

## ДІЯ АНТИСЕПТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ З ДИНАТРІЄМ ЕДЕТАТОМ НА ДОБОВІ БІОПЛІВКИ Й НА ЗДАТНІСТЬ ДО ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК *S. AUREUS*

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна (м. Харків)

\* Харківський національний медичний університет (м. Харків)

\*\*ДНУ НТК «ІМК» НАН України, відділ 8 оптично активних сполук (м. Харків)

Представлену 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.

**Вступ.** Багатьма дослідниками доведено, що гнійно-запальні процеси все частіше обумовлюються грампозитивною мікрофлорою. У останні роки значно зросла роль *S. aureus* в етіології гнійно-септичних процесів при травмах, захворюваннях сечових шляхів, опіках, променевих ураженнях. Джерелом поширення гійно-запальних процесів, спричинених *S. aureus* є тяжкохворі зі зниженою реактивністю, які тривалий час знаходяться на стаціонарному лікуванні та одержують великі дози антибіотиків.

Відомо, що основна перешкода ефективному лікуванню інфекційних захворювань є стійкість мікроорганізмів до лікарських препаратів: множинна лікарська стійкість опосередкована взаємодією мікробів усередині їх спілки і стійкість, що пов'язана з відсутністю реакцій бактерій на сигнал до загибелі з боку макроорганізму: персистенція мікроорганізмів, що обумовлена створенням біоплівок [1, 2].

Ефективність дії різних антимікробних засобів на мікроорганізми в першу чергу залежить від їх здатності впливати на цілісність клітинної стінки і проникати всередину клітини. Крім природної стійкості бактерій до антисептичних препаратів, мікроорганізми швидко адаптуються до несприятливих факторів, в тому числі й до впливу антимікробних засобів. Описані випадки розмноження потенційно патогенних мікроорганізмів у розчинах, призначених для дезінфекції, адаптації до терапевтичних доз антибіотиків і полірезистентності до антимікробних засобів. Внаслідок нераціонального або некваліфікованого використання протимікробних засобів число резистентних штамів постійно зростає, а полірезистентні збудники гнійно-запальних процесів мають тенденцію до поширення в зовнішньому середовищі [3, 4].

Широке поширення гнійно-запальних процесів, в тому числі й спричинених *S. aureus*, тенденція до їх зростання визначає актуальність і надає даній

проблемі соціального значення, вирішення даної проблеми неможливе без розробки й впровадження ефективних засобів лікування.

Тому **метою** даного **дослідження** було вивчення дії хлорвміщуючих антисептиків (катіонів), що широко використовуються у практичній медицині у поєднанні з стабілізатором-аніоном динатрієм едетатом на суспензійну культуру *S. aureus* та на сформовані біоплівки й на здатність планктонних клітин мікроорганізмів до вторинного формування біоплівок.

**Об'єкт і методи дослідження.** Об'єктом дослідження були антисептичні препарати: 1 – 0,01% розчин декаметоксину; 2 – 0,01% розчин декаметоксину з 0,02% динатрієм едетатом; 3 – 0,01% розчин мирамістину; 4 – 0,01% розчин мирамістину з 0,02% динатрієм едетатом; 5 – 0,01% розчин бензалконію хлориду; 6 – 0,01% розчин бензалконію хлориду з 0,02% динатрієм едетатом; 7 – 0,01% розчин цетилпиридинію хлориду; 8 – 0,01% розчин цетилпиридинію хлориду з 0,02% динатрієм едетатом; 9 – 0,02% динатрію едетату. Приготування суспензій *Staphylococcus aureus* ATCC 25923=NCDC 25923=F-49 [5] 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. Вимірювання оптичної щільності біоплівки, утвореної дослідними мікроорганізмами, на поверхні полістиролового планшета після інкубації інокуляту в продовж 24 годин, після інкубації до добових біоплівок *S. aureus* додавали дослідні антисептичні препарати та поживне середовище й після добової інкубації при  $t=37^{\circ}\text{C}$  за порівнянням оптичної щільності дослідних та контрольних сформованих біоплівок робили висновок про ступінь руйнування біоплівок. Планктонні клітини, що були вилучені з добових біоплівок, інокулювали у комірки планшета, 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 визначається в умовних одиницях оптичної щільності (од. оц.)

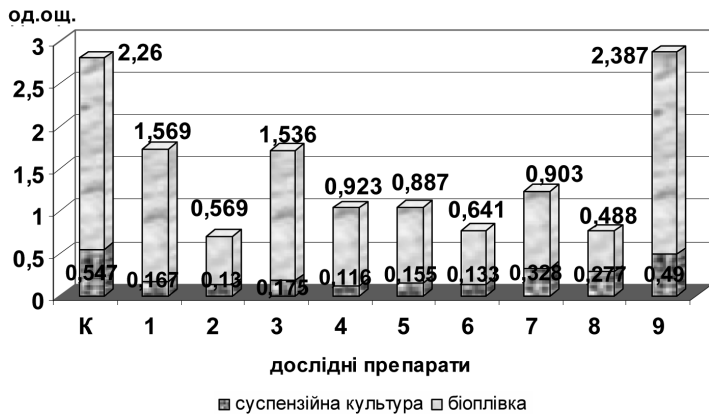


Рис. 1. Дія антисептиків з 0,02% динатрієм едетатом на суспензійну культуру *S. aureus* й здатність до формування біоплівки.



Рис. 2. Здатність добових біоплівок *S. aureus*, що утворилися після дії дослідних препаратів, продукувати планктонні клітини з наступним формуванням вторинних біоплівок.

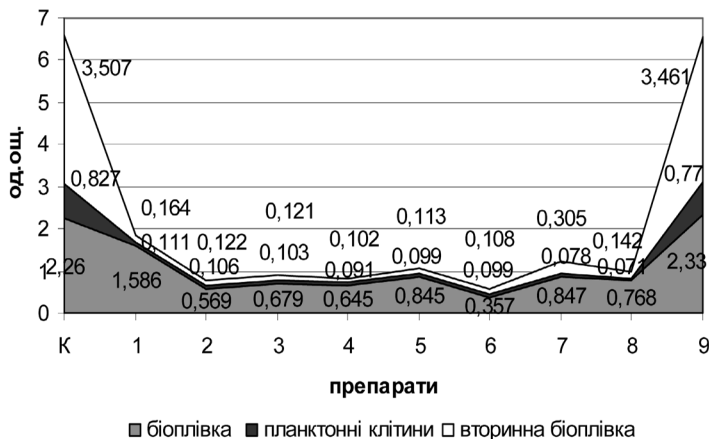


Рис. 3. Дія дослідних антисептиків з 0,02% динатрієм едетатом на добову біоплівку *S. aureus* й здатність планктонних клітин формувати вторинну біоплівку.

біоплівкоутворення мікроорганізмами [6]. Для статистичної обробки результатів використовували програму Excel для персонального комп'ютера й Biostat [7, 8].

**Результати досліджень та їх обговорення.** У результаті проведення дослідження дії антисептиків, що містять динатрію едетат на суспензійну культуру *S. aureus* було встановлено (рис. 1), що після інокуляції дослідних розчинів антисептиків та інкубації протягом доби при  $t=37^{\circ}\text{C}$  у вологій камері спостерігається тенденція до зниження оптичної щільності добової

біоплівки порівняно з оптичною щільністю біоплівки *S. aureus* без дослідних препаратів ( $2,26 \pm 0,28$  од. ош.), а щільність добових біоплівок при використанні антисептиків, що містять 0,02% динатрію едетату була нижче за контрольні значення антисептиків без динатрію едетату: 0,01% розчин декаметоксину – у 2,75 рази ( $0,569 \pm 0,03$  й  $1,569 \pm 0,26$  од. ош. відповідно); 0,01% розчин мирамістину – у 1,7 рази ( $0,923 \pm 0,06$  й  $1,536 \pm 0,31$  од. ош. відповідно); 0,01% розчин бензалконію хлориду – у 1,4 рази ( $0,887 \pm 0,04$  й  $0,923 \pm 0,06$  од. ош. відповідно); 0,01% розчин цетилпиридинію хлориду – у 1,9 рази ( $0,488 \pm 0,03$  й  $0,903 \pm 0,07$  од. ош. відповідно).

При визначенні здатності добових біоплівок *S. aureus*, що утворилися після дії дослідних препаратів, продукувати планктонні клітини з наступним формуванням вторинних біоплівок було встановлено (рис. 2), що щільність сформованих нових біоплівок знижувалась порівняно з контролем ( $3,507 \pm 0,16$  од. ош.): при дії розчину декаметоксину з 0,02% динатрієм едетатом у 13,9 рази ( $0,253 \pm 0,02$  од. ош.); 0,01% розчину мирамістину з 0,02% динатрієм едетатом у 3,1 рази ( $1,147 \pm 0,15$  од. ош.); 0,01% розчину бензалконію хлориду з 0,02% динатрієм едетатом у 15,2 рази ( $0,231 \pm 0,02$  од. ош.); розчину цетилпиридинію хлориду з 0,02% динатрієм едетатом у 9,6 рази ( $0,366 \pm 0,04$  од. ош.).

Аналізуючи результати щодо дії дослідних антисептиків з 0,02% динатрієм едетатом на добову біоплівку *S. aureus* й здатність планктонних клітин формувати вторинну біоплівку (рис. 3) можна констатувати той факт, що відбувається руйнування первинної біоплівки (контрольне значення –  $2,26 \pm 0,24$  од. ош.): при дії розчину декаметоксину з 0,02% динатрієм едетатом у 4 рази ( $0,569 \pm 0,06$  од. ош.); 0,01% розчину мирамістину з 0,02% динатрієм едетатом у 3,5 рази ( $0,645 \pm 0,05$  од. ош.); 0,01% розчину бензалконію хлориду з 0,02% динатрієм едетатом у 6,3 рази ( $0,357 \pm 0,04$  од. ош.); розчину цетилпиридинію хлориду з 0,02% динатрієм едетатом у 2,9 рази ( $0,768 \pm 0,08$  од. ош.) та пригнічення здатності планктонними клітинами формувати вторинні біоплівки (контрольне значення –  $3,507 \pm 0,42$  од. ош.): при дії розчину декаметоксину з 0,02% динатрієм едетатом у 28,7 рази ( $0,122 \pm 0,01$  од. ош.); 0,01% розчину мирамістину з 0,02% динатрієм едетатом у 34,4 рази ( $0,102 \pm 0,02$  од. ош.); 0,01% розчину бензалконію хлориду з 0,02% динатрієм едетатом у 32,5 рази ( $0,108 \pm 0,04$  од. ош.);

розчину цетилпиридинію хлориду з 0,02% динатрієм едетатом у 24,7 рази ( $0,142 \pm 0,02$  од. ош.)

**Висновки.** Таким чином, проведені дослідження дозволили встановити, що для попередження утворення біоплівки *S. aureus*, а також для інгібіції сформованих біоплівок *S. aureus* доречно застосовувати антисептики з 0,02% динатрієм едетатом, які пригнічують продукцію планктонних клітин й руйнують добову біоплівку *S. aureus*, зокрема 0,01% розчин мирамістину з 0,02% динатрієм едетатом; 0,01% розчин бензалконію хлориду з 0,02% динатрієм едетатом й 0,01% розчин цетилпиридинію хлориду з 0,02% динатрієм едетатом, що пов'язано з одного боку механізмом дії самих антисептиків, а саме: в основі їх дії лежить пряма гідрофобна взаємодія молекули з ліпідами мембран мікроорганізмів, що призводить до їх фрагментації й руйнування, причому частина молекули препаратів, занурюючись у гідрофобну ділянку мембрани, руйнує надмембранний шар й підвищує проникну здатність мембрани для високомолекулярних речовин, змінює ферментну активність мікробної клітини, інгібує ферментні

системи, що призводить до пригнічення життєдіяльності мікроорганізмів і їх цитолізу, а з другого боку – при хімічній взаємодії хлорвмісних антисептиків (катионів), що досліджувалися з динатрієм едетатом (аніоном) утворюється еквівалентна кількість іонів водню. Концентрація іонів водню в довкіллі діє на організм або безпосередньо, або опосередковано, через вплив на іонний стан і доступність багатьох іонів і метаболітів й на стабільність макромолекул. Якщо концентрація водневих іонів з розчину виходить за нормальні межі для даного виду мікроба, його життєдіяльність припиняється. Отже, застосування антисептиків з динатрієм едетатом запобігає утворенню щільних біоплівок *S. aureus* й сприяє руйнуванню сформованих біоплівок.

**Перспективи подальших досліджень** в даному напрямку є вивчення впливу протимікробних засобів з динатрієм едетатом на активність фагоцитозу з визначенням здатності формування нейтрофільних позаклітинних пасток та розробкою схем комплексної терапії.

## Література

- 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.
- 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.
- Олескин А. В. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов / А. В. Олескин, И. В. Ботвинко, Е. А. Цавкелова // Соросовский образовательный журнал. – 2003. – Т. 2, № 7. – С. 24-32.
- Фадеев С. Б. Формирование биопленок возбудителями хирургической инфекции мягких тканей / Фадеев С. Б., Немцева Н. В. // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. – 2009. – № 4. – С. 114 – 117.
- 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.
- Пат. на корисну модель 47944 Україна, МПК G09B23/00. Спосіб відтворення біоплівок мікроорганізмів in vitro / А. Я. Циганенко, М. М. Мішина, Р. А. Курбанов (UA); Харк. націон. мед. ун-т. – № u200910353; Заявл. 12.10.2009; Опубл. 25.02.2010, Бюл. № 4.
- 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.
- Методика статистической обработки медицинской информации в научных исследованиях / В. П. Осипов, Е. М. Лукьянова, Ю. Г. Антипкин [и др.]. – К.: Планета людей, 2002. – 200 с.

УДК 579.861.2:579.262:615.28

### ДІЯ АНТИСЕПТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ З ДИНАТРІЄМ ЕДЕТАТОМ НА ДОБОВІ БІОПЛІВКИ Й НА ЗДАТНІСТЬ ДО ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК *S. AUREUS*

Попов М. М., Маланчук С. Г., Мішина М. М., Ляпунов М. О.

**Резюме.** Проведено мікробіологічне дослідження дії антисептичних препаратів, що містять 0,02% динатрію едетату, на добові біоплівки і на суспензійну культуру *S. aureus* для визначення здатності до утворення біоплівок. Проведені дослідження показали, що антисептики, що містять динатрій едетат здатні руйнувати сформовані біоплівки і пригнічувати здатність *S. aureus* до утворення щільних вторинних біоплівок.

**Ключові слова:** антисептики, динатрій едетат, біоплівки, *S. aureus*.

УДК 579.861.2:579.262:615.28

### ДЕЙСТВИЕ АНТИСЕПТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ С ДИНАТРИЕМ ЭДЕТАТОМ НА СУТОЧНЫЕ БИОПЛЕНКИ И НА СПОСОБНОСТЬ К ФОРМИРОВАНИЮ БИОПЛЕНОК *S. AUREUS*

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

**Резюме.** Проведено микробиологическое исследование действия антисептических препаратов, содержащих 0,02% динатрия эдетата, на суточные биопленки и на суспензионную культуру *S. aureus* для определения способности к образованию биопленок. Проведенные исследования показали, что антисептики,

содержащие динатрий эдетат способны разрушать сформированные биопленки и подавлять способность *S. aureus* к образованию плотных вторичных биопленок.

**Ключевые слова:** антисептики, динатрий эдетат, биопленки, *S. aureus*.

**UDC** 579. 861. 2:579. 262:615. 28

### **Action of Antiseptics with Disodium Edetate on Daily Biofilm and Ability to Form Biofilms in *S. Aureus***

**Popov N. N., Malanciuc S. G., Mishyna M. M., Lyapunov N. A.**

**Abstract.** Wide distribution of inflammatory processes, including caused by *S. aureus*, their tendency to increase determines the relevance of this problem and provides a social value. It is impossible to solve this problem without the development and implementation of effective treatment.

Therefore, this research is devoted to studying of chlorinated antiseptics (cations) action that are widely used in medical practice in combination with anion stabilizer disodium edetate on *S. aureus* suspension culture, formed biofilm and planktonic cells ability to form the secondary biofilms.

**Materials and methods.** The subject of the study were antiseptic preparations: 0.01 % solution of decametoxin; 0.01 % solution of myramistinum; 0.01 % solution of benzalkonium chloride; 0.01 % solution cetylpyridine chloride with 0.02 % disodium edetate. Suspensions of microorganisms (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 = NCDC 25923 = F-49) were prepared with a defined concentration of microbial cells using an electronic device Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema a. s., Czech Republic) in McFarland scale according to the instructions of application. The optical density of the formed biofilms on the surface of polystyrene plate after incubation for 24 hours was measured. After incubation to daily *S. aureus* biofilms research antiseptics and nutritional medium were added and mixture was incubated at 37°C. By comparing the optical density of research and formed control biofilms a conclusion about the level of biofilms destruction was made. Plankton cells from the daily biofilms were inoculated into plate cell together with suspension nutritional medium and incubated in a moist chamber for 24 hours. Then the degree of microbial cells aggregation was assessed. A quantitative expression of the degree of biofilm formation and planktonic cells aggregative ability is the value of the optical density on a spectrophotometer «Multiskan EX 355» at 540 nm. The result was determined in units of optical density of biofilm formation in microorganisms. For statistical analysis of the results Exel software for PC and Biostat were used.

**Results and discussion.** During the study of action of antiseptics containing disodium edetate on *S. aureus* suspension culture it was found that after inoculation of research antiseptic solutions and incubation overnight at 37°C in a moist chamber the optical density of the daily biofilm compared with the optical density *S. aureus* biofilms without experimental drugs tends to decrease ( $2,26 \pm 0,28$  units of optical density) The density of daily biofilms with antiseptics containing 0.02 % disodium edetate was lower than control values of antiseptics without disodium edetate: 0.01 % solution of decametoxin in 2.75 times ( $0,569 \pm 0,03$  and  $1,569 \pm 0,26$  units of optical density respectively); 0.01 % solution of myramistinum in 1.7 times ( $0,923 \pm 0,06$  and  $1,536 \pm 0,31$  units of optical density respectively); 0.01 % solution of benzalkonium chloride in 1.4 times ( $0,887 \pm 0,04$  and  $0,923 \pm 0,06$  units of optical density respectively); 0.01 % solution of cetylpyridine chloride in 1.9 times ( $0,488 \pm 0,03$  and  $0,903 \pm 0,07$  units of optical density respectively).

Study of the ability of *S. aureus* daily biofilms, formed after exposure to experimental drugs to produce planktonic cells with subsequent formation of secondary biofilms found that the density of the formed new biofilms decreased in comparison to controls ( $3,507 \pm 0,16$  units of optical density): when exposed to a solution of decametoxin with 0.02 % disodium edetate at 13.9 times ( $0,253 \pm 0,02$  units of optical density); under 0.01 % solution of myramistinum with 0.02 % disodium edetate in 3.1 times ( $1,147 \pm 0,15$  units of optical density); under 0.01 % solution of benzalkonium chloride with 0.02 % disodium edetate at 15.2 times ( $0,231 \pm 0,02$  units of optical density); under cetylpyridine chloride solution with 0.02 % disodium edetate in 9.6 times ( $0,366 \pm 0,04$  units of optical density).

Analyzing the results of research antiseptics with 0.02 % disodium edetate action on a daily *S. aureus* biofilm and planktonic cells ability to form secondary biofilm we can state the fact that there is a destruction of primary biofilm (control value –  $2,26 \pm 0,24$  units of optical density): when exposed to a solution of decametoxin with 0.02 % disodium edetate in 4 times ( $0,569 \pm 0,06$  units of optical density); under 0.01 % solution of myramistinum with 0.02 % disodium edetate in 3.5 times ( $0,645 \pm 0,05$  units of optical density); under 0.01 % solution of benzalkonium chloride with 0.02 % disodium edetate in 6.3 times ( $0,357 \pm 0,04$  units of optical density); cetylpyridine chloride solution with 0.02 % disodium edetate in 2.9 times ( $0,768 \pm 0,08$  units of optical density) and inhibiting of the ability of planktonic cells to form secondary biofilm (control value –  $3,507 \pm 0,42$  units of optical density): under action of decametoxin solution with 0.02 % disodium edetate at 28.7 times ( $0,122 \pm 0,01$  units of optical density); 0.01 % solution of myramistinum with 0.02 % disodium edetate at 34.4 times ( $0,102 \pm 0,02$  units of optical density); 0.01 % solution of benzalkonium chloride with 0.02 % disodium edetate at 32.5 times ( $0,108 \pm 0,04$  units of optical density); cetylpyridine chloride solution with 0.02 % disodium edetate at 24.7 times ( $0,142 \pm 0,02$  units of optical density).

*Conclusions.* Thus, research has revealed that to prevent formation of biofilms by *S. aureus*, as well as for inhibition of formed *S. aureus* biofilms such antiseptics with 0.02% disodium edetate are in appropriate use that to suppress the production of planktonic cells and destroy *S. aureus* daily biofilm, as 0.01% solution of myramistinum with 0.02% disodium edetate; 0.01% solution of benzalkonium chloride with 0.02% disodium edetate and 0.01% solution of cetylpyridine chloride with 0.02% disodium edetate. This is due to mechanism of antiseptics action on one hand (based on their molecules direct interaction with hydrophobic lipid membranes of microorganisms, which leads to fragmentation and destruction, and the part of the molecule plunging into the hydrophobic region of membrane destroys layer and increases the permeable ability of the membrane to macromolecular substances and changes enzymatic activity of microbial cells, inhibits the enzyme system which leads to inhibition of the activity of microorganisms and their cytolysis), on the other hand – under the chemical interaction between chlorine-containing antiseptics (cations) with disodium edetate (anion) is formed equivalent amount of hydrogen ions. The concentration of hydrogen ions in the environment acts on the body, either directly or indirectly through effects on ion status and availability of many ions and metabolites and the stability of macromolecules. If the concentration of hydrogen ions from a solution becomes beyond the normal range for this type of microbe, its life is terminated. Thus, the use of antiseptics with disodium edetate prevents formation of biofilms by *S. aureus* and promotes the destruction of existing biofilms.

**Keywords:** antiseptics, disodium edetate, biofilms, *S. aureus*.

*Рецензент – проф. Лобань Г. А.  
Стаття надійшла 4. 06. 2014 р.*