поставлену задачу вирішують створенням способу визначення антибактеріальної активності екстракту протефлазиду, що включає готування дослідних та контрольних зразків мікроорганізмів, та відрізняється тим, що для антибактеріальної дії щодо *Staphylococcus warneri* 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 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.

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 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 протефлазиду, концентрації яких відрізняються в сусідніх пробірках в 2 рази.

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 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 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 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) протейфлазиду, шляхом посіву мікроорганізмів з поживного бульйону на поживний агар.

Досліджувані клінічні штами *Staphylococcus warneri*, виявилися чутливими до дії екстракту протейфлазиду, МБЦК досліджуваного екстракту визначалася у кількості 0,02 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 (Див. Фіг.).

Отримані дані свідчать про те, що: екстракт протейфлазиду має протимікробну дію щодо клінічних штамів мікроорганізмів *Staphylococcus warneri*, що колонізують слизову оболонку пацієнтів з інфекційно-запальними ускладненнями одонтоімплантації. МБЦК екстракту 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. Bhardwaj B., Bhatnagar U. B., Conaway D. G. An Unusual Presentation of Native Valve Endocarditis Caused by *Staphylococcus warneri* //Reviews in Cardiovascular Medicine. - 2016. - Т. 17.

3. Pallesen L. P. et al. Multiple brain abscesses in an immunocompetent patient after undergoing professional tooth cleaning //The Journal of the American Dental Association. - 2014. - Т. 145. - № 6. - С. 564-568.

4. Оценка эффективности препарата Протейфлазид 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. Протейфлазид: 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. 393-101.

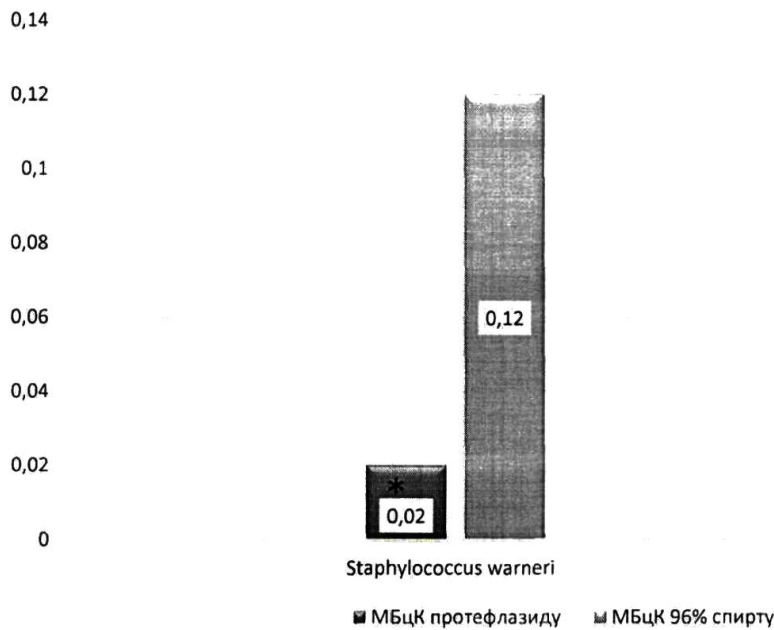
7. Balunas M. J. Drug discovery from medicinal plants / M. J. Balunas, A. D. Kinghorn // Life Sci. - 2005. - Vol. 78. - P. 431-441.

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 протейфлазиду щодо *Staphylococcus warneri* у мікрофлорі періімплантатної ділянки при інфекційно-запальних ускладненнях

одонтоімплантації, який **відрізняється** тим, що для антибактеріальної дії щодо *Staphylococcus warneri* 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 інокулума 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.



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.

Комп'ютерна верстка В. Юкін

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