

УДК:[616.288.71-089.85-002.3:546.82:549.282/.283:549.261]-092.9-078:57.083.18

Бондаренко О.В., Мишина М.М., Яценко М.И., Демина Е.В.

ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК МИКРООРГАНИЗМАМИ ПРИ ПИРСИНГЕ УШНЫХ РАКОВИН

Харьковский национальный медицинский университет

Изучена способность различных видов микроорганизмов к образованию биопленок при использовании изделий из разного вида металлов в течение 60 дней наблюдения. Установлено, что при использовании изделий для пирсинга ушных раковин из серебра или золота уменьшается риск возникновения гнойно-воспалительного процесса, снижается оптическая плотность биопленок в течение 60 дней наблюдения, как одного из основных факторов патогенности и резистентности к антимикробным препаратам микроорганизмов.

Ключевые слова: микроорганизмы, гнойно-воспалительный процесс, биопленки, пирсинг, изделия из стали, титана, серебра и золота.

Робота виконана в рамках плану наукових досліджень Харківського національного медичного університету та являється фрагментом комплексної наукової роботи кафедри оториноларингології «Вивчення та моделювання гострих та хронічних патологічних процесів ЛОР органів для підвищення ефективності їх лікування», № державної реєстрації 0116U004985, УДК [616.211+616.216]-002.1/.2-003.6-02-092-036-07-08(047.31)

Вступление

В последнее десятилетие интенсивное изучение различных процессов, реализуемых при наличии достаточной плотности популяции микроорганизмов, вышло на новый теоретический и методический уровень. Исследователями [1,2] установлено, что бактерии проявляют различные формы коллективного поведения: кооперацию, координированную агрессию. Кроме того, микроорганизмы формируют надклеточные системы, которые можно рассматривать как бактериальные биосоциальные системы, характеризующиеся целостностью, единым жизненным циклом и организацией. Таким образом, выбор популяцией микроорганизмов оптимального варианта взаимодействия с внешней средой и клетками высших организмов осуществляется в результате обмена информацией между отдельными биообъектами, что можно считать социальным поведением [3,4]. Такое взаимодействие отдельных микроорганизмов возможно в их конгломерации, которые именуются биопленками. Другими словами - биопленки - это высокоорганизованные, подвижные, гетерогенные биологические системы, которые состоят из активно функционирующих клеток, и из клеток, находящихся в состоянии покоя и заключенных в экзополимерный матрикс [5,6]. Они могут состоять из одного или нескольких видов микроорганизмов [7]. Ранее считалось, что микроорганизмы образуют биопленки на изделиях медицинского назначения, таких как катетеры, эндотрахеальные трубки, контактные линзы [8,9]. В настоящее время показано, что биопленки микроорганизмов обнаруживают более чем в 90% случаев гнойно-воспалительных заболеваний [10,11,12]. В природных условиях микроорганизмы существуют и проявляют свою активность, как правило, в ассоциациях, которые могут меняться под влиянием привнесенных в биосферу новых объектов, которые ранее не существовали, например, синтетических полимерных материалов и изделий из них [13,14]. В настоящее время доказано, что регуляторные

системы типа кворум – сенсинг (QS) играют ключевую роль в большом количестве процессов бактериальной клетки. Система QS осуществляет контроль над плотностью клеток бактериальной популяции, выработкой многих внеклеточных факторов патогенности, что обеспечивает бактериям возможность для преодоления защитных механизмов макроорганизма при инфекции. В случае подавления QS снижается продукция факторов вирулентности бактерий и нарушается формирование биопленки [15].

Цель работы

Изучение способности к формированию биопленок микроорганизмами, выделенных из патологического отделяемого области пирсинга ушной раковины, при использовании изделий из разного вида металла на протяжении 60 дней наблюдения.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования *in vivo* [16] были проведены на 32 кроликах линии Chinchilla, весом 4 кг, в соответствии с национальными «Общими этическими принципами опытов на животных» (Украина, 2001), которые согласуются с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 18.03.1986 г.) [17]. В эксперименте лабораторные животные были разделены на группы, в которых использовали для пирсинга ушных раковин: 1-й группы - золотые изделия; 2-й группы - серебряные; 3-й группы - стальные; 4-й группы - титановые. Все экспериментальные животные содержались в стандартных условиях вивария Харьковского национального медицинского университета. Используемые изделия имели сертификат качества. Выделение микроорганизмов проводили по общепринятым методам [18]; идентифицировали с помощью наборов МІКРО-ЛІА-ТЕСТ. Способность образовывать биопленки изучали на поверхности полистироловых планшетов. Количественным выражением степени образования

биофленок является значение оптической плотности, измеренное на спектрофотометре «Multiskan EX» (тип 355) при 540 нм [19,20]. Статистическая обработка данных проведена с помощью компьютерных программ [21,22].

Результаты исследования

В результате проведенного исследования было установлено, что выделенные микроорганизмы из отделяемого области пирсинга, были способны формировать биофленки, причем плотность их была разной в зависимости от металла изделия и длительности наблюдения.

Так, при использовании стальных изделий для пирсинга ушных раковин (рис.1), микроорганизмы формировали биофленки, плотность которых увеличивалась на протяжении 60 дней: через 14 дней наблюдалась тенденция к увеличению их плотности в среднем в 1,2 раза, через 28 дней – в 1,5 раза, а через 60 дней плотность увеличивалась в среднем в 1,6 раз. Самые плотные биофленки через 60 дней наблюдения образовывали *Actinomyces spp.* (4,51±0,3 ед.оп.), *C. albicans* (4,65±0,8 ед.оп.) и *S. aureus* (3,49±0,7 ед.оп.)

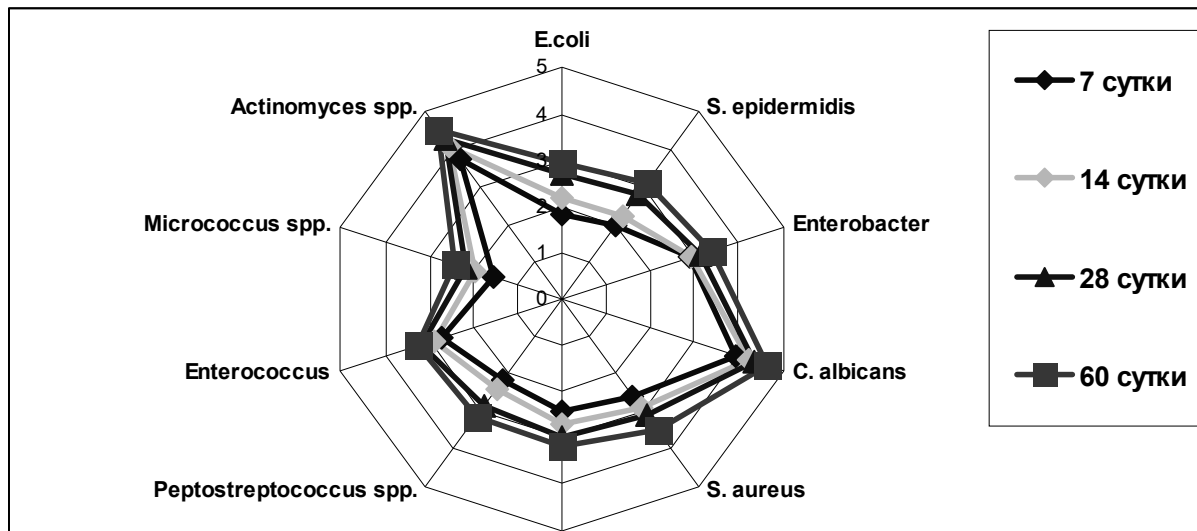


Рисунок 1. – Динамика оптической плотности биофленок микроорганизмов при использовании изделий для пирсинга ушной раковины из стали (III группа).

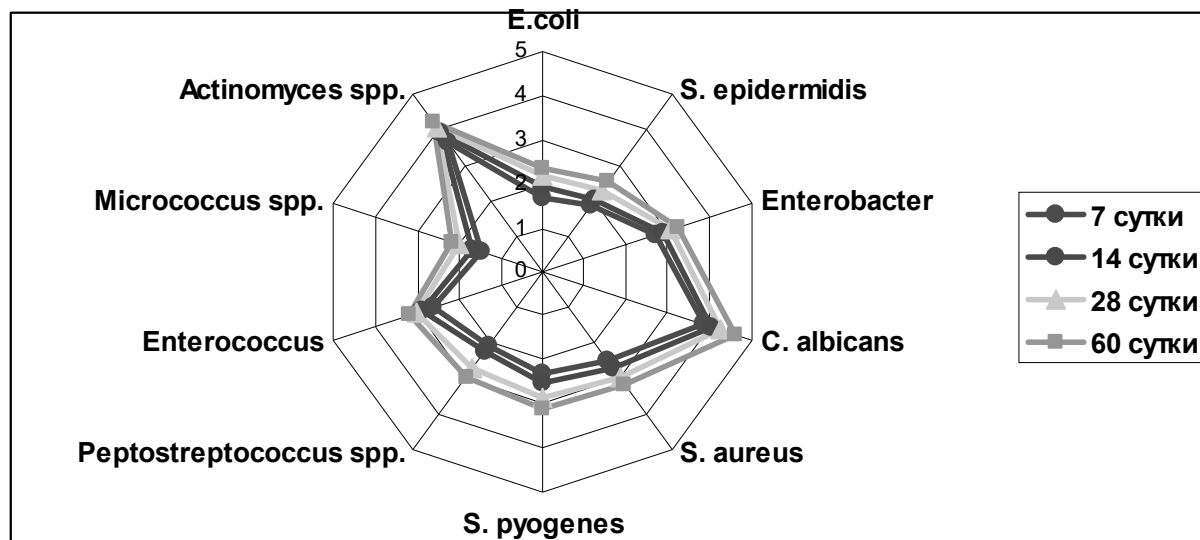


Рисунок 2. – Динамика биофленок микроорганизмов при использовании титановых изделий для пирсинга ушной раковины.

Аналогичные по динамике наблюдения результаты получены при использовании изделий для пирсинга из титана (рис.2), хотя показатель плотности сформированных биофленок практически всеми выделенными микроорганизмами был в среднем в 1,2 раза ниже, чем в III группе.

Анализируя результаты исследований способности к формированию биофленок микроор-

ганизмами при использовании золотых изделий для пирсинга ушной раковины, в I группе (рис.3), установлено, что в течение 60 суток показатель оптической плотности биофленок микроорганизмов увеличился только лишь в 1,1 раз для биофленок *Enterobacter* (2,89±0,3 ед.оп.), *C. albicans* (4,02±0,4 ед.оп.), *S. aureus* (2,61±0,3 ед.оп.), *Peptostreptococcus spp.* (2,26±0,2 ед.оп.). В 1,2

раза наблюдалось увеличение для биопленок *S. pyogenes* ($2,59 \pm 0,4$ ед.оп.), *S. epidermidis* ($1,86 \pm 0,09$ ед.оп.), *Enterococcus* ($2,89 \pm 0,4$ ед.оп.). Для биопленок *Micrococcus spp.* ($1,76 \pm 0,08$ ед.оп.) и *E.coli* ($1,88 \pm 0,06$ ед.оп.) увеличение отмечалось лишь в 1,3 раза по сравнению с таковым на 7 сутки наблюдения. У биопленок *E.coli* показатели были ниже в 1,6 раз по сравнению с использованием изделий из стали ($1,88 \pm 0,6$ ед.оп. и $2,94 \pm 0,8$ ед.оп. соответ-

ственно).

Показатели оптической плотности биопленок микроорганизмов, выделенных из смывов области пирсинга ушной раковины с использованием изделий из серебра (рис.4) были достоверно ниже аналогичных при использовании изделий из стали и титана. Плотность сформированных биопленок не изменялась в течении времени у всех исследуемых микроорганизмов.

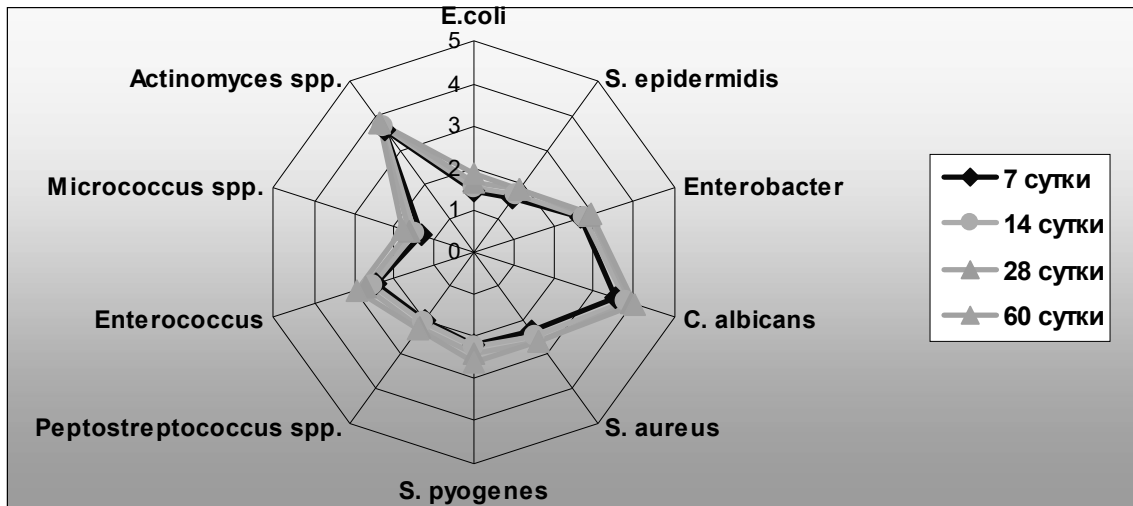


Рисунок 3. - Способность к формированию биопленок микроорганизмами при использовании изделий для пирсинга ушной раковины из золота.

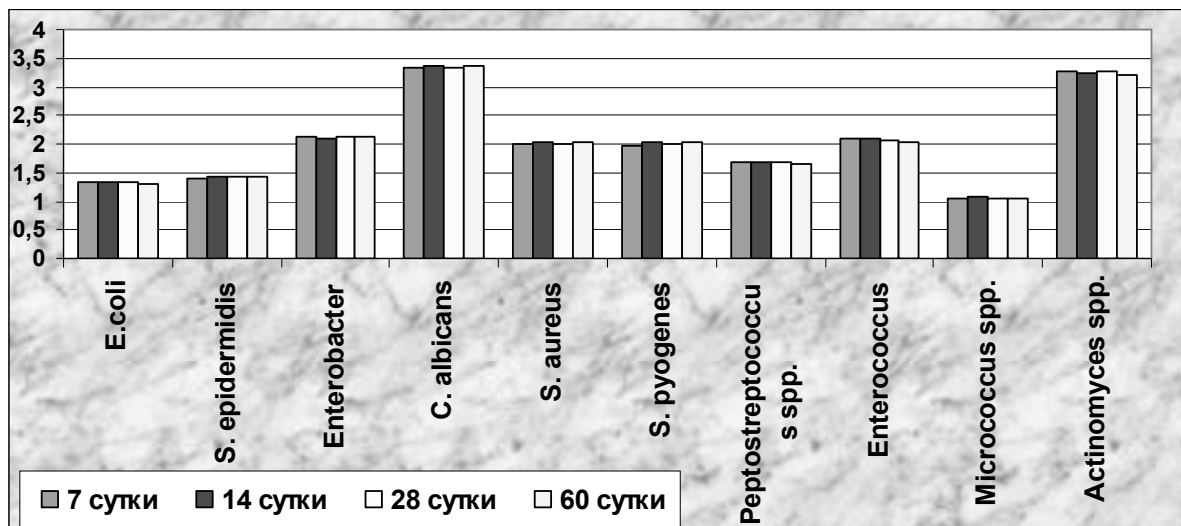


Рисунок 4. - Способность к формированию биопленок микроорганизмами при использовании изделий для пирсинга ушной раковины из серебра.

Выводы

Таким образом, исследования показали, что использование изделий для пирсинга ушных раковин из серебра или золота снижает вероятность возникновения гнойно-воспалительного процесса и препятствует образованию плотных биопленок, как одного из основных факторов патогенности и резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам.

Литература

1. 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.
2. Протасова М.О. Дослідження структури біоплівок, сформованих бактеріями циклу сірки на металевих матрицях / М.О. Протасова, В.Г. Лазарев, І.П. Козлова // Мікробіологічний журнал. – 2006. – Т.68, № 5. – С. 80 – 86.
3. Пуриш Л.М. Динаміка сукцесійних змін у сульфідогенній мікробній асоціації за умов формування біоплівки на поверхні сталі / Л.М. Пуриш, Л.Г. Асауленко // Мікробіол. журнал. – 2007. – Т.69, №6. – С.19 – 25.

4. Шуб Г.М. Материалы к элективному курсу «Микробные сообщества» / Г.М. Шуб, И.Г. Швиденко, Е.А. Пронина, Н.В. Белобородова // Саратовский научно-медицинский журнал. – Том 6. – 2010. – № 2. – С. 245–247.
5. Бехало В.А. Иммунобиологические особенности бактериальных клеток, входящих в состав «медицинских биопленок» / В.А. Бехало, В.М. Бондаренко, Е.В. Сысолятина, Е.В. Нагурская // Микробиология. – 2010. – № 4. – С. 97–107.
6. Воробей С. С. Бактериальні біоплівки. Quorum sensing – «відчуття кворуму» у бактерій в біоплівках / Є. С. Воробей, О. С. Воронкова, А. І. Вінніков // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. – 2012. – Вип. 20, т. 1. – С. 23–27.
7. Мошкевич І.Р. Микробные биопленки при смешанных инфекциях: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 03.00.07 «Мікробіологія» / І.Р. Мошкевич – Санкт-Петербург, 2007. – 27с.
8. Фадеев С.Б. Формирование биопленок возбудителями раневой инфекции и флегмон мягких тканей. / С.Б. Фадеев, Н.В. Немцева, Н.Б. Перунова, О.В. Бухарин // Хирург. – 2010. - №1. - С. 11-18.
9. Chebotar I.V. Bacterial resistance to antibiotics in biofilms / I.V. Chebotar, A.N. Mayansky, E.D. Konchakova [et al.] // Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. – 2012. – 14 (1). – P. 51-58.
10. Доброхотский О.Н. Эпидемиологическое значение биопленок в технических системах / О.Н. Доброхотский, Ю.Н. Хомяков, Т.И. Хомякова // Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. – 2008. – № 4. – С. 78–80.
11. Хмель И. А. Quorum Sensing регуляция экспрессии генов – перспективная мишень для создания лекарств против патогенности бактерий / И. А. Хмель, А. З. Метлицкая // Молекулярная биология. – 2006. – Т. 40. – С. 195–210.
12. Хренов П.А. Обзор методов борьбы с микробными биопленками при воспалительных заболеваниях / П.А. Хренов, Т.В. Честнова // [Электронный ресурс]: Вестник новых медицинских технологий. – Режим доступа: <http://medtsu.tula.ru> – 2013. – №1.
13. Мирошниченко И.И. Ассоциация микроорганизмов, участвующих в формировании биопленки обрастания на полимерных материалах / И.И. Мирошниченко, Я.В. Зачиняев, А.В. Зачиняева // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2009. – №1. - С. 27.
14. Могилівська Н.М. Особливості формування бактеріальних біоплівок на поверхні холестеатом при хронічних гнійних середніх отитах / Н.М. Могилівська, В.Г. Войцеховський, Ю.О. Сушко [та ін.] // Annals of Mechnikov Institute. – 2011. - №4. – С.284-288.
15. Raffa R.B. Bacterial communication ("quorum sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs / R.B. Raffa, J.R. Iannuzzo, D.R. Levine, K.K. Saied [et al.] // J Pharmacol Exp Ther. – 2004. - №312(2). – P.417-423.
16. Першин Г.Н. Методы экспериментальной химиотерапии: Практическое руководство. / Першин Г.Н. - М.: Медицина, 1971. - 539с.
17. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes // Strasbourg. Council Treatu Series. - 1987. - №123. - 52 p.
18. Приказ Минздрава «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» от 22.04.85 № 535.
19. O'Toole G.A. Biofilm formation as microbial development / G.A. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter // Ann Rev Microbiol. – 2000. - № 54. – P. 49–79.
20. Патент UA № 47944, G09B 23/00. Циганенко А.Я., Мишина М.М., Курбанов Р.А. Спосіб відтворення біоплівок мікроорганізмів in vitro. Патент на корисну модель № 47944, МПК G09B23/00, ХНМУ, Заявл.12.10.2009, № u200910353; Опубл. 25.02.2010, Бюл. № 4, 2010.
21. 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.
22. Методика статистической обработки медицинской информации в научных исследованиях / [В.П. Осипов, Е.М. Лукьянова, Ю.Г. Антипкин и др.] – К.: планета людей, 2002. – 200с.

Реферат

ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК МІКРООРГАНІЗМАМИ ПРИ ПІРСИНГУ ВУШНИХ РАКОВИН

Бондаренко О.В., Мишина М.М., Ященко М.І., Дьоміна Є.В.

Ключові слова: мікроорганізми, гнійно-запальний процес, біоплівки, пірсинг, вироби зі сталі, титану, срібла та золота.

Вивчена здатність різноманітних видів мікроорганізмів до утворення біоплівок при використанні виробів з різного виду металів на протязі 60 днів спостереження. Встановлено, що при використанні виробів для пірсингу вушних раковин із срібла та золота зменшується ризик виникнення гнійно-запального процесу, зменшується ризик виникнення гнійно-запального процесу, знижується оптична щільність біоплівок на протязі 60 днів спостереження як одного з факторів патогенності та резистентності до антимікробних препаратів мікроорганізмів.

Summary

BUILD-UP OF BIOFILMS BY MICROORGANISMS IN EAR PIERCING

Bondarenko O.V., Mishina M.M., Yaschenko M.I., Demin E.V.

Key words: bacteria, suppurative inflammation, biofilm, piercing, steel products, titanium, silver and gold.

This article describes the ability of different types of microorganisms to build up biofilms using ear piercing posts and ear rings made of different types of metals during the 60 days of the observation. It has been established that the use of products for ear piercing made of silver and gold reduces the risk of inflammatory processes and decreases optical density of biofilms within 60 days of the observation as one of the factors of pathogenicity and resistance to antimicrobial agents.