

Wrażliwość bakterii beztlenowych wyizolowanych z blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych na Dentosept

¹Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Katedra Mikrobiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik Zakładu: dr hab. Anna Kędzia, prof. nadzw.

²Oddział Chirurgii Naczyniowej, Pomorskie Centrum Traumatologii im. M. Kopernika w Gdańsku
Ordynator: dr med. Marek Ciecierski

SUSCEPTIBILITY OF ANAEROBIC BACTERIA ISOLATED FROM THE CAROTID ATHEROSCLEROTIC PLAQUE TO DENTOSEPT

SUMMARY

The investigation of aetiology of atherosclerosis shows close relationships between inflammatory processes and the evolution of plaques. Chronic dental infections are strongly associated with atherosclerosis. Recent publication suggest connection between periodontitis and main periodontal bacterial pathogens (especially anaerobes) and atherosclerosis. Herbal drugs (e.g. Dentosept) are more and more frequently used in prophylactic and therapy of oral cavity infections. The aim of this study was evaluation the susceptibility of anaerobic bacteria to Dentosept. A total of 23 strains anaerobic bacteria isolated from carotid atherosclerotic plaques was tested. The susceptibility (MIC) of anaerobes was determined by means of plate dilution techniques, in Brucella agar, supplemented with 5% sheep blood. Inoculum containing 10^5 CFU/spot was seeded with Steers replicator upon the surface agar. Incubation was performed in anaerobic jar in anaerobic conditions, at 37°C for 48 hrs. The MIC was interpreted as the lowest concentration Dentosept inhibiting the growth of anaerobic strains. The results indicated, that the strains from Gram-negative rods from genus of *Tannerella forsythia* were the most sensitive to Dentosept (MIC $\leq 0,3$ mg/ml). The strains from genus of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* were less sensitive to this herbal drug (MIC in ranges 0,6 - $\geq 2,0$ mg/ml). From among Gram-positive anaerobes the most sensitive were the strains *Micrococcus micros* (MIC $< 0,3$ mg/ml). The Gram-positive rods from genera of *Propionibacterium* and *Actinomyces* were less sensitive to Dentosept. MIC of the strains were the ranges from $\leq 0,3$ to $\geq 2,0$ mg/ml. The Dentosept was the more active against Gram-positive bacteria than Gram-negative rods.

KEY WORDS: DENTOSEPT – ANAEROBIC BACTERIA – SUSCEPTIBILITY – CAROTID ATHEROSCLEROTIC PLAQUE

Bakterie beztlenowe stanowią przeważający składnik flory fizjologicznej jamy ustnej. Ich liczba w różnych jej okolicach wynosi od 10^8 do 10^{11} /g lub ml. Beztlenowce występują w ślinie, na błonach śluzowych, w kieszonkach przyzębnych oraz w tworzonej na powierzchni zębów tzw. bakteryjnej płytce nazębnej. Niektóre gatunki bakterii mogą w sprzyjających warunkach stać się patogenne i powodować zakaże-

nia nie tylko w obrębie jamy ustnej, ale też innych narządów. Prowadzone od kilkunastu lat badania dotyczące miażdżycy tętnic wskazują, że wśród ważnych czynników przyczyniających się do jej rozwoju jest proces zapalny. Prowadzone w ostatnich latach badania udowodniły, że przewlekłe zakażenia bakteryjne i wirusowe mogą zapoczątkować miażdżycę albo podtrzymać jej rozwój. Wśród drobnoustrojów, których rola w tym procesie została wykazana, były między innymi bakterie z gatunku *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, a także wirusy, tj. *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex* i *Hepatitis virus A* (1-7). Obecnie coraz częściej podkreśla się, że drobnoustroje, które powodują choroby przyzębia, mogą stanowić ważny czynnik w rozwoju miażdżycy tętnic.

Badania prowadzone przez Spahra i wsp. (8) wskazały na istnienie zależności między ogólną liczbą drobnoustrojów występujących w patologicznych kieszonkach przyzębnych, a częstością występowania choroby niedokrwiennej serca. W innych doświadczeniach Zaremba i wsp. (9) udowodnili, że niektóre drobnoustroje obecne w kieszonkach przyzębnych również występowały w blaszce miażdżycowej naczyń wieńcowych. Wykorzystując metodę molekularną PCR kolejni autorzy (10, 11) wykryli w blaszkach miażdżycowych drobnoustroje, w tym beztlenowe, wyjątkowo patogenne dla tkanek przyzębia. Z powyższego wynika, że zarówno zapobieganie, jak i leczenie choroby przyzębia jest istotnie ważne, szczególnie u pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi.

Coraz częściej w profilaktyce i terapii chorób w obrębie jamy ustnej stosuje się preparaty roślinne. Jednym z takich leków jest Dentosept (Phytopharm). Zawiera on płynne wyciągi z zieleń tyminu, mięty pieprzowej, dębu, koszyczków rumianku i kłaczy tataraku. Wśród składników występują: 1,8-cyneol, α - i β -pinen, triterpeny, alkohole seskwiterpenowe, kwasy fenolowe, flawonoidy i garbniki. Zawartość różnych olejków eterycznych zapewnia działanie przeciwwa-

palne i przeciwdrobnoustrojowe preparatu (12-22). Badania potwierdziły aktywność zarówno Dentoseptu, jak i olejków eterycznych, bądź ich składników, wobec niektórych bakterii beztlenowych wyizolowanych z zakażeń jamy ustnej (18, 20-23). Ponieważ bakterie beztlenowe powodujące choroby przyzębia mogą być obecne w blaszce miażdżycowej, autorzy postanowili ocenić działanie wyhodowanych z takich materiałów beztlenowców na Dentosept.

Cel pracy

Celem pracy było oznaczenie wrażliwości na Dentosept bakterii beztlenowych wyizolowanych z blaszek miażdżycowych umiejscowionych w tętnicach szyjnych.

Materiał i metody

Blaszki miażdżycowe zostały pobrane aseptycznie w czasie zabiegu operacyjnego udrażniania tętnic szyjnych od 30 pacjentów. Wycinki tętnic umieszczano w pojemniku z płynem transportowym przygotowanym metodą PRAS (24, 25) i w ciągu 1 godziny dostarczano do laboratorium. Następnie materiały były posiewane na podłoża wybiórcze i wzbogacone, z dodatkiem 5% krwi baraniej, menadionu i heminy. Posiewy inkubowano przez 10-14 dni w anaerostatach w atmosferze gazów: 10% CO₂, 10% H₂ i 80% N₂, w obecności katalizatora palladowego i wskaźnika warunków beztlenowych. Wyizolowane szczepy bakterii beztlenowych klasyfikowano zgodnie z obecnie obowiązującymi zasadami (24-26). Identyfikacja obejmowała morfologię kolonii, cechy biochemiczne (testy API 20A firmy bioMerieux), wytwarzanie z glukozy kwasów tłuszczowych (od C₁ do C₆) oraz kwasu mlekowego, bursztynowego i fumarowego metodą

chromatografii gazowej i zdolności do fluorescencji w promieniach UV (24 -26).

Badaniu wrażliwości na Dentosept (Phytopharm) poddano 23 szczepy należące do rodzajów: *Prevotella* (4 szczepy), *Porphyromonas* (4), *Tannerella* (2), *Fusobacterium* (3), *Micromonas* (1), *Finegoldia* (3), *Propionibacterium* (4) i *Actinomyces* (2) oraz 4 szczepy wzorcowe z gatunków: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25585, *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337 i *Propionibacterium acnes* ATCC 11827.

Do oznaczenia wrażliwości bakterii beztlenowych wykorzystano metodę seryjnych rozcieńczeń preparatu w agarze Brucella z dodatkiem 5% krwi baraniej, menadionu i heminy (27). Bezpośrednio przed badaniem Dentosept rozcieńczano w jałowej wodzie destylowanej w zakresie stężeń od 0,3 do 20,0 mg/ml. Inokulum zawierające 10⁵ CFU/kroplę наносono aparatem Steersa na powierzchnię podłoża zawierających odpowiednie stężenia Dentoseptu. Podłoże agarowe bez preparatu stanowiło kontrolę wzrostu ocenianych szczepów. Inkubację podłoża prowadzono w 37°C w anaerostatach w warunkach beztlenowych przez 48 godzin. Za MIC uznawano takie najmniejsze rozcieńczenia preparatu, które całkowicie hamowały wzrost bakterii beztlenowych.

Wyniki i ich omówienie

Uzyskane wyniki badań wrażliwości bakterii beztlenowych wyizolowanych z blaszek miażdżycowych na Dentosept zostały umieszczone w tabeli 1, a szczepy wzorcowe w tabeli 2. Wśród ocenianych 13 szczepów Gram-ujemnych bakterii największą wrażliwością charakteryzowały się szczepy z gatunku *Tannerella forsythia*. Stężenia preparatu hamujące ich wzrost

Tabela 1. Wrażliwość bakterii beztlenowych wyizolowanych z blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych na Dentosept.

Drobnoustroje	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące (MIC) (mg/ml)						
		≥ 20,0	10,0	5,0	2,5	1,2	0,6	≤ 0,3
Gram-ujemne:								
<i>Prevotella buccalis</i>	2	2						
<i>Prevotella intermedia</i>	2	2						
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	4	2				1	1	
<i>Tannerella forsythia</i>	2							2
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	3	2				1		
Gram-dodatnie pałeczki:								
<i>Propionibacterium acnes</i>	2	1						1
<i>Propionibacterium granulosum</i>	2				2			
<i>Actinomyces israelii</i>	2	2						
Gram-dodatnie ziarniaki:								
<i>Micromonas micros</i>	1							1
<i>Finegoldia magna</i>	3	1				1		1
Bakterie beztlenowe ogółem	23	12			3	2	1	5

Tabela 2. Wrażliwość szczepów wzorcowych bakterii beztlenowych na Dentosept.

Szczepy wzorcowe	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące (MIC) (mg/ml)						
		≥ 20,0	10,0	5,0	2,5	1,2	0,6	≤ 0,3
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	1	1						
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25585	1	1						
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	1							1
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	1							1

wynosiły $\leq 0,3$ mg/ml. Niższą wrażliwość wykazały szczepy pałeczek *Porphyromonas gingivalis* (MIC w zakresie $0,6 - \geq 20,0$ mg/ml) oraz *Fusobacterium nucleatum* (MIC w zakresie $1,2 - \geq 20,0$ mg/ml). Najniższą aktywność wykazał Dentosept wobec szczepów z gatunku *Prevotella buccalis* i *Prevotella intermedia*. Stężenia potrzebne do zahamowania wzrostu tych szczepów wynosiły $\geq 20,0$ mg/ml. Spośród Gram-ujemnych bakterii 38% szczepów było wrażliwych na niskie stężenia w zakresie od $\leq 0,3$ do $1,2$ mg/ml. Wśród Gram-dodatnich beztlenowców wyższą wrażliwością charakteryzowały się testowane ziarniaki, z których 50% szczepów wymagało do zahamowania wzrostu stężeń wynoszących $\leq 0,3$ mg/ml, a kolejne 25% stężeń wynoszącego $2,5$ mg/ml. Najbardziej wrażliwy na Dentosept okazał się szczep z gatunku *Micromonas micros* (MIC $< 0,3$ mg/ml). Natomiast Gram-dodatnie pałeczki beztlenowe wykazały niższą wrażliwość. Dentosept był bardziej aktywny wobec szczepów z gatunku *Actinomyces israelii* (MIC = $2,5$ mg/ml), niż wobec szczepów z rodzaju *Propionibacterium* (MIC $\leq 0,3 - \geq 20,0$ mg/ml). Z badań wynika, że Dentosept był bardziej aktywny wobec Gram-dodatnich niż wobec Gram-ujemnych bakterii beztlenowych. Stężenia preparatu w zakresie $\leq 0,3-2,5$ mg/ml hamowały wzrost 38% Gram-ujemnych i 60% szczepów Gram-dodatnich bakterii beztlenowych.

Z wcześniejszych badań (23), w których oceniano wrażliwość na Dentosept bakterii beztlenowych wyizolowanych z kieszonek przyzębnych wynika, że te same gatunki, które były oceniane przez nas, charakteryzowały się wyższą wrażliwością w niskich stężeniach. Preparat w granicach MIC wynoszących $\leq 0,6$ mg/ml hamował wzrost 31% szczepów, a w naszych badaniach stężenia w zakresie $\leq 0,3-0,6$ mg/ml hamowały 26% szczepów beztlenowców. Jednak niskie stężenia preparatu, w zakresie $\leq 0,6-2,5$ mg/ml, w poprzednich badaniach hamowały 38% szczepów, a stężenia wynoszące $\leq 0,3-2,5$ mg/ml były aktywne wobec 48% obecnie testowanych szczepów tych sa-

mych gatunków. Wyraźne różnice zaobserwowano też w przypadku najwyższego badanego stężenia Dentoseptu. W poprzednich badaniach odsetek szczepów, które do zahamowania wzrostu wymagały użycia wyższych stężeń, wynoszących $\geq 20,0$ mg/ml preparatu, wynosił 25%, a w obecnym badaniu był znacznie wyższy i wynosił 52%. Natomiast zbliżoną aktywność wykazał Dentosept wobec Gram-dodatnich bakterii w obu badaniach. Preparat w zakresie MIC $\leq 0,3-0,6$ mg/ml hamował wzrost 28% (poprzednie badania) i 30% szczepów beztlenowych (obecne badania). Podobnie jak w poprzednich doświadczeniach, szczepy Gram-dodatnich ziarniaków charakteryzowały się wyższą wrażliwością, niż szczepy Gram-dodatnich pałeczek.

Warto zaznaczyć, że Dentosept wykazał dużą aktywność wobec testowanych bakterii beztlenowych, mimo że użyte do badań stężenia były od 3 do 100 razy niższe od tych, które zwykle stosowane są w praktyce.

Wnioski

1. Największą aktywność Dentosept wykazał wobec szczepów *Tannerella forsythia* i *Micromonas micros*.
2. Najmniej wrażliwe były szczepy z gatunku *Prevotella buccalis*, *Prevotella intermedia* i *Propionibacterium granulosum*.
3. Preparat charakteryzował się dużą skutecznością działania wobec wszystkich ocenianych drobnoustrojów beztlenowych.
4. Stężenia Dentoseptu użyte w badaniach były znacznie niższe od zwykle stosowanych w praktyce.

Piśmiennictwo

1. Ridker PM, Hennekens CH, Stamper MJ i wsp. Prospective study of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and the risk of future myocardial infarction and stroke. *Circulation* 1998; 98:2796-9.
2. Zhu JH, Quyyumi AA, Norman JE i wsp. Effect of total pathogen burden on coronary artery disease risk and C-reactive protein levels. *Am J Cardiol* 2000; 85(2):140-6.
3. Ameriso SF, Fridman EA, Leiguarda RC i wsp. Detection of *Helicobacter pylori*

- in human carotid atherosclerotic plaques. *Stroke* 2001; 32:385-91.
4. Farsak B, Yildirim A, Akyon Y i wsp. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* DNA in human atherosclerotic plaques by PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38(12): 4408-11.
 5. Kaplan M, Yavuz SS, Cinar B i wsp. Detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaques of carotid artery by polymerase chain reaction. *Int Infect Dis* 2006; 10(2):116-23.
 6. Kędzia A, Ciecierski M, Wierzbowska M i wsp. Isolation of *Helicobacter pylori* from femoral or iliac atherosclerotic plaques. *Acta Angiol* 2010; 16(13):129-34.
 7. Melnic JL, Hu C, Burek J i wsp. *Cytomegalovirus* DNA in arterial walls of patients with atherosclerosis. *J Med Virol* 1994; 42:170-4.
 8. Spahr A, Klein E, Khuseyinova N i wsp. Periodontal infections and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 2006; 166:544-59.
 9. Zaremba M, Górska R, Suwalski P. Ocena występowania bakterii związanych z chorobą przyzębia w blaszce miażdżycowej naczyń wieńcowych. *Czas Stomatol* 2005; 58(5):293-311.
 10. Chin B. Multiple infection in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J* 1999; 138:534-6.
 11. Carvini F, Sambì V, Moter A i wsp. Molecular detection of *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* in carotid and aortic atheromatous plaques by FISH: report of two cases. *J Med Microbiol* 2005; 54:93-6.
 12. Inoue S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47:507-73.
 13. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem* 2003; 10:813-29.
 14. Paulo A. Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int J Aromather* 2001; 11(3):126-33.
 15. Kędzia B. Przeciwdrobnoustrojowe działanie *Ol. Chamomille* i jego składników. *Herba Pol* 1991; 37(1):29-38.
 16. Azaz AD, Irtem HA, Kurkcuoglu M i wsp. Composition and the *in vitro* antimicrobial activities of the essential oils of some *Thymus* species. *Z Naturforsch* 2004; 59(1-2): 75-80.
 17. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med* 2006; 6:39-43.
 18. Kędzia A. Działanie olejku z mięty pieprzowej (*Oleum Menthe piperitae*) na bakterie beztlenowe. *Post Fitoter* 2007; 4:182-6.
 19. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999; 86:985-92.
 20. Kędzia A. Ocena wrażliwości bakterii beztlenowych na olejek tymiankowy. *Post Fitoter* 2006; 6(3):131-5.
 21. Kusiak A, Kędzia A, Bochniak M i wsp. The activity *in vitro* of sage essentials oil (*Ol. Salviae*) against bacteria isolated from infections of oral cavity. *Pol J Environ Study* 2009; 18(6A):132-6.
 22. Kusiak A, Kędzia A, Molenda-Ciszewska B i wsp. Działanie olejku z mięty pieprzowej na bakterie beztlenowe. *Dent Med Probl* 2010; 47(3):334-8.
 23. Kędzia A. Działanie Dentoseptu na bakterie beztlenowe wyizolowane z kieszonek dziąsłowych. *Czas Stomatol* 2000; 53(8):479-84.
 24. Kałowski M, Kędzia A. Nieprzetwarzające bakterie beztlenowe. W: Diagnostyka mikrobiologiczna w medycynie (Kędzia W red.). PZWL, Warszawa 1990.
 25. Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC. *Anaerobe Laboratory Manual*. VPI 4th ed. Blakburg, 1977.
 26. Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*, 12th ed. Mosby Elsevier, St. Louis 2007.
 27. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: approved standard*. 6th ed. M11-M6. PA NCCLS. Wayne 2003.

otrzymano/received: 05.01.2012
zaakceptowano/accepted: 28.01.2012

Adres/address:
*dr hab. Anna Kędzia, prof. nadzw.
Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Katedra Mikrobiologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Do Studzienki 38, 80-227 Gdańsk
tel.: +48 (58) 349-21-85
e-mail: zmju@amg.gda.pl