

ОБҐРУНТУВАННЯ АНТИМІКРОБНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ АПЛІКАЦІЙНИХ БІОНАНОКОМПЗИТІВ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ОПІКОВОЇ ІНФЕКЦІЇ, СПРИЧИНЕНОЇ S. AUREUS ТА P. AERUGINOSA

Г. М. Чернякова¹, В. В. Мінухін¹, Є. П. Воронін³, Д. В. Мінухін², А. Г. Краснояружський², Д. С. Єфімов¹, К. В. Пономарьова²

¹Харківський національний медичний університет,

²Інститут загальної і невідкладної хірургії імені В. Т. Зайцева НАМН України,

³Інститут хімії поверхні імені О. О. Чуйка НАН України, м. Харків

SUBSTANTIATION FOR ANTIMICROBIAL EFFICACY OF APPLICATIONAL BIONANOCOMPOSITS IN THE TREATMENT OF THE BURN INFECTION, CAUSED BY S. AUREUS AND P. AERUGINOSA

G. M. Chernyakova¹, V. V. Minukhin¹, E. P. Voronin³, D. V. Minukhin², A. G. Krasnoyaruzhskiy², D. S. Efimov¹, K. V. Ponomaryova²

¹Kharkiv National Medical University,

²Zaytsev Institute of General and Urgent Surgery,

³Chuyko Institute of Chemistry of Surface, Kharkiv

Реферат

Вивчено антимікробну активність експериментальних протимікробних нанокомпозитів щодо музейних і клінічних штамів *S. aureus* та *P. aeruginosa* методом серійних розведень в бульйоні та щільному поживному середовищі. Всі клінічні штами *S. aureus* виявилися чутливими до композитів з левофлоксацином та резистентними до сумішей з сульфаметоксазолом; щодо штамів *P. aeruginosa*, 90% клінічних ізолятів були чутливими до сумішей з левофлоксацином, 65% – з сульфаметоксазолом.

Ключові слова: опікова інфекція; клінічні штами збудників; антимікробна активність; резистентність.

Abstract

Antimicrobial activity of experimental antimicrobial nanocomposites, concerning the museum and clinical strains of *S. aureus* and *P. aeruginosa*, using the batch dilution method in bouillon and thick nutritive environment, was studied. All clinical strains of *S. aureus* have appeared sensitive to composites with levofloxacin and resistant to mixtures with sulfametoxazol; and as for strains of *P. aeruginosa*, 90% clinical isolates were sensitive towards mixtures with levofloxacin, and 65% – with sulfametoxazol.

Keywords: the burn infection; clinical strains of causative agents; antimicrobial activity; resistance.

Питання виникнення, профілактики та лікування опікової ранової інфекції є важливою проблемою сучасної медицини. Резистентність мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів ускладнює вирішення цього завдання. Незважаючи на досягнуті успіхи, летальність потерпілих за глибоких поширених опіків, інфікованих госпітальними штамми мікроорганізмів, досягає 40–70% [1].

Синьогнійна паличка та золотистий стафілокок є одними з основних аерофільних збудників ранової опікової інфекції [2]. Вірулентність і патогенність цих мікроорганізмів зумовлюють тривалий і тяжкий перебіг гнійного процесу в опіковій рані, а виникнення мультирезистентності до антибіоти-

ків зумовлює додаткові ускладнення [3]. При етіотропній терапії опікової ранової інфекції велику увагу приділяють місцевим методам лікування, вони передбачають використання препаратів, що мають протизапальну, антимікробну, детоксикаційну та регенеруючу дію. У зв'язку з цим, актуальним є пошук і експериментальне обґрунтування використання нових високоефективних засобів місцевого лікування опікових ран та інфекційних ускладнень [4].

В останні роки інтенсивно розвивався новий підхід до лікування ран – вульнеросорбція. Метод передбачає видалення ексудату, мікроорганізмів та їх токсинів з рани за допомогою сорбційних матеріалів. За даними літератури, перспективною є розробка комплексного препарату

– аплікаційного сорбенту, здатного не тільки видаляти ексудат і рідину з опікової рани, а й такого, що мав би протимікробні властивості, пригнічуючи процеси запалення та активізуючи регенерацію ушкоджених тканин у рані [5].

Мета дослідження: проаналізувати антимікробну активність нових біонанокомпозитів на основі нанорозмірного кремнезему з іммобілізованими на його поверхні антибактеріальними сполуками щодо клінічних штамів *S. aureus* та *P. aeruginosa*.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У потерпілих з опіками, яких лікували у Харківській міській клінічній лікарні швидкої та невідкладної медичної допомоги ім. проф.

Таблиця 1. **Склад досліджуваних нанокомпозитів**

№	Компоненти	Склад					
		г	% до SiO ₂	г	% до SiO ₂	г	% до SiO ₂
1	Нанокремнезем	1	-	1	-	1	-
	Сульфаметоксазол	0,05	5	0,1	10	0,15	15
	Хлорофіліпт	0,01	1	0,01	1	0,01	1
	(2% розчини в олії)	(0,5)	(50)	(0,5)	(50)	(0,5)	(50)
	Нітрат срібла	0,01	1	0,01	1	0,01	1
	Хітозан	0,06	6	0,06	6	0,06	6
2	Нанокремнезем	1	-	1	-	1	-
	Левофлоксацин	0,0005	0,05	0,001	0,1	0,005	0,5
	Хлорофіліпт	0,01	1	0,01	1	0,01	1
	(2% розчин в олії)	(0,5)	(50)	(0,5)	(50)	(0,5)	(50)
	Нітрат срібла	0,01	1	0,01	1	0,01	1
	Хітозан	0,06	6	0,06	6	0,06	6

О. І. Мещанінова та клініці Інституту загальної та невідкладної хірургії імені В. Т. Зайцева НАМН України, для дослідження забирали виділення з ран, а також кров. Бактеріологічні дослідження проведені відповідно до Наказу МОЗ України № 167 від 05.04.2007 р. [6, 7]. Для визначення антибіотикочутливості штамів використані набори дисків з 12 антибактеріальними препаратами: пеніцилін, оксацилін, еритроміцин, левофлоксацин, ципрофлоксацин, ванкоміцин, гентаміцин, лінкоміцин, амікацин, цефтазидим, цефепім, меропенем, іміпенем (виробництва ТОВ «Аспект», Київ). Антибактеріальну активність протимікробних сумішей визначали методом серійних розведень в бульйоні (щодо музейних штамів *S. aureus* ATCC 29213 та *P. aeruginosa* ATCC 27853) та щільному поживному середовищі (щодо 40 клінічних штамів *S. aureus* та 20 – *P. aeruginosa*) [6, 8].

Таблиця 2. **Діаметр зон затримки росту досліджуваних референс-штамів, мм**

Препарат	Вміст препарату в диску, мкг	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)
Бензилпеніцилін	6 (10 ОД)	28 (S)	-
Оксацилін	1	22 (S)	-
Еритроміцин	15	27 (S)	-
Левофлоксацин	5	26 (S)	21 (S)
Ципрофлоксацин	5	25 (S)	28 (S)
Ванкоміцин	30	18 (S)	-
Гентаміцин	10	22 (S)	18 (S)
Амікацин	30	23 (S)	20 (S)
Цефтазидим	30	18 (S)	24 (S)
Цефепім	30	25 (S)	28 (S)
Меропенем	10	31 (S)	32 (S)
Іміпенем	10	-	25 (S)

Примітка. (S) – чутливі.

В експерименті використані 6 зразків композитів, виготовлених у лабораторії модифікування поверхні оксидів Інституту хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України. Всі вони містили однакову кількість високо-

дисперсного нанокремнезему, хлорофіліпту, кукурудзяної олії, нітрату срібла та хітозану. У 3 нанокомпозитах додатково містилося відповідно 5%, 10% і 15% сульфаметоксазолу, у 3 – 0,05%, 0,1% і 0,5% левофлоксацину

Таблиця 3. **Антибіотикочутливість клінічних штамів *S. aureus* та *P. aeruginosa*, %**

Препарат	Вміст препарату в диску, мкг	<i>S. aureus</i> (n = 40)			<i>P. aeruginosa</i> (n = 20)		
		S	M	R	S	M	R
Бензилпеніцилін	6 (10 ОД)	30	-	70	-	-	100
Оксацилін	1	100	-	-	-	-	100
Еритроміцин	15	5	90	5	-	-	100
Левофлоксацин	5	100	-	-	30	-	70
Ципрофлоксацин	5	80	-	20	20	-	80
Ванкоміцин	30	80	-	20	-	-	100
Гентаміцин	10	100	-	-	40	10	50
Амікацин	30	70	20	10	50	10	40
Цефтазидим	30	90	5	5	50	-	50
Цефепім	30	100	-	-	50	-	50
Меропенем	10	70	20	10	30	20	50
Іміпенем	10	80	15	5	-	-	100

Примітка. S - чутливі; M – помірно чутливі, R - стійкі.

Таблиця 4. Результати експериментальної перевірки активності комбінованих протимікробних сумішей з левофлоксацином щодо музейних штамів *S. aureus* (ATCC 29213) та *P. aeruginosa* (ATCC 27853)

№ композиту	Мікроорганізм	МІК, мг/л		МБК, мг/л	
		антибактеріальної суміші	у перерахунку на левофлоксацин	антибактеріальної суміші	у перерахунку на левофлоксацин
1*	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	1500	0,45	6250	1,85
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	6250	1,85	12500	3,7
2*	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	750	0,45	3125	1,85
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	3125	1,85	6250	3,7
3*	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	190	0,5	750	2,25
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	750	2,25	1500	4,5

Примітка. * - вміст левофлоксацину в композиті 1 - 0,05%, 2 - 0,1%, 3 - 0,5%.

Таблиця 5. Результати експериментальної перевірки активності комбінованих протимікробних сумішей з сульфаметоксазолом щодо музейних штамів *S. aureus* (ATCC 29213) та *P. aeruginosa* (ATCC 27853)

№ композиту	Мікроорганізм	МІК, мг/л		МБК, мг/л	
		антибактеріальної суміші	сульфаметоксазолу	антибактеріальної суміші	сульфаметоксазолу
1*	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	25 000	700	50 000	1400
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	12 500	350	25 000	700
2*	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	12 500	700	25 000	1400
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	6 250	350	12 500	700
3*	<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	6 250	600	12 500	1200
	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	3 125	300	6 250	600

Примітка. * вміст сульфаметоксазолу в композиті 1 - 5%, 2 - 10%, 3 - 15%.

(табл. 1). Експериментальна частина роботи виконана на базі кафедри мікробіології, вірусології та імунології Харківського національного медичного університету. Дослідження проводили тричі. Статистична обробка результатів здійснена з використанням стандартних програм обробки даних MS Excel, BioStat LE. Достовірність результатів визначали за критерієм Ст'юдента ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі експерименту диско-дифузійним методом визначали чутливість до антибіотиків референс-штамів *S. aureus* ATCC 25923 та *P. aeruginosa* ATCC 27853 (табл. 2) та клінічних штамів цих мікроорганізмів, виділених у потерпілих з опіками різного ступеня тяжкості (табл. 3).

Клінічні ізоляти *S. aureus* були високо резистентними до пеніциліну – 70%, до ванкомицину та ципрофлоксацину – стійкими 20% штамів. Штами, резистентні до оксациліну, левофлоксацину, гентаміцину та цефепіму, не виявлені. Високорезистентними виявилися госпітальні штами *P. aeruginosa*. До

ципрофлоксацину та левофлоксацину стійкими були відповідно 80 та 70% штамів, до гентаміцину, цефтазидиму, цефепіму та меропенему – 50% виділених штамів. Всі клінічні штами *P. aeruginosa* були нечутливими до іміпенему. Можливо, це пов'язане з широким використанням препарату в останні роки при лікуванні *Pseudomonas*-інфекції.

На другому етапі дослідження визначали мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) та мінімальну бактерицидну концентрацію (МБК) досліджуваних препаратів щодо референс – штамів *S. aureus* та *P. aeruginosa*.

Композити 1 та 2 проявили більш виражену бактерицидну дію щодо музейних штамів *S. aureus* та *P. aeruginosa*, ніж композит 3 (табл. 4, 5). Можливо, різна стійкість грамнегативних і грампозитивних мікроорганізмів до протимікробних сумішей залежить від особливостей будови їх клітин, фізико-хімічних процесів на поверхні високодисперсного нанокремнезему та інших причин, що потребують подальшого вивчення.

Протимікробна активність сумішей з сульфаметоксазолом щодо

музейних штамів виявилася значно меншою ($p < 0,05$), ніж сумішей з левофлоксацином, незважаючи на більший вміст активної речовини. Референс-штам *P. aeruginosa* був чутливим до експериментальних зразків препаратів, а суміш з 15% вмістом сульфаметоксазолу – найбільш ефективною. Щодо штаму *S. aureus*, антибактеріальний ефект був достовірно меншим. Потрібні подальші дослідження цієї суміші, що може бути перспективною щодо лікування ранової інфекції, спричиненої *P. aeruginosa*.

Наступним етапом визначали МІК комбінованих протимікробних сумішей щодо клінічних ізолятів *S. aureus* (n=40) та *P. aeruginosa* (n=20). Концентрація левофлоксацину в складі біонаноконцентрату в чашках Петрі становила від 12 до 0,05 мг/л. Всі штами *S. aureus* були чутливі до цих концентрацій. МІК становила $(0,353 \pm 0,57)$ мг/л. Щодо *P. aeruginosa*, 2 (10%) штами виявилися резистентними, МІК становила $(3,2 \pm 0,44)$ мг/л. Різниця з музейними штамми недостовірна ($p > 0,05$).

Концентрація сульфаметоксазолу в складі біонаноконцентрату в чашках Петрі становила від 1800 до 28

мг/л. За результатами експерименту 28 (70%) штамів *S. aureus* виявилися нечутливими до цих концентрацій. У 30% штамів МІК становила ($450 \pm 70,86$) мг/л (недостовірна різниця з музейними штамми, $p > 0,05$). Щодо *P. aeruginosa*, 65% досліджуваних штамів виявилися чутливими, МІК становила ($761,54 \pm 111,05$) мг/л, що достовірно більше, ніж музейних штамів ($p < 0,05$).

За результатами експериментів доведено, що всі клінічні штами *S. aureus*, що спричинили гнійно-запальні процеси у потерпілих з опіками, були чутливими до левофлоксацину та високо чутливими до протимікробної суміші, що містила цей антибіотик. Чутливими до ле-

вофлоксацину були лише 30% штамів *P. aeruginosa*, при використанні левофлоксацину у складі біонанокомпозиту чутливість клінічних ізолятів збільшилася до 90%.

Можна припустити, що підвищенню антибактеріальної активності левофлоксацину сприяли компоненти, що входять до складу суміші. Незважаючи на невисоку антибактеріальну активність суміші з сульфаметоксазолом щодо клінічних штамів *S. aureus*, її ефективність щодо госпітальних штамів *P. aeruginosa* свідчить про перспективність застосування у хворих при рановій *Pseudomonas* – інфекції в умовах стаціонару.

Підхід, оснований на наданні сорбентам специфічних властивостей шляхом іммобілізації на їх поверхні різних лігандів і лікарських субстанцій, є перспективним. Він дозволяє зменшувати або навіть усувати негативний вплив на організм цих субстанцій. З використанням такого підходу досить швидко, на основі вже існуючих препаратів, можна створювати профілактичні й лікувальні комплексні препарати з більшою ефективністю.

Перспективи подальших досліджень: вивчення ранозагоювальних властивостей сумішей на моделі опікової ранової інфекції *in vivo*.

REFERENCES

1. Peck MD. Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. *Burns*. 2011;37(7):1087–100.
2. Hussien IA, Habib KA, Jassim KA. Bacterial Colonization of Burn Wounds. *J Baghdad for Sci*. 2012;9(4):623–31.
3. Church D, Elsayed S, Reid O, et al. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev*. 2006;2(19):403–34.
4. Alekseev AA, Bobrovnikov AE, Krutikov MG. Mestnoe ispolzovanie antimikrobnnykh sredstv dlya lecheniya ozhogovykh ran. Available from: <http://combustiolog.ru/journal/mestnoe-ispol-zovanie-antimikrobnnyh-sredstv-dlya-lecheniya-ozhogovyh-ran/>. [In Russian].
5. Korobko VM, Vorobeva OA, Melnikova NB. Analiz komponentov protivoozhogovogo poroshka naruzhnogo primeneniya s 5-nitrofuralom i tsitokhromom. *International journal of applied and fundamental research*. 2015;9:322–8. [In Russian].
6. Nakaz MOZ Ukrainy № 167 vid 05.04.2007r. Pro zatverdzhennia metodychnykh vkazivok «Vyznachennia chutlyvosti mikroorganizmiv do antybakterialnykh preparativ». Kyiv. 2007. 52 s. [In Ukrainian].
7. Khoult D, editor. *Opredelitel bakteriy Berdzhii*. 9 izdanie. Moskva: Mir; 1997. 800 s. [In Russian].
8. Volyanskiy YuL. *Biologicheskaya kharakteristika i mikrobiologicheskaya identifikatsiya nefermentiruyushchikh gramotritsatel'nykh bakteriy*. Uchebnoe posobie. Kharkov. 2010. 47 s. [In Russian].