

ПРИМЕНЕНИЕ МАТЕМАТИЧЕСКОГО ПОДХОДА ПРИ ОЦЕНКЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СЕРЕБРОСОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ

Игидбашян В.М.¹, Зудина И.В.², Булкина Н.В.³, Китаева В.Н.³, Сирицина В.С.², Зюлькина Л.А.¹

¹ФГБОУ ВПО «Пензенский государственный университет», Пенза, Россия (440026, г. Пенза, ул. Красная, 40, кафедра стоматологии), e-mail: sto-kafedra@yandex.ru;

²ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» Саратов, Россия (410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83);

³ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Саратов, Россия (410012, Саратов, ГСП, ул. Большая Казачья, 112).

Основным компонентом в лечении воспалительных заболеваний пародонта являются антимикробные химиотерапевтические препараты. Однако регулярное и длительное использование антибиотиков сопровождается синхронным появлением устойчивых к ним штаммов микроорганизмов, а также развитием многочисленных побочных эффектов. В связи с этим, целью исследования явилось сравнение антибактериальной активности серебросодержащих препаратов и антисептика хлоргексидина биглюконата, который достаточно широко применяется в схеме лечения генерализованного пародонтита. Проведенное микробиологическое исследование выявило наличие штаммовых различий в антимикробной активности серебросодержащих препаратов. Лучшие результаты продемонстрировали препараты кластерного серебра «Витаргол» и «Аргогель» (ООО НПЦ Вектор-Вита, Новосибирск, РФ), однако все протестированные препараты существенно уступали в активности 0,02%-му раствору хлоргексидина биглюконата. Примененный в данной работе математический аппарат для обработки данных метода диффузии в агар, предложенный С.Е. Есиповым с соавторами (1998), оказался весьма эффективным и позволил существенно сократить объем экспериментального материала для получения статистически значимых результатов сравнения антибактериальной активности препаратов серебра.

Ключевые слова: серебросодержащие препараты, генерализованный пародонтит, антибактериальная активность.

APPLICATION OF MATHEMATICAL APPROACH MAKING THE ASSESSMENT OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ARGENTIFEROUS PREPARATIONS

Igidbashyan V.M.¹, Zudina I.V.², Bulkina N.V.³, Kitayeva V.N.³, Siritsina V.S.², Zyulkin L.A.¹

¹Penza State University, Penza, Russia (440026, Penza, Krasnaya St., 40, dentistry department), e-mail: sto-kafedra@yandex.ru;

²Saratov State University n.a. Chernyshevsky, Saratov, Russia (410012, Saratov, Astrakhanskaya St., 83);

³Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, Russia (410012, Saratov, B.Kazachya St., 112).

The main component of inflammatory periodontics treatment is antibacterial chemotherapeutic compounds. However, regular and long-term use of antibiotics is accompanied by simultaneous onsets of strains of microorganisms resistant to them, and there is also a development of numerous side effects. In this regard, the aim of this research was a comparison between antibacterial activity of argentiferous preparations and chlorhexidine bigluconate antiseptics that is applied rather widely in the therapeutic regimen of a generalized periodontitis. The undertaken microbiological research revealed an existence of stain distinctions in antibacterial activity of argentiferous preparations. The best results were shown by the preparations of cluster silver "Vitargol" and "Argogel" (LLC SPC Vektor-Vita, Novosibirsk, RF), however, all tested preparations had significantly less activity than 0,02% chlorhexidine solution. The mathematical apparatus applied in this work for data processing by diffusion method in an agar offered by S.E. Yesipov and his coauthors (1998) turned out to be very effective and allowed to reduce significantly the experimental bulk for receiving statistically significant results of antibacterial activity comparison of argentiferous preparations.

Keywords: argentiferous preparations, generalized periodontitis, antibacterial activity.

Общепризнано, что одним из основных этиологических факторов развития воспалительных заболеваний пародонта (ВЗП) у человека являются анаэробные и микроаэрофильные микроорганизмы [9]. Поэтому ключевым компонентом в лечении ВЗП традиционно остаются антимикробные химиотерапевтические препараты. Однако, как показала медицинская практика, регулярное и длительное использование антибиотиков сопровождается синхронным появлением устойчивых к ним штаммов микроорганизмов, а также развитием многочисленных побочных эффектов [5, 8]. Кроме того, воспаление тканей пародонта может быть вызвано не бактериальной, а вирусной или грибковой инфекцией, перед которой антибиотики в большинстве случаев оказываются бессильны.

В настоящее время на мировом фармацевтическом рынке широко представлены препараты элементарного, кластерного и коллоидного наносеребра, которые уже сейчас нашли применение в различных областях медицины, в том числе и в стоматологии [1]. Особенностью данных препаратов является то, что механизм их действия кардинально отличается от механизма действия антибиотиков и связан с комплексобразующим и каталитическим взаимодействием серебра с отдельными мембранными структурами, белками, ферментами [3, 6, 7]. Кроме того, как было установлено, многие серебросодержащие препараты обладают противовирусной, фунгицидной и иммуномодулирующей активностями, что может оказаться особенно важным при лечении ВЗП смешанной этиологии. Однако в доступной научной литературе отсутствует описание каких-либо исследований, направленных на определение четких критериев дифференцированного выбора серебросодержащих препаратов для лечения заболеваний пародонта в зависимости от характера и тяжести патологии, а также их применения на этапе поддерживающей терапии.

Данная работа посвящена сравнению антибактериальной активности ряда серебросодержащих препаратов и антисептика хлоргексидина биглюконата, который достаточно широко применяется в схеме лечения ВЗП.

Материалы и методы

Антибактериальную активность препаратов определяли методом диффузии в агар в модификации Есипова С.Е. с соавторами [2]. В качестве бактериальной модели использовали суточные культуры референтных штаммов *Staphylococcus aureus* 209 P и *Escherichia coli* 113-13.

В 500 мл расплавленной и охлажденной до 60-65 °С питательной агаровой среды ГРМ вносили 1,5 мл взвеси суточной культуры (1 млрд/мл по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича) и разливали в чашки Петри по 20 мл. После застывания чашки подсушивали в течение 30 мин и специальным стерильным приспособлением на расстоянии 28-30 мм от центра по окружности чашки делали шесть лунок диаметром 8 мм. Контрольный раствор (стандарт) – 0,02%-ный раствор хлоргексидина биглюконата – вносили автоматической пипеткой по 0,1 мл в три лунки чашки (через одну). В другие три лунки вносили по 0,1 мл растворов испытуемого серебросодержащего препарата в трех концентрациях: 100%-ный, 50%-ный и 25%-ный (Рис. 1).

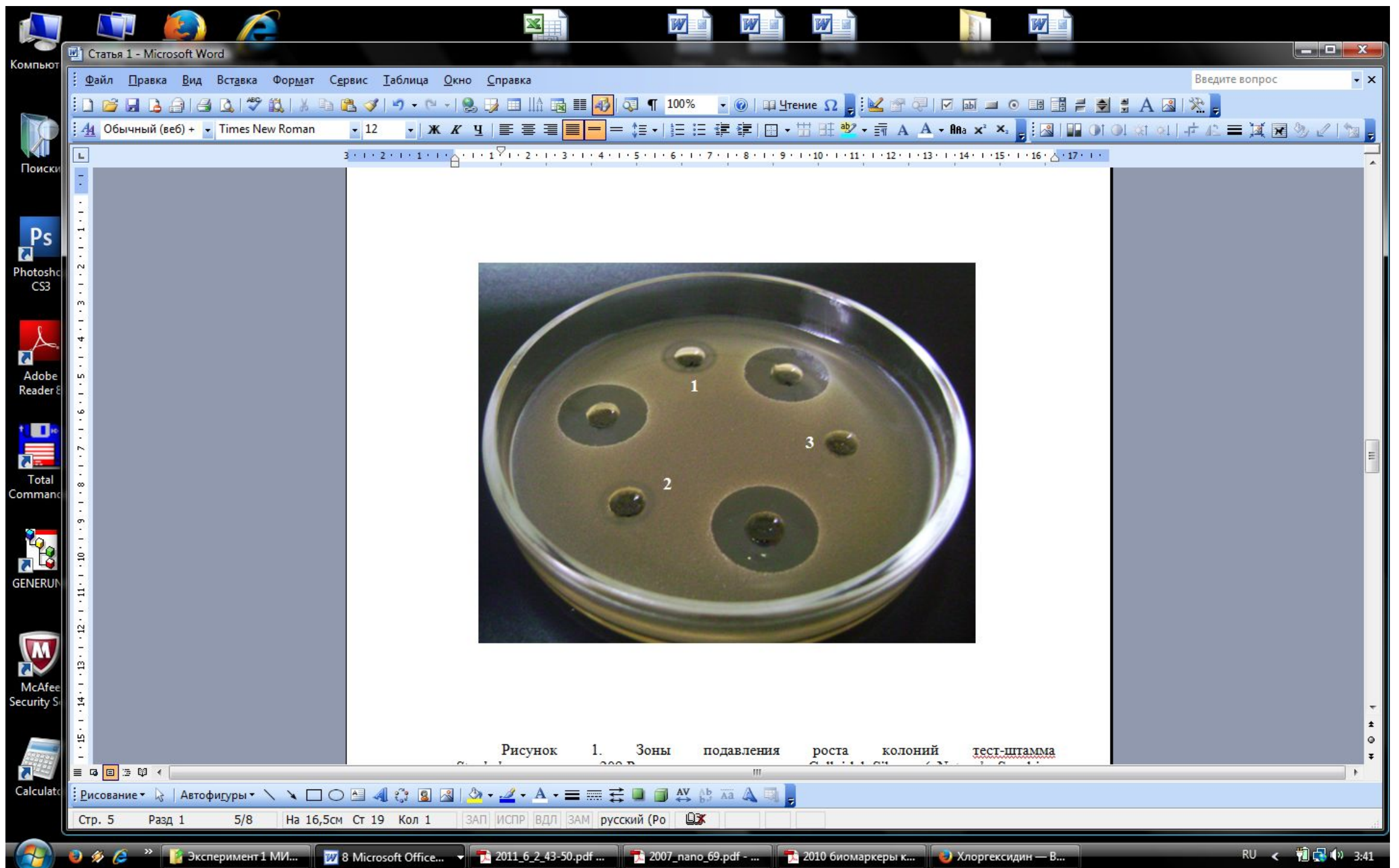


Рис. 1. Зоны подавления роста колоний тест-штамма *Staphylococcus aureus* 209 P растворами препарата «Colloidal Silver» («Nature's Sunshine Products», США), взятыми в концентрациях: 100% (1), 50% (2) и 25% (3), и стандартом – 0,02%-ным раствором хлоргексидина биглюконата (ОАО «Фармация, г. Пенза, РФ).

В качестве растворителя использовали стерильную дистиллированную воду с pH 6,8-7,0. Испытывали: препарат коллоидного серебра «Colloidal Silver» (компания «Nature's Sunshine Products», США); препарат кластерного серебра «Витаргол» (ООО НПЦ Вектор-Вита, Новосибирск, РФ); препарат кластерного серебра в геле полиэтиленоксида «Аргогель» (ООО НПЦ Вектор-Вита, Новосибирск, РФ); серебросодержащее средство «Аргакол» (ООО «Сирена», Санкт-Петербург, РФ).

Для получения статистически значимого результата на каждый испытуемый препарат брали по три чашки. После нанесения анализируемых растворов чашки выдерживали 1 час при комнатной температуре для диффузии образцов в агар и затем помещали в термостат на 18-20 ч. Через указанное время измеряли зоны задержки роста тест-штамма. О наличии линейной зависимости между диаметром зон подавления роста и логарифмом дозы препарата [по уравнению (1)] судили по значению коэффициента корреляции r ; (2):

$$d_n = a_i + b_i \cdot \lg P_n \quad (1)$$

$$r_i^2 = \frac{[\sum \lg P_n \cdot d_n - (\sum \lg P_n \cdot \sum d_n)/n]^2}{[\sum (\lg P_n)^2 - (\sum \lg P_n)^2/n] \cdot [\sum d_n^2 - (\sum d_n)^2/n]} \quad (2)$$

где d_n - среднее значение диаметра зон подавления роста при соответствующем разведении (d_1, d_2, \dots, d_n); P_n - доза материала в анализируемой пробе, выраженная в единицах разведения (P_1, P_2, \dots, P_n); a_i и b_i - коэффициенты в уравнении, характеризующие индивидуальную зависимость d_n от $\lg P_n$ для i -того анализируемого образца.

Считали, что если коэффициент корреляции имеет величину не менее 0,99, то зависимость выполняется и концентрация вещества в анализируемом образце будет определена по уравнению (3) с относительной ошибкой не более 5% [8]. Значения коэффициента b_i устанавливали по уравнению (4):

$$\lg c_n = \lg c_{st} + (d_n - d_{st(n)})/b_i; \quad \text{antilgc}_n = c_n \quad (3)$$

$$b_i = [\sum \lg P_n \cdot d_n - (\sum \lg P_n \cdot \sum d_n)/n] / [\sum (\lg P_n)^2 - (\sum \lg P_n)^2/n] \quad (4)$$

где c_1, c_2, \dots, c_n - экспериментально определенные концентрации препарата в n (трех) разведениях анализируемого образца относительно концентрации контрольного стандартного раствора (c_{st}); $d_{st(n)}$ - среднее значение диаметра зон подавления роста контрольным стандартным раствором для n_i (девяти) измерений.

Антибактериальную активность анализируемых образцов рассчитывали по уравнению (5) и выражали в единицах опорной концентрации стандарта, для которого делали допущение, что он ведет себя на чашке как анализируемый образец:

$$A_i = [(k_1 \cdot c_1 + k_2 \cdot c_2 + k_3 \cdot c_3)/3] \cdot 100\% \quad (5)$$

где A_i - биологическая активность i -того образца относительно стандартного раствора, выраженная в процентах; k_1, k_2, k_3 - кратность разведения образца препарата.

Все вычисления проводили с помощью программы Microsoft Excel (пакет ПО Microsoft Office 2010).

Результаты и обсуждение

К преимуществам антимикробных средств местного назначения (мази, гели, растворы для аппликаций, и т. д.) можно отнести их способность создавать высокую локальную концентрацию биоцидных веществ в области воспаления без значительного повышения их уровня в системной циркуляции, в результате чего снижается риск развития таких нежелательных эффектов, как дисбактериоз кишечника, гепатотоксикоз и др. В данном исследовании в качестве препарата сравнения (стандарта) был выбран антисептический препарат для наружного применения хлоргексидин биглюконат, который широко используется в стоматологии благодаря его высокой активности в отношении многих пародонтопатогенных бактерий, грибов (в том числе, в отношении *Candida albicans*), простейших (род *Trichomonas*) и некоторых вирусов [4]. В соответствии с инструкцией по применению этого антисептика для полоскания полости рта и обработки зубодесневых карманов, свищей, полостей абсцессов, рекомендуется использовать 0,05% раствор. Однако, как видно из рисунка 2, диаметр зоны подавления роста тест-штамма *S. aureus* 209 P 0,05%-ым раствором оказался слишком велик. Чтобы избежать перекрытия зон при постановке эксперимента, в качестве стандарта был взят раствор хлоргексидина биглюконата в концентрации 0,02%.

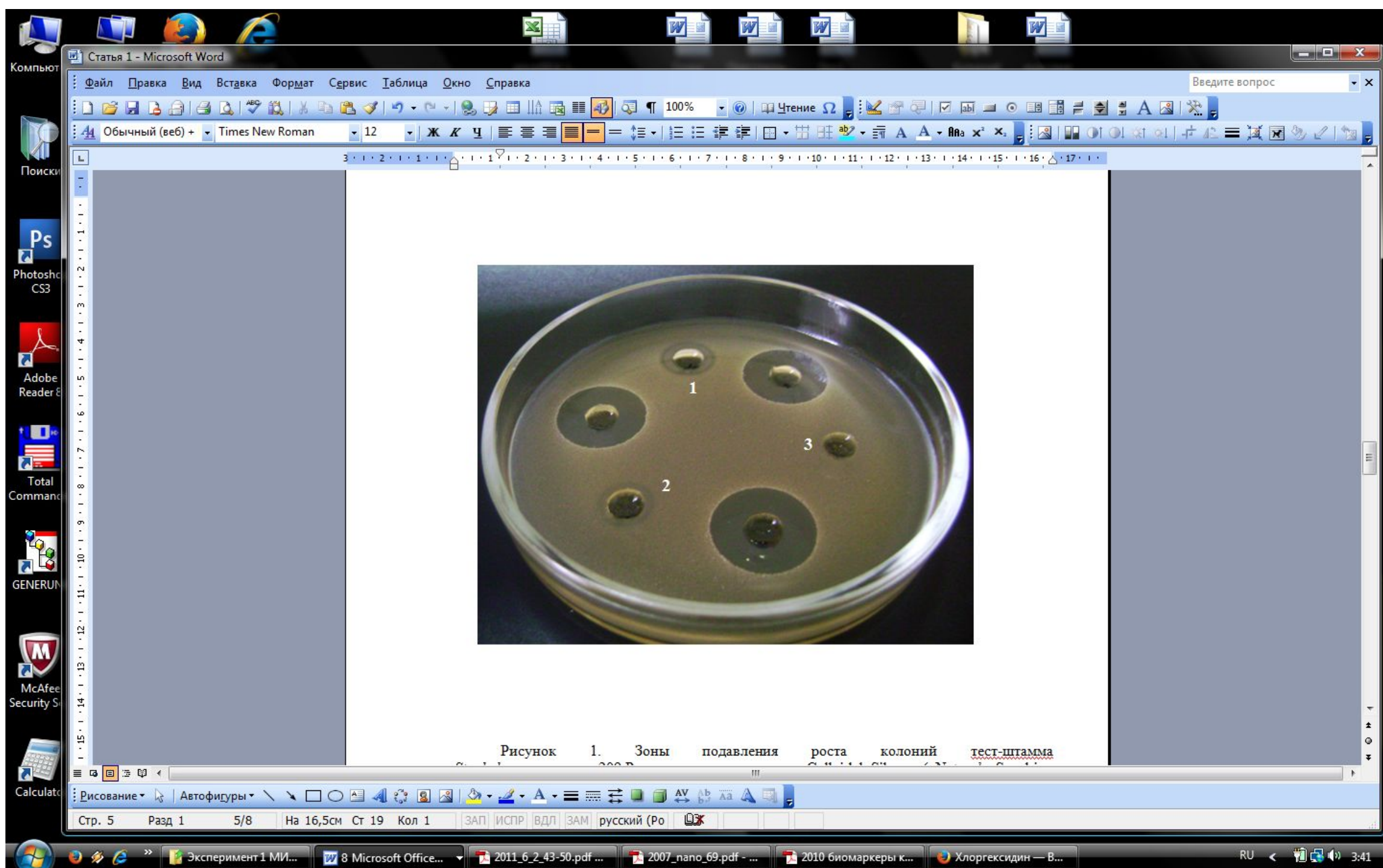


Рис. 1. Зоны подавления роста колоний тест-штамма *Staphylococcus aureus* 209 P растворами препарата «Colloidal Silver» («Nature's Sunshine Products», США), взятыми в концентрациях: 100% (1), 50% (2) и 25% (3), и стандартом – 0,02%-ным раствором хлоргексидина биглюконата (ОАО «Фармация, г. Пенза, РФ).

Серебросодержащие препараты «Аргогель», «Аргакол» и «Витаргол» и «Colloidal Silver NSP», по информации производителей и распространителей этих БАДов, активны в отношении широкого спектра анаэробных и аэробных бактерий и проявляют вирулицидную и фунгицидную активности. Однако в их составе содержатся разные количества коллоидных частиц серебра, стабилизированных различными белками и полимерами медицинского назначения. Поэтому представляло интерес сравнение антибактериальной активности этих серебросодержащих препаратов в сопоставимых условиях.

В таблице 1 представлены результаты определения биоцидного действия препаратов на колонии тест-штамма *S. aureus* 209 P, рассчитанные относительно 0,02%-го раствора хлоргексидина биглюконата.

Таблица 1

Значения антибактериальной активности (А, %) серебросодержащих препаратов в отношении культуры *S. aureus* 209 P, рассчитанные относительно стандарта (0,02% хлоргексидина биглюконата)

Препарат	k_i	Диаметр зон, мм	d_{st}	b_i	r_i^2	c_n	$A_i, \%$
«Аргакол»	2	13,7	20,0	7,9792	0,99	0,0994	19,0
	4	11,0				0,0456	
	8	8,7				0,0235	
«Аргогель»	1	16,7	20,0	8,3183	0,99	0,2506	24,6
	2	14,0				0,1187	
	4	11,7				0,0628	
«Витаргол»	1	16,0	20,0	8,0368	0,99	0,1954	20,0
	2	13,7				0,1011	
	4	11,3				0,0508	
«Colloidal Silver», NSP	1	14,7	20,0	7,2189	0,99	0,1073	9,8
	2	12,0				0,0453	
	4	10,0				0,0240	

Из данных, приведенных в таблице 1, видно, что препараты серебра по своей активности в отношении культуры золотистого стафилококка отличаются как между собой, так и в сравнении с 0,02%-ым раствором хлоргексидина биглюконата. Наиболее активными оказались отечественные препараты «Аргогель», «Аргакол» и «Витаргол». Статистически значимых различий в значениях их антибактериальной активности установлено не было ($p \geq 0,05$). Однако они были в 2-2,5 раза более активны, чем импортный препарат «Colloidal Silver» ($p \leq 0,05$). Антисептик хлоргексидина биглюконат в виде 0,02 %-го раствора значительно превосходил по своей антимикробной активности все протестированные препараты серебра ($p \leq 0,05$).

В таблице 2 приведены данные тестирования антимикробной активности серебросодержащих препаратов на модели тест-штамма *E. coli* 113-13. Снижение дозы стандарта и анализируемых образцов с 0,1 мл до 0,07 мл не отразилось на выполнении линейной зависимости между логарифмом дозы препарата и диаметром зон подавления, что свидетельствовало в пользу того, что выбранные дозы попадают в диапазон концентраций, оптимальных для определения биологической активности [8]. Наибольшую активность в отношении *E. coli* 113-13 проявил препарат «Витаргол». Он был в 2,1 раз активнее, чем препараты «Аргакол» и «Colloidal Silver» ($p \leq 0,05$), и в 1,3 раза активнее, чем «Аргогель» ($p \leq 0,05$). По сравнению с 0,02%-м раствором хлоргексидина биглюконата активность «Витаргола» была ниже на 39,3% ($p \leq 0,05$), «Аргогеля» – на 54,8% ($p \leq 0,05$), а «Аргакола» и «Colloidal Silver» – на 70,6-71,1% ($p \leq 0,05$).

Таблица 2

Значения антибактериальной активности (А, %) серебросодержащих препаратов в отношении культуры *E. coli* 113-13, рассчитанные относительно стандарта (0,02% хлоргексидина

биглюконата)

Препарат	k_i	Диаметр зон, мм	d_{st}	b_i	r_i^2	c_n	$A_i, \%$
«Аргакол»	2	12,7	15,0	7,4565	0,99	0,2909	28,9
	4	10,3				0,1386	
	8	8,3				0,0747	
«Аргогель»	1	14,3	15,0	7,1226	0,99	0,4605	45,2
	2	12,0				0,2189	
	4	10,0				0,1147	
«Витаргол»	1	15,0	15,0	7,5221	0,99	0,5945	60,7
	2	12,7				0,2940	
	4	10,7				0,1594	
«Colloidal Silver», NSP	1	13,3	15,0	6,5938	0,99	0,3051	29,4
	2	11,0				0,1367	
	4	9,3				0,0682	

Таким образом, проведенное микробиологическое исследование выявило наличие штаммовых различий в антимикробной активности серебросодержащих препаратов. Лучшие результаты продемонстрировали препараты кластерного серебра «Витаргол» и «Аргогель» (ООО НПЦ Вектор-Вита, Новосибирск, РФ), однако все протестированные препараты существенно уступали в активности 0,02%-му раствору хлоргексидина биглюконата. Благодаря тому, что данные препараты, помимо биоцидной активности, обладают еще и противовоспалительным и ранозаживляющим эффектами, они могут быть рекомендованы к применению в качестве средств профилактики и вспомогательных местных препаратов на этапе поддерживающей терапии ВЗП с целью скорейшего купирования воспалительных процессов в тканях пародонта.

Примененный в данной работе математический аппарат для обработки данных метода диффузии в агар, предложенный С.Е. Есиповым с соавторами (1998), оказался весьма эффективным и позволил существенно сократить объем экспериментального материала для получения статистически значимых результатов сравнения антибактериальной активности препаратов серебра.

Список литературы

1. Блажитко Е.М., Бурмистров В.А., Колесников А.П., Михайлов Ю.И., Родионов П.П. Серебро в медицине. – Новосибирск, Наука-Центр. 2004. – 254 с.
2. Есипов С.Е., Жиркова Л.Л., Воронкова В.В. Новый математический подход при определении концентрации антибиотиков методом диффузии в агар // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. - № 2. – С. 14-19.
3. Иванов А.Ю. Электрофизический анализ повреждения бактериальных клеток *Escherichia coli* ионами серебра / А.Ю. Иванов, В.М. Фомченко // Микробиология. – 1992. - № 3. – С. 464- 472.
4. Лекарственные препараты, применяемые в стоматологии. Справочник / Под ред. В.В. Яснецова, Г.Н. Ефремовой.– М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 352 с.
5. Царев В.Н., Ушаков Р.В. Местное антимикробное лечение в стоматологии. – М., "МИА" 2004. – 134 с.
6. Chen M, Yan L, He H, Chang Q, Yu Y, Qu J. Catalytic Sterilization of *Escherichia coli* K12 on Ag/Al₂O₃ Surface. J. Inorg. Biochem. 2007. V.101. P. 817–823.
7. Choi O, Deng KK, Kim N, Ross L, Surampalli RY, Hu Z. The Inhibitory Effects of Silver Nanoparticles, Silver Ions, and Silver Chloride Colloids on Microbial Growth. Water Res. 2008. V. 42. P. 3066–3074.
8. Guidos R.J. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives // Clin Infect Dis. 2011. V.52. P. 397–428.
9. Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Smith C., Kent R.L. Microbial complexes in subgingival plaque // J Clin Periodontol. 1998. V. 25. № 2. P. 134-44.

Рецензенты:

Скуридин П.И., д.м.н., главный врач ГАУЗ ПО «Городская стоматологическая поликлиника», г. Пенза.

Еремина Н.В., д.м.н., заведующая кафедрой стоматологии общей практики и стоматологии терапевтической ГБОУ ДПО «Пензенский институт усовершенствования врачей» Минздрава России, г. Пенза.