

УДК: 579.861.2:579.842.11:615.281:615.831:615.015.8:579.262.

ОЦІНКА ВПЛИВУ ОПТИЧНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ Й АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ЗДАТНІСТЬ ДО ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК *S.AUREUS* ТА *E.COLI*

М.М. Попов¹, С.Г. Маланчук¹, М.М. Мішина², А.М. Коробов³

¹Кафедра загальної і клінічної імунології та алергології
Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна,
майдан Свободи, 4, Харків, 61022 Україна,
тел.: +38(057)707-51-91, e-mail: sve-malanchuk@yandex.ru

²Кафедра мікробіології, вірусології та імунології ХНМУ,
Проспект Леніна, 4, Харків, 61022 Україна

³НД лабораторія квантової біології та квантової медицини
Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна,
майдан Свободи, 4, Харків, 61022 Україна

*Проведено мікробіологічну оцінку впливу світлодіодного випромінювання фіолетового, зеленого й помаранчевого спектрів та антибактеріальних препаратів на суспензійну культуру *S.aureus* й *E.coli* та на здатність до формування щільних біоплівки. Проведені дослідження показали, що комплексне застосування низькоінтенсивного некогерентного оптичного випромінювання фіолетового спектру з антимікробними препаратами фторхінолонового ряду (левофлоксацином), сприяє пригніченню проліферативної активності й здатності до формування біоплівки полірезистентних ізолятів *S.aureus* та *E.coli*.*

Ключові слова: антибактеріальні препарати, світлодіодне випромінювання, біоплівки, *S.aureus*, *E.coli*.

Вступ. В останні роки в структурі гнійно-запальних захворювань безперервно зростає частка процесів, що викликаються полірезистентними мікроорганізмами. Провідними фахівцями України проведені дослідження щодо визначенні етіологічної ролі *S.aureus* й *E.coli* у структурі гнійно-запальних процесів й встановлено, що у 51% випадків висівався *S. aureus*, а в 31% - *E. coli* серед усіх ізолятів. Серед ізолятів *S.aureus* й *E.coli* виділяються штами, що характеризуються стійкістю до основних груп сучасних антибіотиків. Частота вилучення полірезистентних *S.aureus* досягає майже 50% залежно від особливостей стаціонару, тактики вибору і частоти використання антибактеріальних засобів. Це пов'язано, насамперед, зі здатністю формувати щільні біоплівки.

Тому **метою** даного дослідження було вивчення дії антибактеріальних препаратів, що широко використовуються у практичній медицині комплексно з оптичним випромінюванням помаранчевого, зеленого та фіолетового спектрів на ізоляти *S.aureus* й *E.coli*.

Об'єктом дослідження були антибактеріальні препарати: амоксицилін, левофлоксацин й цеф-

триаксон та ізоляти *S.aureus* й *E.coli*, що вилучені з венфлонів й дренажних конструкцій та від хворих з гнійно-запальними процесами.

Ферментативну ідентифікацію проводили за допомогою ідентифікаційних наборів МІКРО-ЛАТЕСТ® (рис. 1), які призначені для проведення стандартної ідентифікації з використанням мікрометодів і дозволяють проводити ідентифікацію більшості клінічно важливих мікроорганізмів у короткий термін.

Утлівість ізолятів до антимікробних засобів з різним механізмом дії на мікробну клітину вивчали за допомогою мікротестсистеми з напівкількісною реєстрацією результатів «ТНКтестГр».

Синхронізація періодичної культури шляхом селекції (метод Мітчисона і Вінсента). Синхронізація періодичних культур досліджуваних штамів проводилася після встановлення кінетики росту асинхронної культури. Встановлювався режим періодичного культивування таким чином, щоб протягом експоненціального росту клітинна маса подвоювалася від двох до п'яти разів.

Приготування суспензій ізолятів [5] із визна-

ченою концентрацією мікробних клітин проводилося за допомогою електронного приладу Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema a.s., Чехія) за шкалою McFarland згідно з інструкцією до приладу та додавали дослідні антибактеріальні препарати та поживне середовище

Вимірювання оптичної щільності біоплівки *S.aureus* й *E.coli* проводили після добової інкубації при $t=37^{\circ}\text{C}$ та за порівнянням оптичної щільності дослідних та контрольних сформованих біоплівок робили висновок про ступінь формування біоплівок. Планктонні клітини, що були вилучені з добових біоплівок, інокулювали у комірки планшету, додавали суспензійне поживне середовище й термостатували у вологій камері протягом доби. Далі оцінювали ступінь агрегації мікробних клітин. Кількісним вираженням ступеня формування біоплівки й 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.ощ.) біоплівкоутворення мікроорганізмами [6].

Опромінення *in vitro* проводилось фотонними матрицями Коробова «Барва-Флекс», які містять 24 над'яскравих світлодіодів, що випромінюють світло помаранчевого, зеленого або фіолетового діапазонів спектра та розташовані еквідистантно на площі 60 см² (рис.2). Максимуми смуг випромінювання світлодіодів мають наступні довжини хвиль: 610 нм - помаранчевих, 525 нм - зелених, 405 нм - фіолетових. Ширини смуг випромінювання на рівні половинної інтенсивності складають 25-30 нм. Сумарна потужність випромінювання 24 світлодіодів складає 120 мВт, щільність потужності випромінювання на поверхні планшетів - 2 мВт/см², щільність дози випромінювання, що отримували дослідні мікроорганізми складала 1,2 Дж/см². Час опромінення становив 10 хвилин, відстань між світлодіодами та планшетом дорівнювала 10 см.

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

Результати дослідження та їх обговорення. Аналіз здобутих результатів показав, що при за-

стосуванні низькоінтенсивного некогерентного випромінювання помаранчевого спектру разом з β -лактамами антимікробними препаратами спостерігається тенденція до проліферації ізолятів *S.aureus* у 1,5 рази порівняно з контролем (амоксиклав - $0,824\pm 0,06$ од.ощ. та $0,539\pm 0,04$ од.ощ.; цефтриаксон - $0,831\pm 0,05$ од.ощ. та $0,554\pm 0,03$ од.ощ.) та *E.coli* у 1,6 рази (амоксиклав - $0,976\pm 0,08$ од.ощ. та $0,624\pm 0,08$ од.ощ.; цефтриаксон - $0,988\pm 0,07$ од.ощ. та $0,628\pm 0,07$ од.ощ.). При комплексному застосуванні препарату з групи фторхінолонів левофлоксацину й світлодіодного випромінювання помаранчевого спектру встановлено пригнічення здатності до проліферації клітин як *S.aureus* (левофлоксацин - $0,378\pm 0,02$ од.ощ. та $0,542\pm 0,06$ од.ощ.), так й *E.coli* у 1,4 рази (левофлоксацин - $0,458\pm 0,06$ од.ощ. та $0,632\pm 0,05$ од.ощ. відповідно) порівняно з контролем (рис. 3).

В результаті проведеного дослідження щодо визначення впливу низькоінтенсивного некогерентного випромінювання зеленого спектру



Рис. 1. Ідентифікаційні набори МІКРО-ЛА-ТЕСТ®

разом з β -лактамами антимікробними препаратами спостерігається тенденція до пригнічення проліферації ізолятів як *S.aureus* (амоксиклав - $0,481\pm 0,03$ од.ощ. та $0,539\pm 0,04$ од.ощ.; цефтриаксон - $0,476\pm 0,05$ од.ощ. та $0,554\pm 0,03$ од.ощ.), так й *E.coli* (амоксиклав - $0,54\pm 0,03$ од.ощ. та $0,624\pm 0,08$ од.ощ.; цефтриаксон - $0,61\pm 0,04$ од.ощ. та $0,628\pm 0,07$ од.ощ.) порівняно з контролем. А при комплексному застосуванні левофлоксацину й світлодіодного випромінювання зеленого спектру встановлено пригнічення здат-



Рис. 2. Фотонна матриця Коробова «Барва-Флекс» з світлодіодами помаранчевого, зеленого та фіолетового спектрів

ності до проліферації клітин *S.aureus* у 2,4 рази (левофлоксацин - $0,224 \pm 0,02$ од.ощ. та $0,542 \pm 0,06$ од.ощ.), й *E.coli* у 2,9 рази (левофлоксацин - $0,215 \pm 0,03$ од.ощ. та $0,632 \pm 0,05$ од.ощ. відповідно) порівняно з контролем.

Застосування протимікробних препаратів й світлодіодного випромінювання фіолетового спектру призвело до пригнічення проліферації планктонних клітин *S.aureus*: у 5,3 рази при застосуванні амокциклаву ($0,101 \pm 0,02$ од.ощ. та $0,539 \pm 0,04$ од.ощ.) й цефтриаксону ($0,104 \pm 0,05$ од.ощ. та $0,554 \pm 0,03$ од.ощ.) та у 10 разів в комплексі з левофлоксацином ($0,054 \pm 0,005$ од.ощ. та $0,542 \pm 0,06$ од.ощ. відповідно). Аналогічні результати здобуті при дослідженні протимікробних препаратів й світлодіодного випромінювання

вофлоксацином ($0,068 \pm 0,008$ од.ощ. та $0,632 \pm 0,05$ од.ощ. відповідно) порівняно з контролем.

Аналізуючи результати щодо здатності формування біоплівки планктонними клітинами після комплексної дії низькоінтенсивного некогерентного оптичного випромінювання й антимікробних препаратів на суспензійні культури полірезистентних ізолятів *E.coli* та *S.aureus* встановлено, що тільки світлодіодне випромінювання фіолетового спектру здатне значно посилювати протимікробну дію антибактеріальних препаратів, що запобігає формуванню щільних біоплівок ізолятами. Слід відмітити той факт, що застосування оптичного випромінювання й препарату левофлоксацину знижує здатність до формування щільних біоплівок *S.aureus* у 18 разів ($0,126 \pm 0,03$ од.ощ.

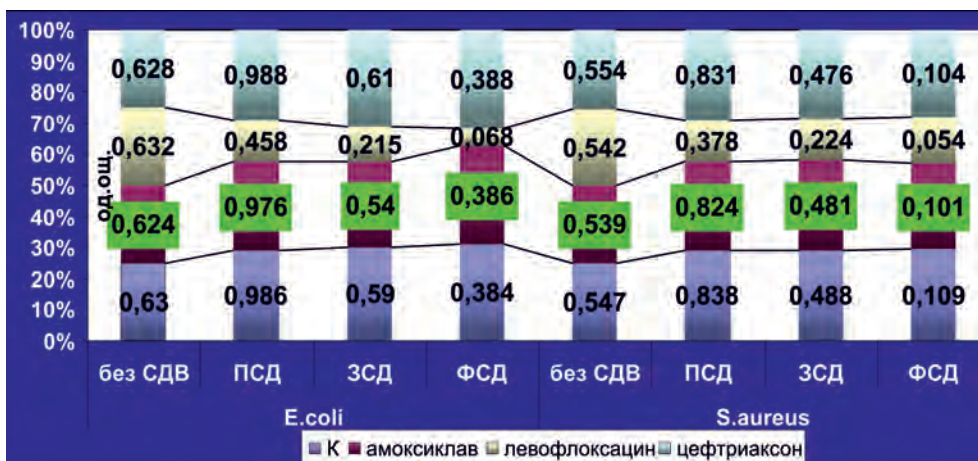


Рис. 3. Дія антибактеріальних препаратів й оптичного випромінювання на суспензійну культуру полі резистентних ізолятів *S.aureus* й *E.coli*.

фіолетового спектру на полірезистентні ізоляти *E.coli*: у 1,6 рази при застосуванні амокциклаву ($0,386 \pm 0,03$ од.ощ. та $0,624 \pm 0,08$ од.ощ.) та цефтриаксону ($0,388 \pm 0,06$ од.ощ. та $0,628 \pm 0,07$ од.ощ. відповідно) та у 9,3 рази в комплексі з ле-

вофлоксацином ($0,126 \pm 0,03$ од.ощ. й $2,31 \pm 0,09$ од.ощ. відповідно) та *E.coli* у 7,4 рази ($0,198 \pm 0,04$ од.ощ. й $1,472 \pm 0,08$ од.ощ. відповідно), це можна пояснити тим, що антимікробні препарати з групи фторхінолонів відносяться до фотосенсибілізаторів – катіонів [5] згідно з сучасною

класифікацією фотосенсибілізаторів й власне бактерицидною дією низькоінтенсивного некогерентного оптичного випромінювання фіолетового спектру, а при застосуванні β-лактамних антимікробних препаратів спостерігається тенденція

до пригнічення формування біоплівки ізолятами *S.aureus*: у 5,2 рази в комплексі з амоксициклавом - $0,448 \pm 0,07$ од.ощ. та $2,35 \pm 0,09$ од.ощ.); у 4,9 рази при застосуванні цефтриаксону - $0,451 \pm 0,06$ од.ощ. та $2,24 \pm 0,08$ од.ощ.) та ізолятами *E.coli* у 1,9 рази в комплексі з амоксициклавом ($0,762 \pm 0,06$ од.ощ. та $1,469 \pm 0,07$ од.ощ.) та цефтриаксоном ($0,779 \pm 0,09$ од.ощ. та $1,475 \pm 0,09$ од.ощ.) порівняно з контролем (рис.4).

Висновки. Таким чином, в результаті даного дослідження обґрунтовано можливість застосування у комплексній терапії гнійно-запальних процесів низькоінтенсивного некогерентного оптичного випромінювання фіолетового спектру з антимікробними препаратами фторхінолонового ряду (левофлоксацином), які є фотосенсибілізаторами й це сприяє пригніченню проліферативної активності й здатності до формування біоплівок полірезистентних ізолятів *S.aureus* та *E.coli* й підвищенню їх антибіотико чутливості.

Перспективи подальших досліджень в даному напрямку є вивчення впливу протимікробних за-

собів й світлодіодного випромінювання на добові біоплівки ізолятів *S.aureus* й *E.coli*.

Роботу виконано в рамках планової теми наукових досліджень: кафедри загальної і клінічної імунології та алергології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна: «Вивчення ролі імунних, аутоімунних та метаболічних розладів у патогенезі та наслідках інфекційного процесу», № державної реєстрації 0112U005911 та Харківського національного медичного університету: «Вплив фізико-біологічних факторів

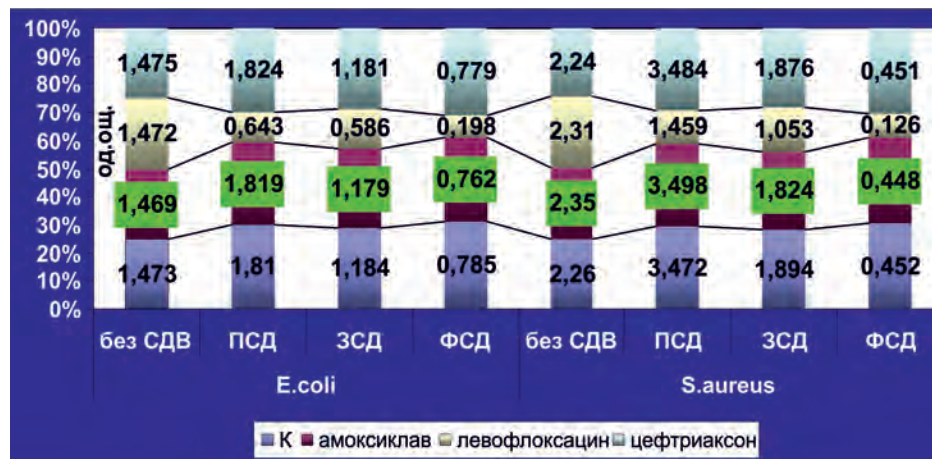


Рис.4. Формування біоплівок *S.aureus* й *E.coli* після дії дослідних препаратів й оптичного випромінювання на суспензійну культуру полірезистентних ізолятів.

на комунікативні властивості мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних процесів» (№ держреєстрації: 0112U001822), що фінансується за рахунок Держбюджету МОЗ України.

Литература

1. 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. - Том 19, №1. – С.8-15.
2. Земляная О.В. Об использовании света на различных этапах восстановительного лечения/ О.В.Земляная, И.В.Кас//Материалы XXVII Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии», Ялта, 12-16 октября 2004 г. – Харьков: НПМБК «Лазер и здоровье», 2007. – С.18-19.
3. 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.
4. Коробов А.М. Фототерапевтические аппараты Коробова серии «Барва»/А.М.Коробов, В.А.Коробов, Т.А.Лесная. – Харьков.: ИПП «Контраст», 2008. – 176 с.
5. Курочкина А.Ю. Классификации фотосенсибилизаторов антимикробной фотодинамической терапии / А.Ю.Курочкина, В.Ю.Плавский, Н.А.Юдина //Бело-

- руская медицинская академия последипломного образования Институт физики НАН Беларуси [Электронный ресурс]: режим доступа до журналу <http://www.bsmu.by>.
6. 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.
7. Мавров И.И. Биопленки и Quorum sensing у микроорганизмов. Биопленки и проблема эффективности антибактериальной терапии /И.И. Мавров, В.Н. Васильченко, А.П. Белозеров //Дерматология та венерология. – 2007. - № 4(38). – С. 19-22.
8. Методика статистической обработки медицинской информации в научных исследованиях /В.П.Осипов, Е.М.Лукьянова, Ю.Г.Антипкин [и др.] – К.: Планета людей, 2002. – 200с.
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 1985г. -123с.

10. Павлов А.В. Изменчивость биологических свойств золотистого стафилококка под влиянием оптического излучения [Текст]: дис. ... канд. биол. наук: 16.00.03 /Павлов Александр Валерьевич. - Новосибирск, 2005. – 168 с.

11. Пат. на корисну модель 47944 Україна, МПК G09B23/00. Спосіб відтворення біоплівки мікроорганізмів in vitro /А.Я.Циганенко, М.М.Мишина, Р.А. Чурбанов (UA);Харк. націон. мед. ун-т. – № U200910353; Заявл.12.10.2009; Опубл. 25.02.2010, Бюл. № 4.

12. Фадеев С.Б. Формирование биопленок возбудителями хирургической инфекции мягких тка-

ней / Фадеев С.Б., Немцева Н.В. //Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. – 2009. - №4. - С. 114 - 117.

13. Фотобиофизика. [Электронный ресурс] Электронное учебно – методическое пособие /И.Е. Суковатая, В.А. Кратасюк, В.В. Межевикин [и др.]. – Красноярск: ИПК СФУ, 2008. – 438 с.

14. Stewart P.S. Antibiotic tolerance in biofilms and its role in persistent infections/ P.S. Stewart //In: 11th International congress on infectious diseases. Cancun, Mexico. - 2004. Abstr. № 56.002.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА СПОСОБНОСТЬ К ФОРМИРОВАНИЮ БИОПЛЕНОК S.AUREUS И E.COLI

Н.Н. Попов, А.М. Коробов, С.Г. Маланчук, М.М. Мишина

Проведена микробиологическая оценка влияния светодиодного излучения фиолетового, зеленого и оранжевого спектров и антибактериальных препаратов на суспензионную культуру S.aureus и E.coli и на способность к формированию биопленок. Проведенные исследования показали, что комплексное применение низкоинтенсивного некогерентного оптического излучения фиолетового спектра с антимикробными препаратами фторхинолонового ряда (левофлоксацином), способствует подавлению продукции планктонных клеток и способности к формированию биопленок полирезистентными изолятами S.aureus и E.coli.

Ключевые слова: антибактериальные препараты, светодиодное излучение, биопленки, S.aureus, E.coli.

ASSESSMENT OF THE IMPACT OF OPTICAL EMISSION AND ANTIBACTERIAL AGENTS ON ABILITY TO FORM THE BIOFILMS OF S.AUREUS AND E.COLI

N.N. Popov, A.M. Korobov, S.G. Malanchuk, M.M. Mishina

A microbiological impact assessment of diode radiation purple, green and orange spectrums and antibacterial drugs in suspension culture of S.aureus and E.coli and the ability to form dense biofilms are performed. Studies have shown that complex application of low incoherent optical radiation of violet spectrum with antimicrobial drugs fluoroquinolones series (levofloxacin), promotes inhibition of proliferative activity and ability to form biofilms in multiresistant isolates of S.aureus and E.coli.

Key words: antibiotics, LED radiation, biofilms, S.aureus, E.coli