

УДК: 615.281:616-092:576.8

ДІЯ АНТИСЕПТИЧНИХ ЗАСОБІВ НА ПАТОГЕННІ МЕХАНІЗМИ БАКТЕРІЙ

Жорняк О. І., Стукан О. К., Сухляк В. В.
Вінницький національний медичний університет
ім. М. І. Пирогова

Адгезія мікроорганізмів на чутливих клітинах є початковим та необхідним етапом інфекційного процесу. Прикріплення патогенних мікроорганізмів до клітин слизових оболонок ротової порожнини та глотки людини є беззаперечною умовою для розмноження та подальшого прояву вірулентних властивостей збудників інфекційних захворювань [1,2,3]. Адгезивний процес характеризується специфічністю, що полягає у вибірковій здатності мікробів прикріплюватися до епітеліальних клітин певних органів макроорганізму. У межах одного органу або системи відмічають мозаїчність адгезії. Мікробна адгезія різна не тільки в різних тканинах, але і у різних особин одного і того ж виду, в залежності від віку, генетичних особливостей і стану здоров'я.

Виділяють дві групи механізмів адгезії – неспецифічну та специфічну. Основою неспецифічної адгезії є фізико-хімічні процеси, що визначаються молекулярним тяжінням, гідрофобними та електростатичними силами. Як правило неспецифічна адгезія є зворотною. В англійській літературі для її характеристики використовують термін “docking” (постановка в док). Незворотнім процесом вважають специфічну адгезію. Вона відбувається в результаті молекулярної взаємодії між адгезинами мікробної клітини і рецепторами клітини хазяїна (ліганд-рецепторна взаємодія). Специфічна адгезія і колонізація можливі тільки у випадку, якщо мікроорганізми можуть вистояти проти мікробостатичних та мікробіцидних факторів слизових оболонок та шкіри.

Специфічна адгезія включає декілька етапів, в результаті чого мікробні клітини прикріплюються до поверхні чутливих клітин. Елементи клітинної стінки мікроорганізмів, що взаємодіють з рецепторами клітин макроорганізму називають адгезинами. Характер їх будови обумовлює специфічність даного процесу. З цим пов'язують властивість одних мікроорганізмів прилипати і колонізувати епітелій дихальних шляхів, інших – кишковий тракт, третіх – слизову сечовидільної системи [4]. Адгезини являють собою поверхневі структури мікробних клітин до складу яких входять макромолекули лектинів, протеїнів, що здатні зв'язуватись з рецепторами чутливої клітини. Рецептори представлені білковими фрагментами або карбогідратами, що комплементарні адгезинам [5,6]. Грампозитивні та грамнегативні мікроорганізми мають різну будову адгезинів. У грампозитивних бактерій адгезини представлені білковими молекулами, які міцно зв'язані з цитоплазматичною мембраною. Такі адгезини називаються афімбріальними. Рецепторами для адгезинів грампозитивних бактерій є фібронектин та білки

міжклітинного матриксу еукаріотичних клітин. У грамнегативних мікроорганізмів адгезини входять до складу ворсинок (фімбрії, пілі), тому їх називають фімбріальними адгезинами. Рецептори чутливих клітин представлені білковими фрагментами, що комплементарні адгезинами. Фімбріальні адгезини забезпечують більш ефективну адгезію, в порівнянні з афімбріальними. Вони локалізуються на довгій тонкій ніжці, яка полегшує їх контакт з рецепторами і дозволяє подолати захисний бар'єр нормальної мікрофлори та інші захисні механізми. У капсульних бактерій в адгезії приймають участь капсульні полісахариди і поліпептиди. У мікоплазм адгезини входять до складу виступів цитоплазматичної мембрани, у вірусів адгезія відбувається за рахунок білків капсиду і глікопротеїнів суперкапсиду. Видовий склад мікрофлори слизової оболонки ротової порожнини та горла може змінюватись у хворого протягом життя. Суттєве значення має збалансований склад нормофлори, її антагоністичні властивості. В останні десятиріччя намітилась тенденція до зміни видового складу мікрофлори ротової порожнини та глотки в бік збільшення кількості умовно-патогенних мікроорганізмів. Серед них провідне місце займають стафілококи, *S. albicans* та кишкова паличка, що мають широку розповсюдженість, множинну лікарську стійкість до антимікробних засобів [7,8]. Фактори вірулентності стафілококу пов'язані з їх адгезією на рецепторах чутливих клітин, колонізацією та іншими патогенними властивостями. Адгезивна здатність стафілококів виражена у відношенні клітин та міжклітинних речовин різних тканин (епітелій, фібронектин, колаген, фібриноген та ін.). Так, стафілококи не прикріплюються до тромбів, вкритих гнійним ексудатом, внаслідок блокування фібронектинових рецепторів. Білок А, який розміщується в клітинній стінці володіє антифагоцитарними властивостями. Він зв'язується з фібронектином – адгезивним глікопротеїном, який вкриває поверхню клітин і знаходиться в базальних мембранах сполучної тканини [4,9,10].

В зв'язку з широким використанням антибіотиків, друга половина ХХ століття супроводжувалась значним ростом мікозів, які вражають від 5 до 20% дорослого населення. Серед усіх мітотичних вражень на другому місці після оніхомікозу стоїть кандидоз слизових оболонок, до 40% випадків якого складають орофарингіальні мікози. Уявлення про закономірності адгезії грибів роду *Candida* особливо важливе в зв'язку з відсутністю чітких критеріїв розмежування носійства та патології [11].

Антибіотики, пригнічуючи нормальну мікрофлору, сприяють посиленій адгезії грибів і колонізації ними епітелію. Різке наростання адгезії грибів роду *Candida* до епітеліоцитів ротової порожнини відзначено вже в перші дні введення антибіотиків. Головна роль в здійсненні взаємодії мікроорганізмів із мішенями належить процесам міжмембранної адгезивної взаємодії. Профілактика захворюваності, а також знання патогенезу інфекційної патології потребують детального вивчення колонізуючих властивостей бактерій, оскільки колонізація це природна форма існу-

вання як сапрофітів, так і патогенних бактерій. Розробка методів дослідження взаємодії бактерій з клітинами еукаріотів є актуальним завданням і відкриває перспективу створення нових антиадгезивних засобів та вибір більш ефективних препаратів. Після втрати адгезивних властивостей мікроорганізми втрачають і здатність викликати захворювання. Можна припустити, що на даний процес можна впливати за допомогою протимікробних препаратів. Метою нашого дослідження було вивчити формування резистентності клінічних штамів стафілокока та клінічних штамів *Candida albicans* до таблетованих антисептичних препаратів септефрилу (декаметоксин), себедину (хлоргексидину дигідрохлорид) та аджисепту (амілметакрезол) на адгезивні властивості мікроорганізмів.

Матеріали і методи. Для дослідження нами було взято таблетовані антисептичні лікарські препарати септефрил, себедин та аджисепт в мінімальних бактеріостатичних концентраціях (МБСК). Об'єктом дослідження були клінічні штами стафілококу (*S.aureus* 44, *S.aureus* 110) та кишкової палички (*E.coli* 128, *E.coli* 34), виділені від хворих на гнійно-запальні процеси. Для порівняння було взято музейні штами *S.aureus* ATCC 25923, *S.aureus* p 209 та *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* O-55. Для вивчення адгезивних властивостей користувались загальноприйнятою методикою В. І. Бріліса [12], яка передбачає використання формалінованих еритроцитів людини O(I) групи Rh(+). Еритроцити вибрали в якості універсальної моделі, оскільки на своїй поверхні вони несуть глікофорин – речовину, ідентичну глікокаліксу епітеліальних клітин. Бактерії культивували протягом доби. Потім готували бактеріальну суспензію активно ростучих культур в концентрації 10^9 /мл; еритроцитів – 10^8 /мл. Після проведених досліджень готували мазки, висушували на повітрі, фіксували метиловим спиртом, фарбували за Романовським-Гімза. Під мікроскопом на 100 еритроцитах визначали індекс адгезивності (IA) – число прикріплених мікроорганізмів на одному еритроциті, котрі приймали участь в адгезивному процесі. Щодо критеріїв адгезивності, то мікроорганізм вважають неадгезивним при $IA \leq 1,75$; низькоадгезивним – від 1,76 до 2,5; середньоадгезивним – від 2,51 до 4,0, та високоадгезивним при IA більш ніж 4,0. Статистичний аналіз отриманих даних проводили за допомогою програми StatSoft Statistica v 5.0. Використовували метод варіаційного аналізу з визначенням середньої арифметичної (M), похибки середньої арифметичної ($\pm m$) та критерій достовірності відмінностей (p). Результати вважалися достовірними при значеннях $p < 0,05$, при значеннях $p < 0,01$ високодостовірними [13].

Результати та обговорення. Як показали результати досліджень, антисептичні препарати септефрил, себедин, та аджисепт впливали на адгезивну здатність музейних та клінічних штамів стафілококу. Так, у контролі кількість адгезованих клітин як музейного так і клінічного штамів, була найвищою і складала 100%. При порівнянні контрольних та експериментальних досліджень адгезивна здатність стафілококу в присутності антисептичних препаратів зменшилась, про що свідчать дані табл.1 та рис. 1-2.

Встановлено, що найнижчий відсоток прикріплених бактеріальних клітин до еритроцитів був в присутності септефрилу і дорівнював 39,51-34,08% ($p < 0,001$) у музейних штамів при МБСК 20 мкг/мл та 51,7-51,9% ($p < 0,001$) у клінічних при МБСК 9,81 мкг/мл, що у 2,53 та 1,93 и рази відповідно менше ніж в контролі.

Вищий відсоток адгезованих стафілококів на поверхні еритроцитів було виявлено при дослідженні препарату себедин. Кількість клітин музейного штаму *S. aureus* ATCC 25923, які прийняли участь в адгезії в присутності даного препарату складала 56,8% ($p < 0,001$) при МБСК 3,9 мкг/мл, а для *S.aureus* p 209 – 54,82% ($p < 0,001$), що в 1,76 та 1,82 рази відповідно менше ніж в контролі. Кількість клітин клінічного штаму *S.aureus* 44 склав 68,1% ($p < 0,05$), а штаму *S.aureus* 110 – 68,02% ($> 0,05$) при МБСК 6,24 мкг/мл, що в 1,46 рази менше ніж в контролі.

Щодо критеріїв адгезивності, то мікроорганізм вважають неадгезивним при $IA \leq 1,75$; низькоадгезивним – від 1,76 до 2,5; середньоадгезивним – від 2,51 до 4,0, та високоадгезивним при IA більш ніж 4,0. Статистичний аналіз отриманих даних проводили за допомогою програми StatSoft Statistica v 5.0. Використовували метод варіаційного аналізу з визначенням середньої арифметичної (M), похибки середньої арифметичної ($\pm m$) та критерій достовірності відмінностей (p). Результати вважалися достовірними при значеннях $p < 0,05$, при значеннях $p < 0,01$ високодостовірними [13].

Таблиця 1. Характеристика дії септефрилу, себедину та аджисепту на показники адгезії штамів *S.aureus*

Штами бактерій	Контроль		септефрил		себедин		аджисепт	
	IA	%	IA	%	IA	%	IA	%
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	4,96	100±0	1,96	39,51±0	2,92	56,8±0	2,26	46,69±0
P до контролю	-		< 0,001		< 0,001		< 0,001	
<i>S.aureus</i> p 209	5,14	100±0	1,82	34,08±0	2,84	54,82±0	2,34	46,06±0
P до контролю	-		< 0,001		< 0,001		< 0,001	
<i>S.aureus</i> 44	5,22	100±0	2,48	51,9±0	3,46	68,1±0	3,1	63,5±0
P до контролю	-		< 0,001		< 0,05		< 0,05	
<i>S.aureus</i> 110	4,84	100±0	2,8	68,02±0	3,66	68,02±0	3,48	64,4±0
P до контролю	-		< 0,001		> 0,05		> 0,05	

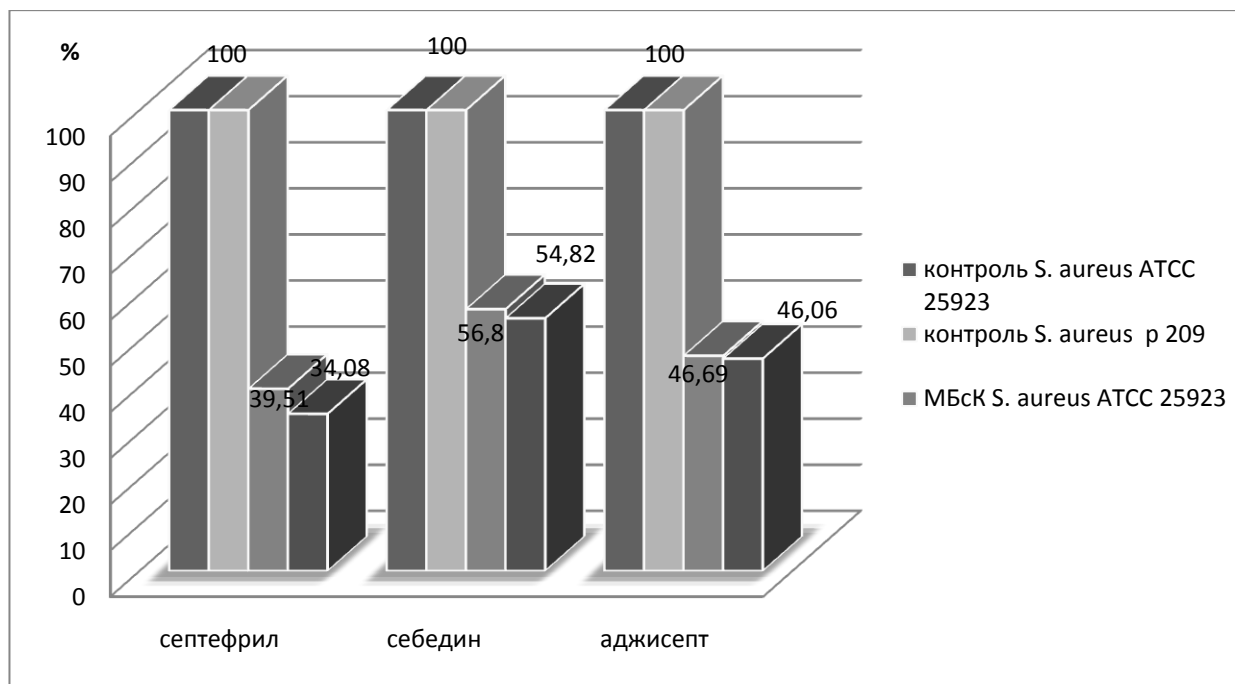


Рис.1. Вплив септефрилу, себедину та аджисепту на адгезивні властивості музейних штамів S.aureus

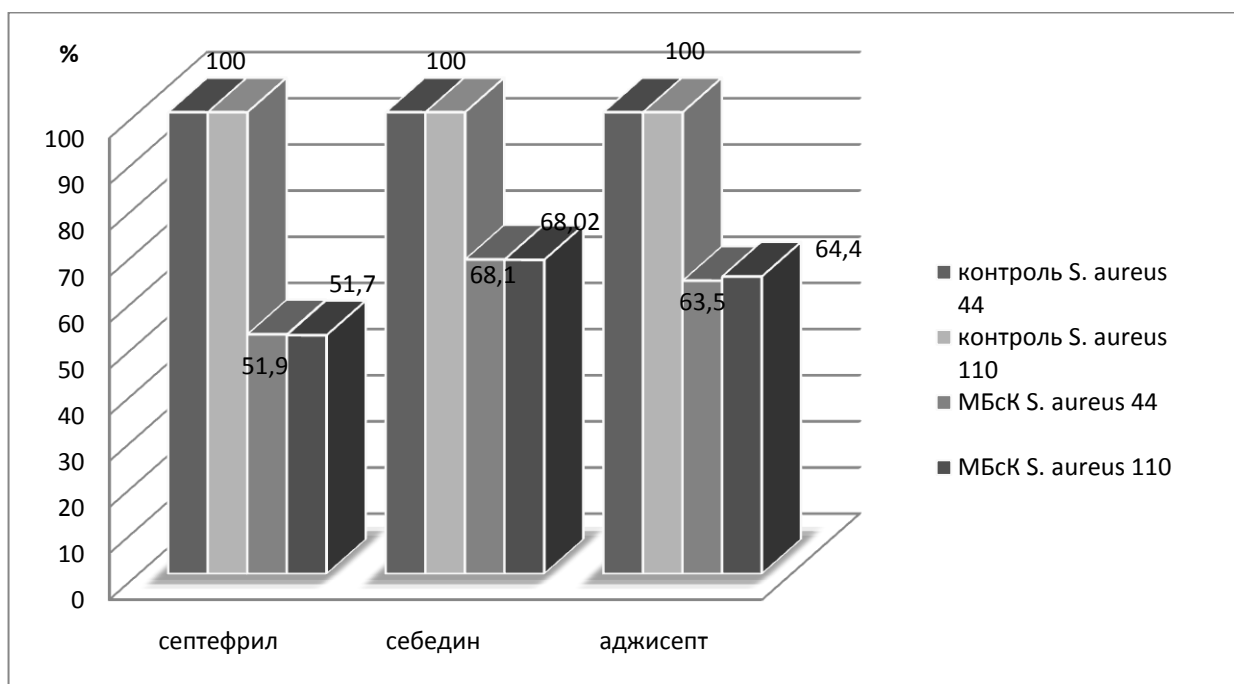


Рис.2. Вплив септефрилу, себедину та аджисепту на адгезивні властивості клінічних штамів S.aureus

Аналіз протимікробної дії аджисепту на досліджуваній штам S.aureus показав, що кількість клітин музейних штамів, які прийняли участь в адгезії в присутності МБСК 15 мкг/мл ($p < 0,001$) складала 46,69% та 46,06%, що в 2,14 рази менше ніж в контролі. Для клінічного штаму S.aureus 44 при МБСК 20,25 мкг/мл відсоток адгезованих стафілококів на поверхні еритроцитів дорівнював 63,5% ($p < 0,001$), а для S.aureus 110 - 64,4% ($> 0,05$), що в 1,57 рази менше ніж в контролі. В наступних дослідженнях нами було вивчено вплив антисептичних препаратів на ад-

гезивні властивості кишкової палички. Одержані дані наведено в табл.2 та рис. 3-4. Слід зазначити, що адгезивна активність ентеробактерій була вищою ніж у штамів стафілококу. Можна припустити, що це обумовлено будовою фімбріальних адгезинів кишкової палички, які забезпечували більш ефективну адгезію, ніж афімбріальні адгезини стафілококів. Так відомо, що адгезія кишкової палички забезпечується специфічними фімбріями, зв'язаними з рецепторами епітеліальних клітин. Вони розділені на декілька типів і значно відрізняються по складу у патогенних і

непатогенних ешерихій. Ця властивість дозволяє кишковій паличці проявляти високу адгезивну активність і конкурувати з патогенними видами ентеробактерій. В присутності антисептичних препаратів адгезивна здатність штамів кишкової палички зменшувалася. Так, у контролі кількість адгезованих клітин як музейних так і клінічних штамів складала 100%. Встановлено, що при дослідженні препарату септефрил, відсоток прикріплених клітин музейних штамів

E.coli до еритроцитів при МБсК 30 мкг/мл складав 40,83 - 43,6% (< 0,001), що в 2,4 рази менше ніж в контролі. Індекс адгезивності дорівнював 2,26 для E.coli ATCC 25922 та 2,16 для E.coli O-55. У клінічних штамів при МБсК 31,41 мкг/мл септефрилу відсоток прикріплених клітин дорівнював 57,5%. Індекс адгезивності складав 3,03 (< 0,05) для E.coli 128 та 2,83 (< 0,001) для E.coli 34.

Таблиця 2. Характеристика дії септефрилу, себедину та аджисепту на показники адгезії штамів E.coli

Штами бактерій	Контроль		септефрил		себедин		аджисепт	
	IA	%	IA	%	IA	%	IA	%
E.coli ATCC 25922	5,18	100±0	2,26	43,6±0	3,28	69,5±0	3,56	72,8±0
Р до контролю	-		< 0,001		< 0,05		< 0,05	
E.coli O-55	4,72	100±0	2,16	40,83±0	3,48	67,4±0	3,76	70,7±0
Р до контролю	-		< 0,001		< 0,05		< 0,05	
E.coli 128	5,28	100±0	3,03	57,6±0	4,26	79,2±0	3,86	80,1±0
Р до контролю	-		< 0,05		> 0,05		< 0,05	
E.coli 34	4,92	100±0	2,83	57,5±0	3,75	75,6±0	3,74	79,9±0
Р до контролю	-		< 0,001		> 0,05		> 0,05	

Адгезивна здатність кишкової палички в присутності себедину для штаму E.coli ATCC 25922 складала 69,5% (< 0,05), а для E.coli O-55 – 67,4% (<

0,05) при МБсК препарату 250 мкг/мл, що в 1,4 рази менше ніж в контролі. Кількість клітин клінічних штамів E.coli 128 та E.coli 34, що

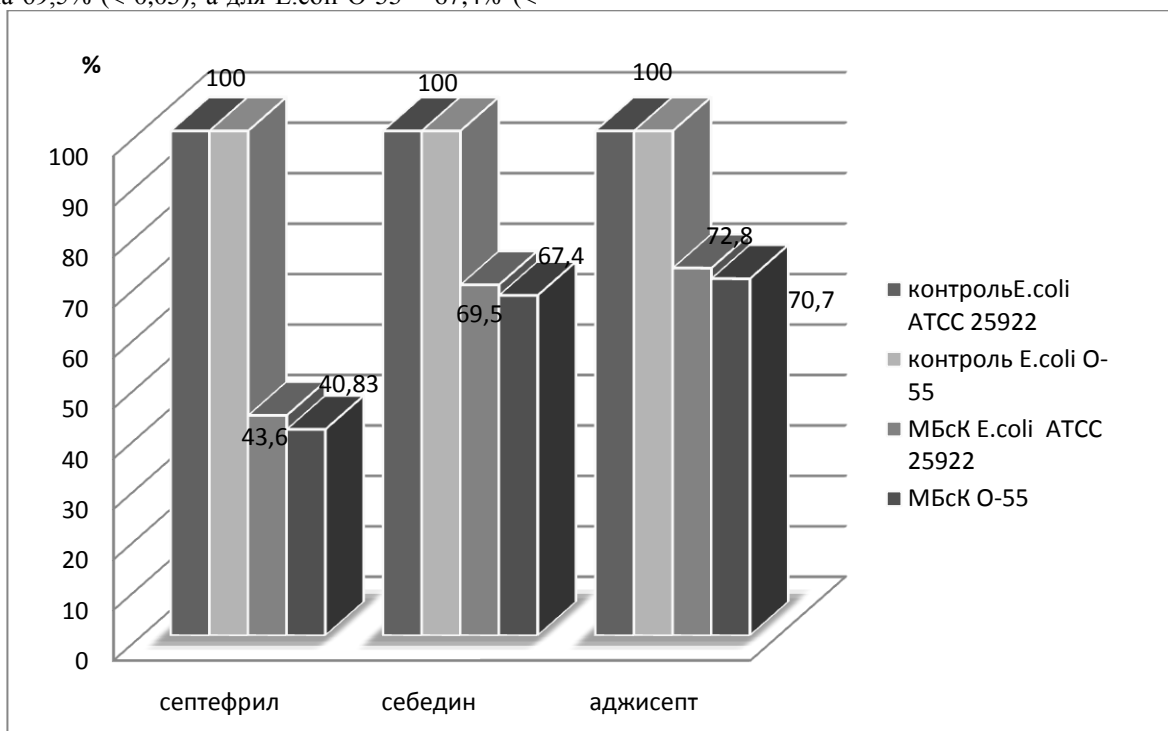


Рис.3. Вплив таблетованих антисептичних препаратів на адгезивні властивості музейних штамів E.coli

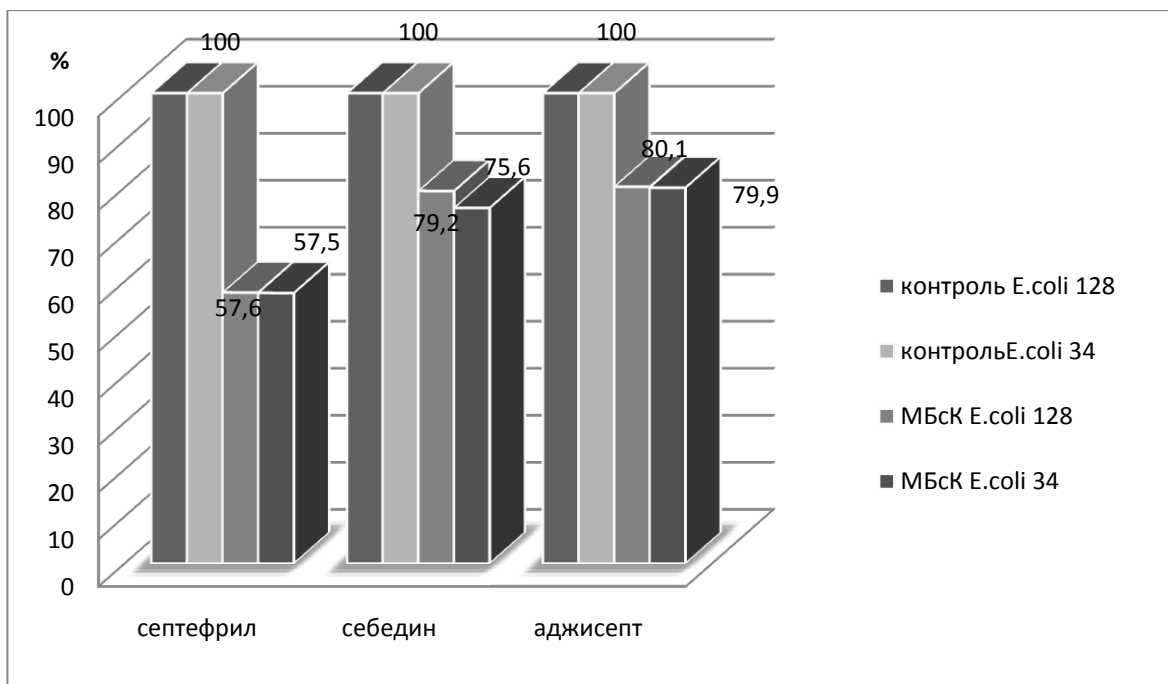


Рис.4. Вплив таблетованих антисептичних препаратів на адгезивні властивості клінічних штамів E.coli прийняли участь в адгезії в присутності МБсК 426 мкг/мл себедину складала 75,6-79,2% (> 0,05).

Вищий відсоток адгезованих ентеробактерій на поверхні еритроцитів було виявлено при дослідженні препарату аджисепт. Кількість клітин музейного штаму E.coli ATCC 25922, які прийняли участь в адгезії в присутності МБсК 30 мкг/мл даного препарату складала 72,8% (< 0,05), а для E.coli O-55 – 70,7% (< 0,05), що в 1,37 та 1,41 рази відповідно менше ніж в контролі. Кількість клітин клінічного штаму E.coli 128 в присутності аджисепту склав 80,1% (< 0,05), а штаму E.coli 34 – 79,9% (> 0,05) при МБсК 42,86 мкг/мл, що в 1,24 рази менше ніж в контролі.

Таким чином, отриманні результати дозволяють зробити узагальнення, що антисептичні препарати септефрил, себедин та аджисепт суттєво впливають на адгезію грамположитивних та грамнегативних бактерій (стафілококів та ешеріхій).

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Антисептичні препарати септефрил, себедин та аджисепт мають суттєвий вплив на адгезивну здатність музейних і клінічних штамів стафілококу та кишкової палички. Порівнянно з музейними штамми, адгезивна активність клінічних штамів виявилась вище.
2. Вивчення впливу таблетованих антисептичних препаратів на адгезивні властивості мікроорганізмів дає змогу забезпечити успішне лікування хворих з гнійно-запальними захворюваннями ротової порожнини та горла. На подальшу увагу заслуговує вивчення впливу таблетованих антисептичних препаратів на морфологію внутрішніх органів тварин з метою створення високоефективних схем лікування запальних захворювань ротової порожнини та горла.

Список літератури

1. Зеленова Е. Г. Кандиды: экология, морфофункциональные особенности и факторы патогенности [Текст] / Е. Г. Зеленова, М. И. Заславская, Т. В. Махрова // Нижегородский медицинский журнал. – 2002. – № 1. – С. 15–18.
2. Адгезивні властивості та антилізоцимна активність свіжовилучених від хворих дітей шигел і сальмонел / І. А. Воронкіна, С. А. Деркач, А. І. Носатенко [та ін.] [Текст] // Вісник СумДУ. Серія Медицина. – 2007. – № 2. – С. 38–43.
3. Бабич Є. М. Ступінь зміни біологічних властивостей E. coli, K. pneumoniae та P. aeruginosae під впливом екзотоксину S. diphtheriae [Текст] / Є. М. Бабич, С. В. Калініченко, Т. А. Рижкова // Annals of Mechnikov Institute. – 2007. – № 4. – С. 25–29.
4. Дія антибактеріальних засобів на патогенні механізми бактерій / В. М. Бойко, Ю. Л. Волянський, А. Ю. Волянський [та ін.] [Текст] // Biomedical and biosocial anthropology. – 2008. – № 11. – С. 32–38.
5. Адгезія лактобактерій к клеткам вагинального и букального епителія / А. Г.Бойцов, С. В.Ришук, Ю. О.Ильясов, [и др.] [Текст] // Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии им. И.И. Мечникова. – 2004. – № 4(5) – С. 191–193.
6. Оценка влияния отваров лекарственных растений и противобактериальных антител к бифидобактериям in vitro [Текст] / С. М. Попкова, Е. П. Кичишина, С. И. Лещук [и др.] // Журн. микробиол. – 2004. – № 2. – С. 70–74.
7. Бирюкова С. В. Адгезивный потенциал S.aureus и C.albicans, выделенных из экссудата воспаленных слюнных желез под влиянием озонирования [Текст] / С. В. Бирюкова, Г. М. Большакова // Annals of Mechnikov Institute. – 2006. – № 2. – С. 17–21.
8. Cannon R. D. Oral colonization by Candida albicans

- [Text] / R. D. Cannon, W. L. Chaffin // Crit. Rev. Oral Biol. Med. – 1999. – Vol. 10 – P. 359– 383.
9. Павлова И.Б. Электронно-микроскопическое исследование адгезивности бактерий [Текст] / И. Б. Павлова, Е. М. Ленченко // Журн. микробиол. – 2002. – № 1. – С. 3–6.
10. Коваленко І. М. Вплив антисептичних супозиторіїв на адгезивні властивості мікроорганізмів [Текст] / І. М. Коваленко // Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції “Довкілля і здоров'я ”, м. Тернопіль, 23 – 24 квітня: тези доповідей. – 2010. – С. 45–46.
11. Лесовой В. С. Кандидоз ротовой полости (обзор) [Текст] / В. С. Лесовой, А. В. Липницкий, О. М. Окчурова // Проблемы медицинской микологии. – 2003. – № 1. – С. 21–24.
12. Брилис В. И. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов [Текст] / В. И. Брилис, Х. П. Ленцер, А. А. Ленцер // Лаб. дело. – 1989. – № 4. – С. 210–212.
13. Статистический анализ медицинских данных [Текст] / О. Ю. Реброва. – Москва : Медиа Сфера, 2006. – С. 60–74.

УДК: 615.281:616-092:576.8

ДІЯ АНТИСЕПТИЧНИХ ЗАСОБІВ НА ПАТОГЕННІ МЕХАНІЗМИ БАКТЕРІЙ

Жорняк О. І., Стукан О. К., Сухляк В. В.

В роботі представлено результати вивчення впливу антимікробних препаратів на адгезію грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів. Показано, що антисептичні препарати септефрил, себедин та аджисепт гальмували адгезію бактерій. Найнижчий індекс адгезивності спостерігали в присутності препарату септефрил - 39,51-34,08% у музейних штамів стафілокока та 51,7-51,9% у клінічних, що в 2,53 та 1,93 і рази відповідно менше ніж в контролі.

Ключові слова: адгезія, антисептичні препарати, декаметоксин, септефрил, себедин, аджисепт.

УДК: 615.281:616-092:576.8

ДЕЙСТВИЕ АНТИСЕПТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА ПАТОГЕННЫЕ МЕХАНИЗМЫ БАКТЕРИЙ

Жорняк Е. И., Стукан О. К., Сухляк В. В.

В работе представлены результаты изучения влияния антимикробных препаратов на адгезию грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Показано, что антисептические препараты септефрил, себедин и аджисепт тормозили адгезию бактерий. Самый низкий индекс адгезивности наблюдали в присутствии препарата септефрил - 39,51-34,08% у музейных штаммов стафилококка и 51,7-51,9% у клинических, что в 2,53 та 1,93 раз меньше по сравнению с контролем.

Ключевые слова: адгезия, антисептические препараты, декаметоксин, септефрил, себедин, аджисепт.

UDC: 615.281:616-092:576.8

ACTION OF THE PILL ANTISEPTICS ONTO PATHOGENIC MECHANISMS OF BACTERIA

Zhornjak O. I., Stukan O. K., Suchljak V. V.

The results of studying of effect of antimicrobial agents on the adhesion of gram-positive and gram-negative microorganisms were described. Studies have shown that antiseptics septeфрил, sebidin, adzhysept inhibited adhesion of bacteria. The lowest index of adhesiveness observed in the presence of septeфрил was - 39,51-34,08% for museum strains of staphylococcus and 51,7-51,9% for clinical strains of staphylococcus, that in 2,53 and 1,93 times less in comparison with the control.

Key words: Adhesion, antiseptics, decamethoxin, septeфрил, sebidin, adzhysept.