

УДК 579.842.11:615.28:615.831:615.27

М. М. Попов¹, С. Г. Маланчук¹, Н. І. Філімонова², М. М. Мішина³,
А. М. Коробов¹, М. О. Ляпунов⁴¹ Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна² Національний фармацевтичний університет³ Харківський національний медичний університет⁴ Лабораторія технології та аналізу лікарських препаратів ДНУ «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» НАН України»

КОМПЛЕКСНА ДІЯ СВІТЛОДІОДНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ТА АНТИСЕПТИКІВ, ЩО МІСТЯТЬ ДИНАТРІЮ ЕДЕТАТ, НА ДОБОВІ БІОПЛІВКИ *E. coli*

Проведено вивчення дії антисептичних препаратів, що містять динатрію едетат, комплексно з оптичним випромінюванням помаранчевого, зеленого та фіолетового спектрів на ізоляти *E. coli*. Встановлено, що під впливом світлодіодного випромінювання помаранчевого спектра на *E. coli* спостерігається тенденція до активації стадії проліферації планктонних клітин біоплівками, зелений спектр світлодіодного випромінювання суттєво не впливає на продукцію планктонних клітин *E. coli*. Під впливом фіолетового спектра світлодіодного випромінювання пригнічується здатність до біоплівкоутворення та продукції планктонних клітин. Всі спектри світлодіодного випромінювання, що вивчалися, сприяли посиленню чутливості ізолятів *E. coli* до дії катіонних антисептиків, що містять динатрію едетат, шляхом активації фотофізичних та фотохімічних реакцій.

Ключові слова: антисептики; динатрію едетат; біоплівки; *E. coli*

ВСТУП

Широке використання антибактеріальних засобів призвело до значного поширення нозокоміальних інфекцій та полірезистентних штамів бактерій. Останнім часом багатьма авторами відзначається зростання локалізованих гнійно-запальних процесів, викликаних грамнегативними бактеріями, і значну роль має *E. coli*. Проблема боротьби з гнійно-запальними захворюваннями ускладнюється тим, що антимікробні препарати швидко втрачають ефективність, зумовлену насамперед формуванням збудників біоплівок [1, 4]. На сучасному етапі пошук нових антисептичних препаратів, здатні проникати або руйнувати захисну біоплівку мікроорганізмів [5, 13], або розробка методів підвищення ефективності терапії локалізованих гнійно-запальних процесів є необхідним. Величезна соціально-економічна значимість проблеми вимагає подальшого вдосконалення наявних методів терапії гнійно-запальних процесів. Для успішного вирішення цих проблем необхідний комплексний підхід з раціональним вибором антисептичних препаратів та оптимізацією застосування методів фізіо-

терапії. У теперішній час інтенсивно розвивається нова технологія – фотодинамічна терапія [2, 3].

В останні роки вдалося значно просунути в розумінні первинних механізмів, що лежать в основі дії світлодіодного випромінювання на біологічні об'єкти. Низькоінтенсивне електромагнітне випромінювання знаходить широке застосування практично у всіх областях медицини. Відомо, що при дії світлодіодного випромінювання метаболічні та функціональні властивості ряду біологічних систем можуть бути істотно змінені. На думку ряду дослідників прямий спосіб впливу світлодіодного випромінювання передбачає безпосередній вплив на елементи клітинних структур, причому доведено, що найбільш чутливими до впливу оптичного випромінювання є мембранні структури клітини [11, 12]. Фізико-хімічні основи взаємодії світлодіодного випромінювання з біооб'єктами, які дуже складні і до кінця не вивчені. У зв'язку з цим вивчення механізму впливу світлодіодного випромінювання на мікроорганізми як біологічний об'єкт є досить актуальним.

Тому метою даного дослідження було вивчення дії антисептичних препаратів, що містять динатрію едетат, комплексно із застосуванням оптичного ви-

© Колектив авторів, 2014

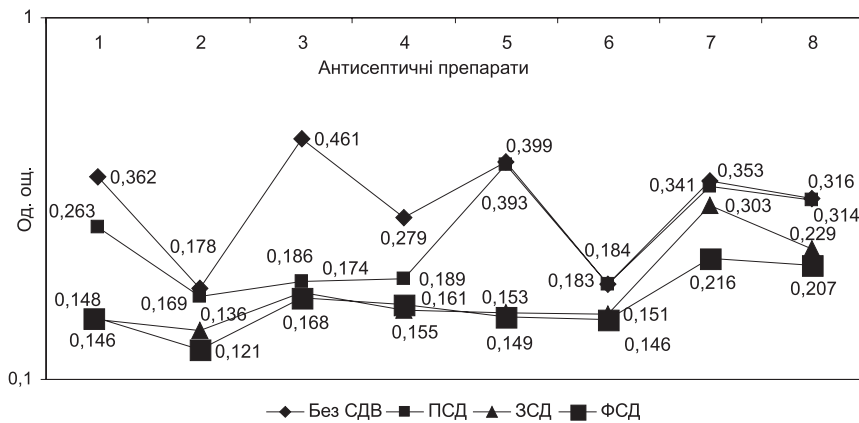


Рис. 1. Дія антисептичних препаратів і оптичного випромінювання на добові біоплівки *E. coli*.

Примітка: СДВ – світлодіодне випромінювання; ПСД – помаранчевий спектр світлодіодного випромінювання; ЗСД – зелений спектр світлодіодного випромінювання; ФСД – фіолетовий спектр світлодіодного випромінювання).

проміювання помаранчевого, зеленого та фіолетового спектрів на добові біоплівки ізолятів *E. coli*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Предметом дослідження були антисептичні препарати: 1 – 0,01 % розчин декаметоксину; 2 – 0,01 % розчин декаметоксину, що містить 0,02% динатрію едетату; 3 – 0,01 % розчин мірамістину; 4 – 0,01 % розчин мірамістину, що містить 0,02% динатрію едетату; 5 – 0,01 % розчин бензалконію хлориду; 6 – 0,01 % розчин бензалконію хлориду, що містить 0,02 % динатрію едетату; 7 – 0,01 % розчин цетилпіридинію хлориду; 8 – 0,01 % розчин цетилпіридинію хлориду, що містить 0,02 % динатрію едетату; 9 – 0,02 % розчин динатрію едетату та ізоляти *E. coli*, вилучені з венфлонів і дренажних конструкцій ($n = 10$) та від хворих з локалізованими гнійно-запальними процесами ($n = 10$) та референтний штаб *E. coli* ATCC 25922. Приготування суспензій ізолятів [9] із визначеною концентрацією мікробних клітин проводилося за допомогою електронного приладу Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema a.s., Чехія) за шкалою McFarland згідно з інструкцією до приладу з наступним вимірюванням оптичної щільності біоплівки *E. coli* на поверхні полістиролового планшета після інкубації інокуляту впродовж 24 годин; після інкубації до добових біоплівок *E. coli* додавали дослідні антисептичні препарати та поживне середовище і після добової інкубації при $t = 37$ °C за порівнянням оптичної щільності дослідних та контрольних сформованих біоплівок робили висновок про ступінь руйнування біоплівок. Планктонні клітини, вилучені з добових біоплівок, інокулювали у комірки планшета, додавали суспензійне поживне середовище і термостатували у вологій камері протягом доби. Далі оцінювали ступінь агрегації мікробних клітин. Кількісним вираженням ступеня формування біоплівки і здатності до агрегації планктонних клітин є значення оптичної щільності на спектрофотометрі «Multiskan EX 355» при 540 нм. Результат визначався в умовних одиницях

оптичної щільності (од. оц.) біоплівкоутворення мікроорганізмами [10]. Опромінення *in vitro* проводилось світлодіодними джерелами помаранчевого (590-600 нм), зеленого (490-570 нм) і фіолетового (380-430 нм) випромінювання фотонної матриці апарата Коробова «Барва-Флекс» [6], що містить світлодіодну матрицю з суперлюмінісцентними світлодіодами (24 шт.) і блок живлення.

Для статистичної обробки результатів використовували програму Excel для персонального комп'ютера і Biostat [7, 8].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведеного дослідження встановлено, що після дії світлодіодного випромінювання помаранчевого спектра спостерігається тенденція до підвищення щільності біоплівки *E. coli* ($1,81 \pm 0,23$ од. оц.), а після дії оптичного випромінювання зеленого спектра – тенденція до пригнічення формування біоплівки *E. coli* ($1,18 \pm 0,15$ од. оц.) порівняно з контролем ($1,473 \pm 0,08$ од. оц.). Щільність добової біоплівки *E. coli* після дії світлодіодного випромінювання фіолетового спектра знижується у 1,9 рази порівняно з контролем ($0,785 \pm 0,09$ од. оц. і $1,473 \pm 0,08$ од. оц. відповідно).

При комплексному застосуванні антисептичних препаратів, що містять динатрію едетат, і низькоінтенсивного оптичного випромінювання фіолетового, зеленого і помаранчевого спектрів привертає увагу той факт, що світлодіодне випромінювання спектрів, що були досліджені, сприяє посиленню чутливості ізолятів *E. coli* до катіонних антисептиків: під впливом світлодіодного випромінювання помаранчевого спектра та розчину мірамістину щільність добової біоплівки знижується у 2,5 рази, а під впливом світлодіодного випромінювання фіолетового спектра та антисептиків щільність добової біоплівки знижується у 2,5-2,7 рази (рис. 1).

Оцінюючи здатність до проліферації нових планктонних клітин добовою біоплівкою *E. coli* після дії

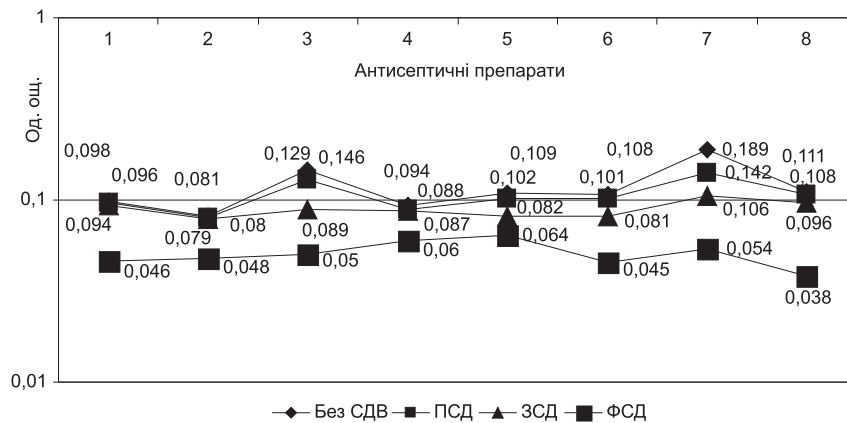


Рис. 2. Здатність добувих біоплівки *E. coli* після дії дослідних препаратів і оптичного випромінювання продукувати планктонні клітини з наступним формуванням вторинних біоплівки.

світлодіодного випромінювання встановлено, що світлодіодне випромінювання помаранчевого спектра має тенденцію до посилення продукції нових клітин *E. coli* ($0,832 \pm 0,06$ од. ош.) порівняно з контролем ($0,707 \pm 0,04$ од. ош.), оптичне випромінювання зеленого спектра достовірно не впливає на проліферацію нових клітин ($0,702 \pm 0,06$ од. ош.), а світлодіодне випромінювання фіолетового спектра пригнічує продукцію планктонних клітин добовою біоплівкою *E. coli* у 2,7 рази ($0,259 \pm 0,02$ од. ош.).

Дослідження щодо комплексного застосування світлодіодного випромінювання та антисептиків, що містять динатрію едетат, дозволило визначити, що тільки світлодіодне випромінювання фіолетового спектра пригнічує проліферацію планктонних клітин *E. coli* добовою біоплівкою (рис. 2).

Результати дослідження здатності до формування планктонними клітинами *E. coli* вторинних біоплівки після дії світлодіодного випромінювання на добову біоплівку показали, що світлодіодне випромінювання фіолетового спектра пригнічує здатність планктонних клітин *E. coli* формувати щільні вторинні біоплівки у 4,9 рази порівняно з контролем ($0,683 \pm 0,04$ од. ош. і $3,378 \pm 0,09$ од. ош. відповідно). Після застосування антисептиків та світлодіодного ви-

промінювання встановлено, що найефективнішими комбінаціями є комплексне застосування декаметоксину, що містить динатрію едетат, ($0,036 \pm 0,006$ од. ош.), мірамістину, що містить динатрію едетат ($0,036 \pm 0,008$ од. ош.), і цетилпіридинію хлорид ($0,042 \pm 0,004$ од. ош.) та світлодіодного випромінювання фіолетового спектра дії порівняно з контролем (щільність вторинної біоплівки *E. coli* без впливу СДВ і антисептичних препаратів – $3,378 \pm 0,61$ од. ош.) з пригніченням формування вторинної біоплівки планктонними клітинами *E. coli*. При застосуванні бензалконію хлорид, що містить динатрію едетат, і світлодіодного випромінювання фіолетового спектра дії відбувається пригнічення формування вторинної біоплівки *E. coli* у 25,2 рази порівняно з контролем ($0,134 \pm 0,008$ од. ош. і $3,378 \pm 0,61$ од. ош. відповідно).

Отже, встановлено, що під впливом світлодіодного випромінювання помаранчевого спектра на добову біоплівку ізолятів *E. coli* спостерігається тенденція до підвищення щільності біоплівки *E. coli* та активація проліферації планктонних клітин біоплівками ізолятів *E. coli*, зелений спектр світлодіодного випромінювання суттєво не впливає на продукцію нових клітин *E. coli*, але спостерігається тенденція до пригнічення формування добової біоплівки *E. coli*.

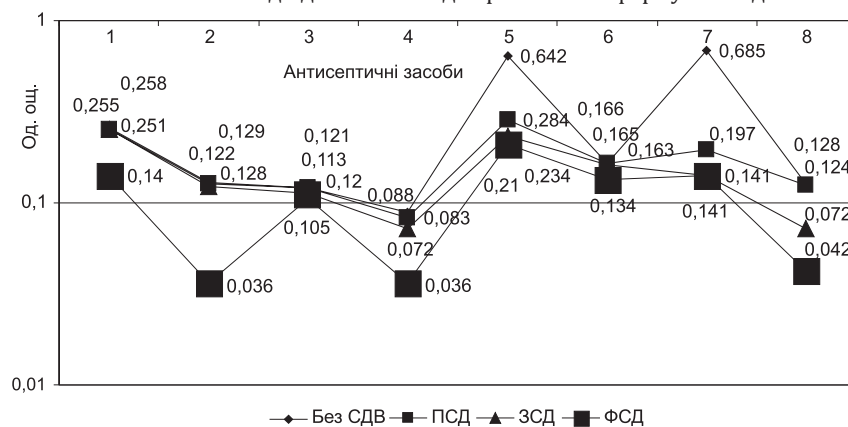


Рис. 3. Формування вторинних біоплівки планктонними клітинами *E. coli* після дії дослідних препаратів і оптичного випромінювання на добову біоплівку.

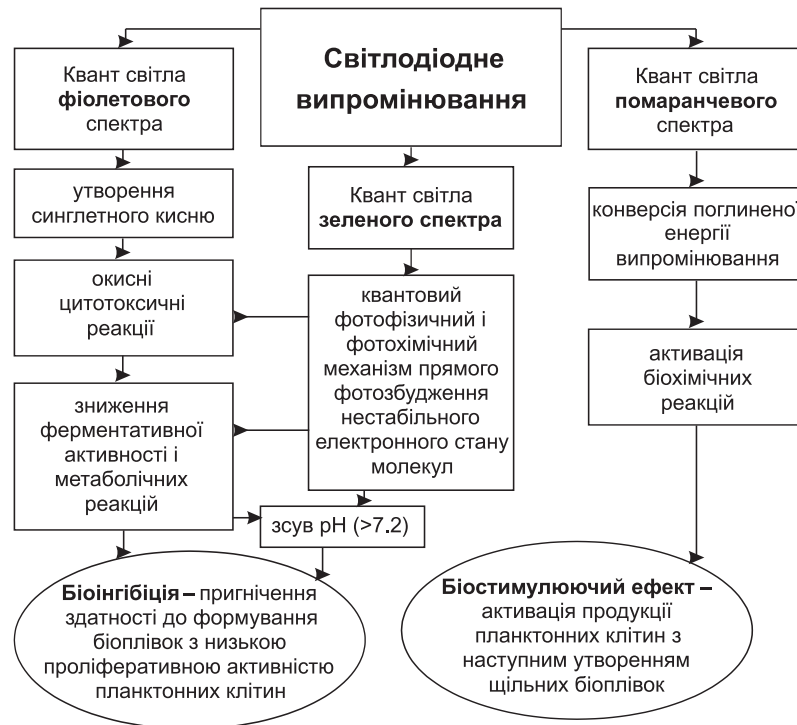


Рис. 4. Основна схема біологічного механізму дії світлодіодного випромінювання фіолетового, зеленого і помаранчевого спектрів на добові біоплівки *E. coli*.

Під впливом фіолетового спектра світлодіодного випромінювання пригнічується здатність до біоплівкоутворення та продукції планктонних клітин *E. coli* шляхом активації фотофізичних та фотохімічних реакцій [12] (рис. 4).

ВИСНОВКИ

Таким чином, дослідження показали, що світлодіодне випромінювання помаранчевого, зеленого і фіолетового спектрів сприяють посиленню чутливості ізолятів *E. coli* до катіонних антисептиків, що містять динатрію едетат, шляхом активації фотофізичних та фотохімічних реакцій. Комплексне застосування світлодіодного випромінювання фіолетового спектра та антисептиків, що містять динатрію едетат, пригнічує продукцію планктонних клітин *E. coli* добовою біоплівкою та запобігає утворенню щільних біоплівки *E. coli*.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Анфиногорова А. Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А. Г. Анфиногорова, Е. Н. Даровская // Травматол. и ортопедия России. – 2011. – № 3 (61). – С. 119-125.
2. Батраков А. В. Применение светодиодного излучения (470 нм) в комплексном лечении больных фурункулами лица / А. В. Батраков, В. В. Кирьянова, А. В. Васильев: [учеб. пособ.]. – С.Пб.: Человек, 2011. – 32 с.
3. Гинюк В. А. Применение фототерапии в комплексном лечении экспериментальных гнойных ран / [В. А. Гинюк, Г. П. Рычагов, Т. А. Летковская и др.] // Новости хирургии. – 2011. – Т. 19, № 1. – С. 8-15.
4. Доброхотский О. Н. Эпидемиологическое значение биоплёнок в технических системах / О. Н. Доброхотский, Ю. Н. Хомяков, Т. И. Хомякова // Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. – 2008. – № 4. – С. 78-80.
5. Ильина Т. С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т. С. Ильина, Ю. М. Романова, А. Л. Гинцбург // Генетика. – 2004. – № 40 (11). – С. 1-12.
6. Коробов А. М. Новая техника для новейших технологий светотерапии / А. М. Коробов // Матер. юбилейной XX Междунар. науч.-практ. конф. [«Применение лазеров в медицине и биологии»], Ялта, 8-11 октября 2003 г. – Х.: НПМБК «Лазер и здоровье», 2003. – С. 114-117.
7. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К.: МОРИОН, 2000. – 320 с.
8. Методика статистической обработки медицинской информации в научных исследованиях / [В. П. Осипов, Е. М. Лукьянова, Ю. Г. Антипин и др.]. – К.: Планета людей, 2002. – 200 с.

9. Методические указания по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинико-диагностических лабораториях / Приложение I к Приказу Министерства здравоохранения СССР № 535 от 22 апреля 1985 г. – 123 с.
10. Пат. на корисну модель 47944 Україна, МПК G 09 B 23/00. Спосіб відтворення біоплівки мікроорганізмів *in vitro* / А. Я. Циганенко, М. М. Мишина, Р. А. Курбанов (UA); Харк. нац. мед. ун-т. – № u200910353. – Заявл.: 12.10.2009. Опубл.: 25.02.2010. – Бюл. № 4.
11. Тучина Е. С. Оценка фотодинамического воздействия *in vitro* на бактерии из микробоценозов ротовой полости и кожи человека: автореф. дис. ... канд. биол. наук: спец. 03.00.16 – экология; 03.00.07 – микробиология. – Саратов, 2008. – 20 с.
12. Фотобиофизика. [Электронный ресурс] Электронное учебно-метод. пособ. / [И. Е. Суковатая, В. А. Кратасюк, В. В. Межевикин и др.]. – Красноярск: ИПК СФУ, 2008. – 438 с. Режим доступа до посібника: http://files.lib.sfu-kras.ru/ebibl/umkd/141/u_course.pdf.
13. Koseoglu H. Ultrastructural stages of biofilm development of *Escherichia coli* on urethral catheters and effects of antibiotics on biofilm formation / H. Koseoglu // *Urol.* – 2006. – Vol. 68, № 5. – P. 942-946.

УДК 579.842.11:615.28:615.831:615.27

Н. Н. Попов, С. Г. Маланчук, Н. И. Филимонова, М. М. Мишина, А. М. Коробов, Н. А. Ляпунов КОМПЛЕКСНОЕ ДЕЙСТВИЕ СВЕТОДИОДНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И АНТИСЕПТИКОВ, СОДЕРЖАЩИХ ДИНАТРИЯ ЭДЕТАТ, НА СУТОЧНЫЕ БИОПЛЕНКИ *E. coli*

Исучено действие антисептических препаратов, содержащих динатрия эдетат, комплексно с оптическим излучением оранжевого, зеленого и фиолетового спектров на изоляты *E. coli*. Установлено, что под влиянием светодиодного излучения оранжевого спектра на *E. coli* наблюдается тенденция к активации стадии пролиферации планктонных клеток суточной биопленки *E. coli*; зеленый спектр светодиодного излучения существенно не влияет на способность к продукции планктонных клеток *E. coli*. Под влиянием фиолетового спектра светодиодного излучения происходит угнетение продукции планктонных клеток и способности их к образованию биопленок *E. coli*. Установлено, что все спектры светодиодного излучения, которые исследованы, способствовали усилению чувствительности изолятов *E. coli* к действию катионных антисептиков, содержащих динатрия эдетат, путем активации фотофизических и фотохимических реакций.

Ключевые слова: антисептики; динатрия эдетат; биопленки; *E. coli*

UDC 579.842.11:615.28:615.831:615.27

N. N. Popov, S. G. Malanchuk, N. I. Filimonova, M. M. Mishina, A. M. Korobov, N. A. Liapunov INTEGRATED EFFECT OF PHOTODIODE EMISSION AND ANTISEPTIC DRUGS WITH DISODIUM EDETATE ON THE DAILY BIOFILMS OF *E. coli*

The goal of the research is study of action of antiseptic drugs containing disodium edetate along with optical emission of orange, green and violet spectra on isolates of *E. coli*. The research which has been carried out shows that under the influence of photodiode emission of the orange spectra on *E. coli* tendency to activation of stage of proliferation of plankton cells of the daily biofilm is observed; the green spectrum of photodiode emission has no significant influence on ability to form primary as well as secondary biofilms. The violet spectrum of photodiode emission suppresses production of plankton cells ant their ability to form the biofilms of *E. coli*. It has been established that all studied spectra of photodiode emission are able to activate cationic chlorine-containing antiseptic drugs with disodium edetate due to activation of photochemical reactions.

Key words: antiseptics; disodium edetate; biofilms; *E. coli*

Адреса для листування:

61000, м. Харків, вул. Залеська 3А, кв.94.

Тел. +380 50 9539500

E-mail: sve-malanchuk@yandex.ru

Надійшла до редакції 30.05.2014 р.