

## КОМБІНОВАНА ДІЯ ПРОТИМІКРОБНИХ РЕЧОВИН НА КОНСОРЦІУМ *S. ALBICANS* І *S. AUREUS*

В.В. Мінухін, О.В. Кочнева, С.М. Граматюк, С.С. Крячко  
Харківський національний медичний університет

### Вступ

До теперішнього часу залишається актуальним питання щодо розуміння існування бактерій як соціальних співтовариств, які формують багаточисельні асоціації. Компоненти цих асоціацій активно взаємодіють між собою, формуючи специфічно організовані та прикріплені до субстрату біоплівки. В біоплівках бактерії об'єднані складними міжклітинними зв'язками, які підтримують «відчуття кворуму» [1, 2]. В патогенезі інфекційних захворювань, за даними американських дослідників, близько 80% всіх мікробних інфекцій у людини протікають з утворенням біоплівок [3].

У складі біоплівок мікроорганізми в 50-500 разів більш стійкі до дії дезінфікуючих речовин, антибактеріальних препаратів, бактеріофагів, антитіл і фагоцитів [4, 5]. Намагаючись вижити в умовах зовнішнього середовища мікроорганізми набули здатності до формування міжвидових співтовариств, заснованих на відношеннях синергізму. При дослідженні асоціації утворених *S. albicans* та *S. aureus* було виявлено, що дрожжові клітини на своїй поверхні мають специфічні рецептори (Als3p), які розпізнають та зв'язують клітини золотистого стафілокока. Здатність гіф-елементів *S. albicans* проникати крізь епітелій надає змогу клітинам золотистого стафілокока вільно просуватися в глиб тканин [6]. Такі взаємовідносини між цими мікроорганізмами мають великий вплив на розвиток та перебіг інфекційних захворювань, що спричиняє складність діагностики та лікування.

Можливо, саме тому консорціум *S. albicans* і *S. aureus* займає третє місце серед причин виникнення полімікробних захворювань та у 27% випадках ці патогени є причиною госпітальних інфекцій [7]. За даними дослідників *S. albicans* займає четверте місце серед етіологічних чинників сепсису та викликає катетер-асоційовані інфекції, наслідком чого є висока летальність [8, 9]. Важливе значення для розвитку медицини є вивчення механізмів формування резистентності мікроорганізмів до хіміотерапевтичних препаратів.

Комплексне застосування протимікробних препаратів є стандартом лікування бактеріальних інфекцій. Оптимальне поєднання хіміотерапевтичних препаратів дозволяє максимально розширити спектр дії та посилити антибактеріальний ефект, особливо при змішаних інфекціях, коли збудники мікробних асоціацій мають різну чутливість.

В багатьох країнах вченими проводяться дослідження щодо визначення комбінованої дії протимікробних препаратів на інфекції, які викликані асоціацією *S. albicans* і *S. aureus*. [10], але на сьогоднішній день спектр використання хіміотерапевтичних препаратів відносно цього консорціума залишається недостатнім.

Експериментальні дослідження що проводяться в цій галузі, направлені на вивчення механізмів формування резистентності у мікроорганізмів до хіміотерапевтичних препаратів та процесів їх взаємодії в міжвидових асоціаціях, здатності до формування біоплівок, утворених *S. albicans* і *S. aureus*, факторів їх патогенності та вірулентності. Однак залишається актуальним питання визначення нових комбінацій протимікробних засобів ефективних відносно консорціума *S. albicans* і *S. aureus*.

**Мета дослідження:** визначення комбінованої дії протимікробних препаратів на асоціацію ізолятів та референтних штамів *S. albicans* і *S. aureus*.

### Матеріали та методи дослідження

У дослідженні були використані 10 штамів *S. aureus* виділених від хворих на різні гнійно – запальні процеси, та 4 референтні штами ATCC 25923 в якості контрольної групи. Також вивчалися 10 штамів *S. albicans*, які були виділені з мокротиння від хворих на пневмонію та референтний штам ATCC 885-653.

Здатність мікроорганізмів до формування біоплівок визначали за оптичною щільністю при довжені хвилі 545 нм [11]. Мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) лікарських речовин (тербінафін, еритроміцин, ефірна олія полину) на асоціацію *S. aureus* і *S. albicans* визначали методом серійних розведень. Результати оцінювали за оптичною щільністю при довжені хвилі 545 нм на аналізаторі LabLine-90. Отримані дані обробляли за допомогою пакету програми Excel.

### Отримані результати та їх обговорення

При визначенні здатності до формування біоплівок ізолятів і референтних штамів *S. albicans* і *S. aureus* були отримані наступні дані (табл. 1).

Показники середньої оптичної щільності біоплівки *C. albicans* і *S. aureus*

Назва штаму	Показники середньої оптичної щільності для ізолятів (од.ОЩ)	Показники середньої оптичної щільності для референтних штамів (од.ОЩ)
<i>C. albicans</i>	0,0765±0,008	0,0550±0,006
<i>S. aureus</i>	0,0680±0,007	0,0450±0,008
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i>	0,0987±0,007	0,0776±0,004

**Примітка:** \* різниця достовірна  $p < 0,05$ . Результати досліджень 3 експериментів.

Аналізуючи дані проведеного дослідження було встановлено, що показники оптичної щільності в біоплівках, утворених асоціацією *C. albicans* і *S. aureus* були більш високими ніж в біоплівках, утворених окремими мікроорганізмами. Середня оптична щільність для біоплівки утворених ізолятами *S. aureus* склала 0,0680±0,007 од.ОЩ, для референтних штамів 0,0450±0,005 од.ОЩ. Для біоплівки утворених ізолятами та референтними штамми *C. albicans* показники оптичної щільності склали 0,0765±0,008 і 0,0550±0,006 од.ОЩ відповідно. При визначенні здатності до формування біоплівки утворених асоціацією *C. albicans* і *S. aureus* показники оптичної щільності для ізолятів склали 0,0987±0,007 од.ОЩ, для референтних штамів 0,0776±0,004 од.ОЩ.

При визначенні МІК лікарських речовин (тербінафіну, еритроміцину, ефірної олії полину) на асоціацію *S. aureus* і *C. albicans* були отримані наступні результати (табл. 2).

При визначенні дії тербінафіну МІК для планктонних клітин *C. albicans* склала 4 мкг/мл, для біоплівки 32 мкг/мл, показники середньої оптичної щільності для планктонних клітин склали 0,0483±0,005 од. ОЩ та 0,0715±0,007 од. ОЩ для біоплівки.

При визначенні МІК тербінафіну на планктонні клітини та біоплівки *S. aureus* значення склали 16 і 32 мкг/мл, середня оптична щільність 0,0543±0,015 од. ОЩ та 0,0754±0,01 од. ОЩ відповідно, що свідчить про неефективність речовини відносно мікроорганізмів.

При визначенні дії еритроміцину середня оптична щільність для планктонних клітин та біоплівки *C. albicans* склала 0,0775±0,006 та 0,0931±0,008 од. ОЩ, МІК склала 10 і 10 мкг/мл відповідно. Для *S. aureus* середня оптична щільність була 0,0505±0,005 та 0,0688±0,008 од. ОЩ, МІК склала 1,25 та 2,5 мкг/мл.

Показники середньої оптичної щільності при визначенні МІК тербінафіну, еритроміцину та ефірної олії полину на планктонні клітини та біоплівки *C. albicans* та *S. aureus*

Назва штаму	Концентрація протимікробної речовини, мкг/мл	Планктонні клітини	Біоплівки	Планктонні клітини	Біоплівки
		Середня оптична щільність (од. ОЩ)		Мінімальна подавляюча концентрація (МПК) мкг/мл	
<i>C. albicans</i>	тербінафін (64)	0,0483±0,005*	0,0715±0,007*	4	32
<i>C. albicans</i>	еритроміцин (10)	0,0775±0,007*	0,0931±0,008*	10	10
<i>C. albicans</i>	ефірна олія полину (25)	0,0734±0,005*	0,0882±0,006*	0,8	1,6
<i>S. aureus</i>	тербінафін (64)	0,0543±0,015*	0,0754±0,01*	16	32
<i>S. aureus</i>	еритроміцин (10)	0,0505±0,005*	0,0688±0,008*	1,25	2,5
<i>S. aureus</i>	ефірна олія полину (25)	0,0624±0,008*	0,0782±0,01*	1,6	3,1
<i>C. albicans</i> + <i>S. aureus</i>	тербінафін (32) + еритроміцин (5) + ефірна олія полину (12,5)	0,0451±0,007*	0,0596±0,008*	2,6	6,2

**Примітка:** \* - різниця достовірна  $p < 0,05$ . Результати досліджень 3 експериментів.

Показники середньої оптичної щільності при визначенні дії ефірної олії полину для планктонних клітин та біоплівки *C. albicans* склали 0,0734±0,005 та 0,0882±0,006 од. ОЩ, МІК 0,8 та 1,6 мкг/мл відповідно. Для *S. aureus* МІК склала 1,6 та 3,1 мкг/мл, середня оптична щільність 0,0624±0,008 та 0,0782±0,01 од. ОЩ відповідно.

При визначенні комбінованої дії лікарських речовин були використані їх половинні концентрації. МІК тербінафіну, еритро-

міцину та ефірної олії полину для асоціації *C. albicans* і *S. aureus* склали 2,6 мкг/мл для планктонних клітин та 6,2 мкг/мл для біоплівки, показники середньої оптичної щільності були  $0,0451 \pm 0,007$  та  $0,0596 \pm 0,008$  од. ОЩ відповідно.

#### Висновки

1. В результаті проведеного дослідження було встановлено, що здатність до формування біоплівок ізолятів *C. albicans* і *S. aureus* різна та найбільші показники оптичної щільності виявились у біоплівках утворених асоціацією цих мікроорганізмів. Співіснування цих мікроорганізмів у консорціумі посилює їх фактори вірулентності та патогенності що визначає їх полірезистентність до хіміотерапевтичних препаратів.

2. Комбінація лікарських речовин тербінафін, еритроміцин та ефірна олія полину мали високу ефективність відносно консорціума *C. albicans* і *S. aureus*, МІК для планктонних клітин склала 2,6 мкг/мл, для біоплівок 6,2 мкг/мл.

3. Перспективним напрямком є вивчення взаємодії мікроорганізмів в асоціаціях та механізмів формування резистентності полімікробних інфекцій.

#### Література

1. Parsek M.R. *Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms* / M.R. Parsek, E.P. Greenberg // *Trends Microbiol.* – 2005. – Vol. 13, № 1. – P. 27-33.
2. O'Toole G.A. *Biofilm formation as microbial development* / G.A. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kaplan // *Ann Rev. Microbiol.* – 2000. – № 54. – P. 49-79.
3. Costerton W. *The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections* / W. Costerton, R. Veoh, M. Shirtliff // *Clin. Invest.* – 2003. – № 112. – P. 1466-1477.
4. Costerton J.W. *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections* / J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg // *Science.* – 1999. – Vol. 284, № 1318. – P. 22-31.
5. Davies D. *Understanding biofilm resistance to antibacterial agents* / D. Davies // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2003. – № 2. – P. 114-122.
6. Peters Brian M. *Staphylococcus aureus adherence to Candida albicans hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p* / Brian M. Peters. // *Microbiology.* – 2012. – № 10. – P. 1099.
7. Klotz S. A. *Polymicrobial bloodstream infections involving Candida species: analysis of patients and review of the literature* / S.A. Klotz, B.S. Chasin // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 59. – P. 401-406.

8. Douglas L.J. *Candida biofilms and their role in infection* / L.J. Douglas // *Trends Microbiol.* – 2003. – Vol. 11, № 1. – P. 30-36.

9. Coogan M.M. *Candida and mycotic infections* / M.M. Coogan, P.L. Fidel, M.C. Komesu // *Adv. Dent. Res.* – 2006. – Vol. 19, № 1. – P. 130-138.

10. Harriott M. *Candida albicans and Staphylococcus aureus form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance* / M. Harriott, M. Noverr // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53, № 9. – P. 3914-22.

11. Романова Ю.М. *Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов Salmonella typhimurium* / Ю.М. Романова, Н.В. Алексеева, Т.А. Смирнова // *Журнал микробиология.* – 2006. – № 4. – С. 38-42.

#### Резюме

**Мінухін В.В., Кочнева О.В., Граматюк С.М., Крячко С.С.** *Комбінована дія протимікробних речовин на консорціум C. albicans і S. aureus.*

Консорціум *C. albicans* і *S. aureus* займає третє місце серед причин виникнення полімікробних захворювань та у 27% випадках ці патогени є причиною госпітальних інфекцій В патогенезі інфекційних захворювань, близько 80% всіх мікробних інфекцій у людини протікають з утворенням біоплівок. У складі біоплівок мікроорганізми в 50-500 разів більш стійкі до дії дезінфікуючих речовин, антибактеріальних препаратів, бактеріофагів, антитіл і фагоцитів. Залишається актуальним питання визначення нових комбінацій протимікробних засобів ефективних відносно консорціума *C. albicans* і *S. aureus*. В результаті проведеного дослідження було встановлено, що здатність до формування біоплівок ізолятів *C. albicans* і *S. aureus* різна та найбільші показники оптичної щільності виявились у біоплівках утворених асоціацією цих мікроорганізмів. Комбінація лікарських речовин тербінафін, еритроміцин та ефірна олія полину мали високу ефективність відносно консорціума *C. albicans* і *S. aureus*, МІК для планктонних клітин склала 2,6 мкг/мл, для біоплівок 6,2 мкг/мл.

**Ключові слова:** консорціум *C. albicans* і *S. aureus*, комбінована дія, протимікробні препарати.

#### Резюме

**Минухин В.В., Кочнева А.В., Граматюк С.М., Крячко С.С.** *Комбинированное действие противомикробных веществ на консорциум C. albicans и S. aureus.*

Консорциум *C. albicans* и *S. aureus* занимает третье место среди причин возникновения полимикробных заболеваний и в 27% случаев эти патогены являются причиной госпитальных инфекций. В патогенезе инфекционных заболеваний, около 80% всех микробных инфекций у человека протекают с образованием биопленок. В составе биопленок микроорганизмы в 50-500 раз более устойчивы к действию дезинфицирующих веществ, антибактериальных препаратов, бактериофагов, антител и фагоцитов. Остается актуальным вопрос определения новых комбинаций противомикробных средств эффективных



относительно консорциума *C. albicans* и *S. aureus*. В результате проведенного исследования было установлено, что способность к формированию биопленок изолятов *C. albicans* и *S. aureus* разная и наибольшие показатели оптической плотности оказались у биопленок образованных ассоциацией этих микроорганизмов. Комбинация лекарственных веществ тербинафин, эритромицин и эфирное масло полыни имели высокую эффективность в отношении консорциума *C. albicans* и *S. aureus*, МПК для планктонных клеток составила 2,6 мкг / мл, для биопленок 6,2 мкг / мл.

**Ключевые слова:** консорциум *C. albicans* и *S. aureus*, комбинированное действие, противомикробные препараты.

#### Summary

**Minukhin V.V., Kochneva E.V., Gramatyuk S.N., Krychko S.S.** Combined action of antimicrobial substances on consortium *C. albicans* and *S. aureus*.

Consortium *S. aureus* and *C. albicans* ranks third among causes of polymicrobial disease, and in 27% of cases, these pathogens cause nosocomial infection in the pathogenesis of infectious diseases, about 80% of all microbial infections in humans occur with the formation of biofilms. In the bacteria in biofilms 50-500 times more resistant to disinfectant, antibiotics, bacteriophages, and antibody phagocytes. The issues of identifying new combinations of antimicrobial products effective against consortium *C. albicans* and *S. aureus*. As a result of this study found that the ability to form biofilms and *S. aureus* isolates *C. albicans* different and the highest rates of optical density appeared in biofilms formed by the association of these microorganisms. Combination drugs terbinafine, erythromycin and essential oil of wormwood had relatively high efficiency consortium *C. albicans* and *S. aureus*, the minimum inhibitory concentration for planktonic cells was 2.6 micrograms / ml for biofilms 6.2 mg / ml.

**Key words:** consortium *C. albicans* and *S. aureus*, combined action, antimicrobial drugs.

*Рецензент: д.мед.н. С.І. Похил*

УДК 617.713-092.4.068

## МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ЛИМБАЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

**Е.Н. Свидко, Ю.А. Демин**

*Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины (Харьков)*

*Харьковская медицинская академия последипломного образования*

### Введение

В настоящее время доказана роль лимбальной зоны глаза в регенерации и самообновлении роговицы в течение всей жизни. Установлено, что в базальном слое лимбального эпителия располагаются клетки, которые обладают всеми свойствами стволовых. Проведенные исследования подтвердили локализацию стволовых клеток в лимбальной зоне и позволили охарактеризовать их как клетки с высокой пролиферативной способностью и большей продолжительностью существования по сравнению с центральными клетками роговицы [6, 8, 9]. Существующие заболевания органа зрения человека, особенно хронические, характеризуются вовлечением клеток зоны лимба в патогенез [3, 7, 10]. Наблюдается как снижение количества стволовых лимбальных клеток, способных к делению, так и ухудшение состояния микроокружения клеток лимба из-за недостатка специфических ростовых регуляторов, таких как факторы роста эпителия, трансформирующий ростовой фактор, различные нейротрофические ростовые факторы [5, 11].

Для исследования альтернативных адекватных методов лечения лимбальной недостаточности необходима экспериментальная модель. Наиболее оправданной моделью лимбальной недостаточности является модель с использованием аппликации 0,04% митомицина С на область лимба [2]. Однако, известно, что митомицин С обладает цитостатическим действием [12], поэтому необходимо знать время выведения данного препарата из роговицы животного, адаптировать данную модель, чтобы полученные результаты были наиболее достоверные, и митомицин С не смог оказать цитостатического действия на вводимые препараты.