

*Anna Kędzia¹, Marek Ciecierski², Joanna Wiśniewska², Iwona Skwierz³,
Andrzej Kufel³, Ewa Kwapisz¹

Działanie preparatu Aromatol na bakterie mikroaerofilne i tlenowe wyizolowane z blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych

¹Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Katedra Mikrobiologii, Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik Zakładu i Katedry: prof. dr hab. n. med. Anna Kędzia

²Oddział Chorób Naczyń i Chorób Wewnętrznych, Szpital Uniwersytecki nr 2, Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika w Toruniu
Ordynator Oddziału: dr n. med. Grzegorz Pulkowski

³Oddział Chirurgii Naczyń, Szpital Swissmed, Gdańsk
Ordynator Oddziału: lek. med. Andrzej Kufel

THE ACTIVITY TO AROMATOL MICROAEROPHILIC
AND AEROBIC BACTERIA ISOLATED FROM CAROTID
ATHEROSCLEROTIC PLAQUES

KEYWORDS: MICROAEROPHILIC BACTERIA
- AEROBES - AROMATOL - SUSCEPTIBILITY
- ATHEROSCLEROTIC PLAQUE

SUMMARY

Introduction. Some epidemiological investigations have demonstrated an association between periodontal disease and coronary heart disease or atherosclerosis. The herbal drug are frequently administered prophylactically and for treatment oral infections (e.g. periodontal diseases). Among the drugs is Aromatol too.

Aim. The aim of this study was to evaluate the activity of Aromatol against microaerophilic and aerobic bacteria isolated from carotid atherosclerotic plaque.

Material and methods. The bacteria were isolated from carotid atherosclerotic plaque, obtained from 30 patients during vascular surgery. The susceptibility of 19 of microaerophilic bacteria, 30 strains of aerobes and 6 reference strains to Aromatol (Hasco-Lek, Wrocław) were tested. Investigation was carried out using the plate dilution technique in Brucella agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood (microaerophilic and anaerobic reference strains bacteria) and Mueller-Hinton agar (aerobic bacteria).

Results. The data showed, that most susceptible to herbal drug were the strains of Gram-positive microaerophilic rods from genus of *Rothia dentocariosa* and Gram-negative rods from genus of *Campylobacter rectus* (MIC \leq 5.0-10.0 mg/ml). The other microaerophilic strains tested were sensitive in the ranges from \leq 5.0- \geq 20.0 mg/ml and aerobic bacteria (without one strains, *S. sanguinis*) in concentrations \geq 20.0 mg/ml.

Conclusions. The Aromatol was more active against Gram-positive bacteria than tested Gram-negative rods. The most susceptible to herbal drug were *Rothia dentocariosa*, *Campylobacter rectus* and *Streptococcus sanguinis*. The aerobes were less susceptible than microaerophilic bacteria (MIC 10.0- \geq 20.0 mg/ml and \leq 5.0- \geq 20.0 mg/ml).

Wstęp

Prowadzone od szeregu lat badania wskazują na związek chorób przyzębia z chorobami układu krążenia, w tym miażdżycą naczyń tętniczych oraz zawałem mięśnia sercowego. Wykorzystując przede wszystkim metodę PCR (ang. *polymerase chain reaction*), a także mikroskop elektronowy, rzadziej metodę hodowli, wykazano w blaszce miażdżycowej obecność takich drobnoustrojów, jak *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, wirus *Cytomegalii* (CMV) oraz wirusy *Herpes simplex* (HSV) i *Coxsackie B* (1-8). Wykazano też obecność w blaszce miażdżycowej niektórych bakterii beztlenowych, mikroaerofilnych i tlenowych, które występują w patologicznych kieszonkach przyzębnych i często są przyczyną chorób w obrębie jamy ustnej. Wśród drobnoustrojów występujących w blaszce miażdżycowej stwierdzono m.in. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus* i *Eikenella corrodens*, a z drobnoustrojów tlenowych i względnie beztlenowych: niektóre pałeczki z gatunku *Escherichia coli* oraz z rodzaju *Burkholderia*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, a także ziarniaki z rodzaju *Staphylococcus* i *Streptococcus* (8-20).

Biorąc pod uwagę powyższe informacje, należy uznać, że szczególnie u pacjentów z chorobami sercowo-naczyniowymi istotne będzie zarówno zapobieganie, jak i leczenie chorób przyzębia. W tym celu często wykorzystywane są pomocniczo różne preparaty roślinne, w tym Aromatol. Lek ten znalazł zastosowanie w przypadku zaburzeń trawienia, w niestrawności i zaburzeniach krążenia. Może on być też stosowany zewnętrznie do inhalacji w przeziębieniach, grypie i anginie. Ponadto używany jest do nacierania i okładów, jako środek łagodzący bóle reumatyczne i nerwobóle.

Aromatol jest preparatem wieloskładnikowym i w 100,0 g zawiera: lewomentol (1,72 g), olejek cytrynowy (0,57 g), olejek z mięty polnej (z obniżoną zawartością mentolu), z kory cynamonowca cejlońskiego i lawendowy (po 0,24 g), olejek goździkowy i cytronełowy (po 0,1 g) oraz substancje pomocnicze, etanol 96% i wodę oczyszczoną. Działanie przeciwdrobnoustrojowe preparatu wiąże się z obecnością olejków eterycznych (21-39). Obejmuje ono zarówno bakterie beztlenowe, jak i mikroaerofilne oraz bakterie tlenowe występujące w jamie ustnej, które powodują choroby przyzębia i inne zakażenia. Niektóre z tych bakterii zostały wykryte w blaszkach miażdżycowych.

Cel pracy

Celem pracy była ocena wrażliwości na preparat Aromatol bakterii mikroaerofilnych i tlenowych wyizolowanych z blaszek miażdżycowych, usytuowanych w tętnicach szyjnych.

Materiał i metody badań

Wykorzystane w badaniach bakterie mikroaerofilne i tlenowe zostały wyhodowane z 30 blaszek miażdżycowych pobranych od pacjentów poddanych zabiegom udroźniania tętnic szyjnych. Pobrane aseptycznie materiały umieszczano w jałowych pojemnikach zawierających odpowiednie podłoże transportowe. Badaniem wrażliwości objęto łącznie 49 szczepów, w tym 19 szczepów bakterii mikroaerofilnych z gatunków: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (6 szczepów), *Campylobacter rectus* (4), *Eikenella corrodens* (4), *Rothia dentocariosa* (5), a także 3 szczepy wzorcowe z gatunku *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 oraz 30 szczepów bakterii tlenowych, tj. *Staphylococcus aureus* (7), *Staphylococcus epidermidis* (6), *Streptococcus sanguinis* (4), *Pseudomonas aeruginosa* (2), *Pseudomonas* spp. (3), *Acinetobacter* spp. (6), *Escherichia coli* (2) i 3 szczepy wzorcowe: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 i *Escherichia coli* ATCC 25922.

Wrażliwość (MIC) na preparat Aromatol (Hasco-Lek, Wrocław) wymienionych bakterii mikroaerofilnych i 3 szczepów wzorcowych bakterii beztlenowych oznaczono metodą seryjnych rozcieńczeń w agarze *Brucella* z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej oraz bakterii tlenowych w agarze *Mueller-Hinton*. Zbadano następujące rozcieńczenia preparatu: 20,0, 15,0, 10,0, 7,5 i 5,0 mg/ml. Inokulum zawierające 10⁵ CFU na kroplę наносono aparatem Steersa na agar zawierający odpowiednie rozcieńczenia Aromatolu. Kontrolę wzrostu szczepów stanowiło podłoże niezawierające preparatu. Inkubację prowadzono w warunkach mikroaerofilnych (*Campy Pak*, *BBL*), w warunkach beztlenowych (szczepy wzorcowe bakterii beztlenowych) w 37°C przez 48 godzin i w warunkach tlenowych (bakterie tlenowe) w 37°C przez 24 godziny. Za MIC przyjęto takie najniższe stężenie preparatu, które całkowicie hamowało wzrost testowanych szczepów bakterii.

Wyniki badań i omówienie

Uzyskane wyniki badań wrażliwości na Aromatol wyizolowanych z blaszek miażdżycowych tętnic szyjnych bakterii mikroaerofilnych oraz szczepów wzorcowych zamieszczono w tabeli 1, a szczepów bakterii tlenowych i odpowiednich szczepów wzorcowych w tabeli 2.

Wśród bakterii mikroaerofilnych największą wrażliwość na preparat wykazały szczepy Gram-ujemnych pałeczek z gatunku *Campylobacter rectus*, a z Gram-dodatnich pałeczek *Rothia dentocariosa*. Wartości MIC dla tych szczepów wynosiły od ≤ 5,0-10,0 mg/ml. W przypadku pałeczek z gatunku *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 67% szczepów było wrażliwych w zakresie stężeń od ≤ 5,0-10,0 mg/ml. Wartości MIC dla pozostałych szczepów były wyższe i wynosiły 20,0 mg/ml i więcej. Natomiast wzrost 75% Gram-ujemnych pałeczek z gatunku *Eikenella corrodens* był hamowany przez niskie stężenia wynoszące ≤ 5,0 mg/ml, a pozostałych szczepów w stężeniach > 20,0 mg/ml.

Spośród ocenianych bakterii tlenowych największą wrażliwością charakteryzowały się szczepy paciorkowców z gatunku *Streptococcus sanguinis* (MIC w zakresie 10,0-20,0 mg/ml). Niższą wrażliwość wykazały szczepy pozostałych ziarniaków. Wzrost tylko 1 (14%) szczepu z gatunku *Staphylococcus aureus* był hamowany w stężeniu wynoszącym 20,0 mg/ml. Pozostałe testowane gronkowce, zarówno z gatunku *Staphylococcus aureus*, jak i *Staphylococcus epidermidis*, wymagały do zahamowania wzrostu użycia wyższych stężeń (MIC > 20,0 mg/ml). Znacznie niższą aktywność wykazał Aromatol wobec Gram-ujemnych pałeczek. Tylko 2 (33%) szczepy

Tab. 1. Wrażliwość szczepów bakterii mikroaerofilnych i szczepów wzorcowych na preparat Aromatol

Bakterie mikroaerofilne	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC w mg/ml					
		≥ 20,0	20,0	15,0	10,0	7,5	≤ 5,0
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	6	1	1		1	1	2
<i>Campylobacter rectus</i>	4				1		3
<i>Eikenella corrodens</i>	4	1					3
<i>Rothia dentocariosa</i>	5				1		4
Bakterie mikroaerofilne ogółem	19	2	1		3	1	12
Szczepy wzorcowe							
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	1				1		
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	1					1	
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	1						1

Tab. 2. Wrażliwość szczepów bakterii tlenowych i szczepów wzorcowych na preparat Aromatol

Bakterie tlenowe	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC w mg/ml					
		≥ 20,0	20,0	15,0	10,0	7,5	5,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	6	1				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6	6					
<i>Streptococcus sanguinis</i>	4		2	1	1		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	2					
<i>Pseudomonas</i> spp.	3	3					
<i>Acinetobacter</i> spp.	6	4	2				
<i>Escherichia coli</i>	2	2					
Bakterie tlenowe ogółem	30	23	5	1	1		
Szczepy wzorcowe							
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1	1					
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	1	1					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	1					

z rodzaju *Acinetobacter* spp. wykazały wrażliwość w stężeniu wynoszącym 20,0 mg/ml. Pozostałe szczepy Gram-ujemnych pałeczek, w tym z gatunku

Pseudomonas aeruginosa, *Escherichia coli* oraz z rodzaju *Pseudomonas* i *Acinetobacter*, były wrażliwe na stężenia > 20,0 mg/ml.

Podsumowując, należy podkreślić, że szczepy Gram-dodatnich bakterii mikroaerofilnych i tlenowych okazały się bardziej wrażliwe na preparat (MIC \leq 5,0-10,0 mg/ml) niż szczepy Gram-ujemnych bakterii (MIC 10,0- \geq 20,0 mg/ml). Zwraca też uwagę fakt, że Aromatol był bardziej aktywny wobec bakterii mikroaerofilnych (MIC dla 84% szczepów wrażliwych – \leq 5,0-10,0 mg/ml) niż bakterii tlenowych (MIC = 10,0 mg/ml, 3% szczepów wrażliwych). Ponadto wyniki wcześniejszych badań wskazują, że bakterie beztlenowe charakteryzują się wyższą wrażliwością na Aromatol (MIC \leq 2,5-10,0 mg/ml – wrażliwych 90% szczepów) niż obecnie testowane bakterie mikroaerofilne (MIC \leq 5,0-20,0 mg/ml, wrażliwych 84% szczepów) oraz bakterie tlenowe (MIC = 10,0 mg/ml, wrażliwych 3% szczepów) (33). Warto też zaznaczyć, że preparat w stężeniach 2-10-krotnie niższych od stężenia użytkowego hamował wzrost 1/3 ocenianych szczepów bakterii.

Wnioski

1. Największą aktywność Aromatol wykazał wobec bakterii mikroaerofilnych z gatunków *Campylobacter rectus* i *Rothia dentocariosa* oraz bakterii tlenowych z gatunku *Streptococcus sanguinis*.
2. Niższą wrażliwością charakteryzowały się szczepy Gram-ujemnych pałeczek tlenowych.
3. Preparat okazał się bardziej aktywny wobec ocenianych szczepów Gram-dodatnich bakterii, zarówno mikroaerofilnych, jak i tlenowych.
4. 1/3 badanych szczepów bakterii było wrażliwych na Aromatol w stężeniach 2-10-krotnie niższych od stężeń użytkowych preparatu.

Piśmiennictwo

1. Melnic JL, Hu C, Burek J i wsp. Cytomegalovirus DNA in arteria walls of patients with atherosclerosis. J Med Virol 1994; 42:170-4.
2. Kaplan M, Yavuz SS, Cinar J i wsp. Determinative of *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* in atherosclerotic plaques of carotid artery by polymerase chain reaction. Int Infect Dis 2006; 10(2):116-23.
3. Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blaukenburg S i wsp. Are morphological of function changes in the carotid artery wall associated with *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, Cytomegalovirus or Herpes simplex virus infection. Stroke 2008; 31:2127-33.
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(2):4408-11.
5. Kaklikaya I, Kaklikaya N, Burak K i wsp. Investigation of *Chlamydia pneumoniae* DNA, chlamydial lipopolisaccharide antigens and *Helicobacter pylori* DNA in atherosclerotic plaque with aortoiliac occlusive disease. Cardiovasc Pathol 2006; 15(2):105-9.
6. Loehe F, Brittmann I, Weillbach C i wsp. *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of patients undergoing vascular surgery. Ann Vasc Surg 2002; 16:467-73.
7. Kędzia A, Ciecierski M, Wierzbowska M i wsp. Isolation of *Helicobacter pylori* from femoral or iliac atherosclerotic plaques. Acta Angiol 2010; 16(3):129-34.
8. Zaremba M, Górska R, Suwałski D. Ocena występowania bakterii związanych z chorobą przyzębia w blaszce miażdżycowej naczyń wieńcowych. Czas Stomatol 2005; 58(2):293-311.
9. Zhang T, Kurita-Ochiai T, Hashizume T i wsp. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* atherosclerosis with an increase in atherogenic factor spontaneously hyperlipidemic mice. Immunol Med Microbiol 2010; 59:143-51.
10. Li X, Kolltveit KM, Trondstad L i wsp. Systemic diseases caused by oral infection. Clin Microbiol Rev 2000; 13(4):547-8.
11. Zaremba M, Górska R, Suwałski P i wsp. Evaluation of the incidence of periodontitis-associated bacteria in atherosclerotic plaque of coronary blood vessel. J Periodontol 2007; 78(2):322-7.
12. Taylor-Robinson D, Aduse-Opoku J, Sayed P i wsp. Oro-dental bacteria in various atherosclerotic arteries. Eur J Clin Microbiol Inf Dis 2002; 21:755-7.
13. Rath SK, Mukherjee M, Kaushik R i wsp. Periodontal pathogens in atheromatous plaque. Ind J Pathol Microbiol 2014; 57(2):259-64.
14. Kozarov EV, Dorn BR, Shelburne CE i wsp. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. Atheroscler Thromb Vasc Biol 2005; 25:27-8.
15. Van Buskirk JJ, Kirsch WM, Kleyer DL i wsp. Aminomalonic acid identification in *Escherichia coli* and atherosclerotic plaque. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81(3):722-5.
16. Schenkein HA, Barbour SE, Berry CR i wsp. Invasion of human vascular endothelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* via the receptor for platelet activation factor. Infect Immunol 2000; 68:3416-9.
17. Korean O, Spor A, Felin J i wsp. Human oral, gut and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108 (suppl. 1):4592-8.
18. Desai JA, Husain SF, Islam O i wsp. Carotid artery stent infection with *Streptococcus agalactiae*. Neurology 2010; 74:344-9.
19. Casalta JP, Fournier PE, Habib G i wsp. Prosthetic valve endocarditis caused by *Pseudomonas luteola*. BMC Infect Dis 2001; 5:82.
20. Padilla EC, Lobos GO, Jure OG i wsp. Isolation of periodontal bacteria from blood samples and atheromas in patients with atherosclerosis and periodontitis. Rev Med Clin 2007; 135(9):118-24.
21. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J Appl Microbiol 1999; 89(6):985-90.
22. Chao S, Young G, Oberg C i wsp. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. Flavour Fragr J 2008; 23:444-9.
23. Ulnu M, Ergene E, Unlu GV i wsp. Composition antimicrobial activity and *in vivo* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). Food Chem Toxicol 2010; 48:3274-89.
24. Continho HDM, Costu JGM, Lima EO i wsp. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chloropromazine. Chemother 2008; 54:328-30.
25. Prebussenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Compl Altern Med 2006; 6:39-46.
26. Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Badanie wpływu olejków eterycznych na bakterie, grzyby i dermatofity chorobotwórcze dla człowieka. Post Fitoter 2007; (2):71-7.
27. Nair R, Chanda SV. Antibacterial activities of some medicinal plants of the Western Region of India. Turk J Biol 2007; 31:231-6.
28. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem 2003; 10:813-29.
29. Rosi L, Gastaldi G. Chronic salmonellosis and cinnamon. Pediatrics 2005; 116:1057-8.
30. Kędzia A, Ziółkowska-Klinkosz M, Kusiak A i wsp. Działanie *in vitro* olejku cymentonowego (*Oleum Cinnamomi*) na grzyby drożdżopodobne. Post Fitoter 2015; (1):17-20.
31. Crociani F, Biavati B, Alessandrini A i wsp. Growth inhibition of essential oils and other antimicrobial agents towards *Bifidobacterium* from dental caries. 27th Int Symp Essential Oils. Vienna Sept 8-11 1996; 40-4.
32. Morris JA, Khettry A, Seitz EW. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. J Am Oil Chem Sci 1979; 56:565-603.
33. Kędzia A, Kusiak A, Kocharńska B i wsp. Aktywność preparatu Aro-

- matol wobec bakterii beztlenowych. *Post Fitoter* 2015; (4):8-13.
- 34.** Katiyar A, Sing D, Mishra BN. Essential oil: production for health care in current scenario. *Ann Biol Res* 2010; 1(3):200-9.
- 35.** Fabio A, Cermelli C, Fabio G i wsp. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. *Phytother Res* 2007; 21:374-7. **36.** Saeed S, Tariq P. *In vitro* antibacterial activity of clove against Gram-negative bacteria. *Pak J Bot* 2008; 40(5):2157-60. **37.** Ayoola GA, Lawore FM, Adelwotan T i wsp. Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* (clove). *Afric J Microbiol Res* 2008; 2:162-6. **38.** Kędzia A, Kusiak A, Kochańska B i wsp. Wrażliwość bakterii tlenowych na olejek goździkowy (*Oleum Caryophylli*). *Post Fitoter* 2011; (3):164-8. **39.** Franz C, Baser KHC, Windisch W. Essential oils and aromatic plants in animal feeding – a European perspective. A review. *Flavour Fragr J* 2010; 25:327-40.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 10.11.2015

zaakceptowano/accepted: 12.01.2016

Adres/address:

*prof. dr hab. Anna Kędzia
ul. Małachowskiego 5/5,
80-262 Gdańsk Wrzeszcz
e-mail: anak@gumed.edu.pl