

DOI: 10.26693/jmbs03.01.253

УДК 579.262:57.085.2:[615.28:615.849].015.21

Дубовик О. С.¹, Мішина М. М.¹, Коробов А. М.²

КОМБІНОВАНА ДІЯ ОПТИЧНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ СИНЬОГО Й ЧЕРВОНОГО СПЕКТРІВ ТА АНТИСЕПТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ЗДАТНІСТЬ ДО ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК ІЗОЛЯТАМИ *PROTEUS MIRABILIS*

¹Харківський національний медичний університет,

Кафедра мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д. П. Гриньова, Україна

²Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,

Науково-дослідна лабораторія квантової біології та квантової медицини, Україна

mishina1969mmm@gmail.com

Проведена мікробіологічна оцінка впливу світлодіодного випромінювання синього й червоного спектрів та антимікробних препаратів на суспензійні культури *Proteus mirabilis*, збудників гнійно-запальних процесів та на їх здатність до формування щільних біоплівки. Показано, що комплексне застосування оптичного випромінювання синього та червоного спектрів з антисептичними препаратами хлоргексидином та перекисом водню, сприяє пригніченню здатності формування щільних біоплівки ізолятами.

Ключові слова: антисептичні препарати, світлодіодне випромінювання синього та червоного спектрів, біоплівки *Proteus mirabilis*.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Представлену роботу виконано у відповідності з плановою тематикою науково-дослідної роботи кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д. П. Гриньова ХНМУ «Експериментальне мікробіологічне обґрунтування протимікробної терапії гнійно-запальних захворювань», № держ. реєстрації 0114U003390.

Вступ. Актуальність даної теми пов'язана з необхідністю розробки раціональної протимікробної терапії, використання якої надасть можливість запобігти появі резистентних до антимікробних препаратів мікроорганізмів. Антибіотикорезистентність на сьогоднішній день виходить за рамки суто

медико-біологічної проблеми, має величезне соціально-економічне значення й у розвинених країнах розглядається загроза національної безпеки [1]. Циркулювання у лікувальних закладах різних умовно-патогенних мікроорганізмів зумовлює певний відсоток гнійно-запальних ускладнень післяопераційних ранових поверхонь, що потребує пошуку шляхів вирішення проблеми [2].

Дослідження механізмів розвитку інфекційного процесу повинні враховувати наявність у мікроорганізмів низки факторів патогенності, зокрема їх здатність утворювати бактеріальні біоплівки. Вивчення механізмів дії антибіотиків на формування біоплівки патогенними і умовно-патогенними мікроорганізмами є необхідною умовою пошуку препаратів, що здатні ефективно пригнічувати плівкоутворюючі бактерії, які викликають інфекційні ускладнення [3]. Зважаючи на існуючі недоліки медикаментозної терапії розробка нових, ефективних та безпечних для людини методів лікування на сьогодні є вкрай актуальною.

Терапевтичні переваги світлодіодного випромінювання при лікуванні ран були зареєстровані ще з 1990-х років. Однак багато з описаних результатів показують неузгодженість, в основному через помилковість методології або відсутності стандартизації в дослідженнях. Крім того, використання світлодіодів в якості терапевтичного ресурсу залишається суперечливим [4]. Сьогодні використання

фотодинамічної терапії набирає обертів, і необхідно провести більше досліджень, щоб довести її протимікробну ефективність. Однак нетоксичні з'єднання, що беруть участь у терапії із застосуванням світлодіодного випромінювання, дають певну надію на те, що вона стане ефективним механізмом боротьби з гнійно-запальними захворюваннями [5].

Тому розробка методів із застосуванням світлодіодного випромінювання та протимікробних препаратів для пригнічення здатності формування планктонними клітинами мікроорганізмів захисних форм – біоплівки в даний час є досить актуальною.

Отже, метою даного дослідження було встановлення комплексної дії антисептичних препаратів, які широко використовуються у практичній медицині, та оптичного випромінювання синього та червоного спектрів на здатність до формування біоплівки ізолятів *Proteus mirabilis*.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктом дослідження були антисептичні препарати (хлоргексидин та перекис водню) та *Proteus mirabilis*, що виділені від хворих з гнійно-запальними процесами. Ферментативну ідентифікацію мікроорганізмів проводили за допомогою ідентифікаційних наборів [6]. Синхронізація періодичної культури шляхом селекції за методом Мітчсона і Вінсента проводилася після встановлення кінетики росту асинхронної культури. Встановлювався режим періодичного культивування таким чином, щоб протягом експоненціального росту клітинна маса подвоювалася від двох до п'яти разів. Приготування суспензій ізолятів із визначеною концентрацією мікробних клітин проводилося за допомогою електронного приладу Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema a.s., Чехія) за шкалою McFarland. Вимірювання оптичної щільності біоплівки мікроорганізмів проводили після добової інкубації при $t=37^{\circ}\text{C}$ та за порівнянням оптичної щільності дослідних та контрольних сформова-

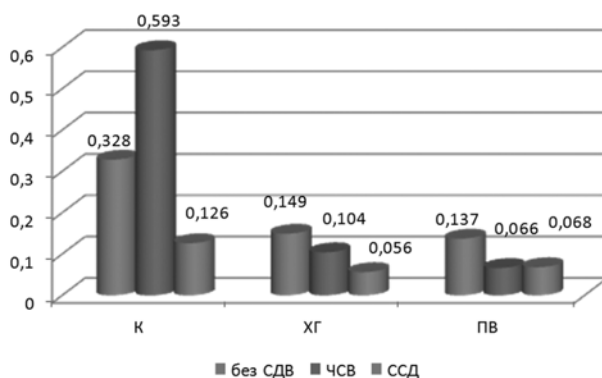


Рис. 1. Дія антисептичних препаратів й оптичного випромінювання синього та червоного спектрів на суспензійну культуру ізолятів *Proteus mirabilis*

них біоплівки робили висновок про ступінь формування біоплівки. Планктонні клітини, які були відібрані з добових біоплівки, інокулювали у комірки планшету, додавали суспензійне поживне середовище і термостатували у вологій камері протягом доби. Далі оцінювали ступінь агрегації мікробних клітин. Кількісним вираженням ступеня формування біоплівки і здатності до агрегації планктонних клітин є значення оптичної щільності на спектрофотометрі «Multiskan EX 355» при 540 нм. Результат визначався в умовних одиницях оптичної щільності (од.ощ.) біоплівкоутворення мікроорганізмами [7].

Опромінення *in vitro* проводилось світлодіодними джерелами синього (440-480 нм) й червоного (620-740 нм) випромінювання фотонної матриці апарата Коробова «Барва-Флекс» [8], що містить світлодіодну матрицю з суперлюмінісцентними світлодіодами і блок живлення.

Для статистичної обробки результатів використовували програму Excel і Biostat [9, 10].

Результати дослідження та їх обговорення.

Аналіз здобутих результатів показав, що при застосуванні оптичного випромінювання червоного спектру разом з антимікробним препаратом хлоргексидином встановлено пригнічення утворення планктонних клітин *Proteus mirabilis* у 3,2 рази порівняно з контролем без опромінення ($0,104 \pm 0,08$ од.ощ. та $0,328 \pm 0,04$ од.ощ.) та з антисептичним препаратом перекису водню у 5 рази ($0,066 \pm 0,08$ од.ощ.). При комплексному застосуванні світлодіодного випромінювання синього спектру й хлоргексидину встановлено пригнічення суспензійної культури *Proteus mirabilis* у 5,9 рази ($0,056 \pm 0,08$ од.ощ.), а при застосуванні перекису водню – у 5,6 рази ($0,068 \pm 0,06$ од.ощ.) порівняно з контролем без опромінення (рис. 1).

Аналізуючи результати щодо здатності формування біоплівки планктонними клітинами після комплексної дії оптичного випромінювання синього та

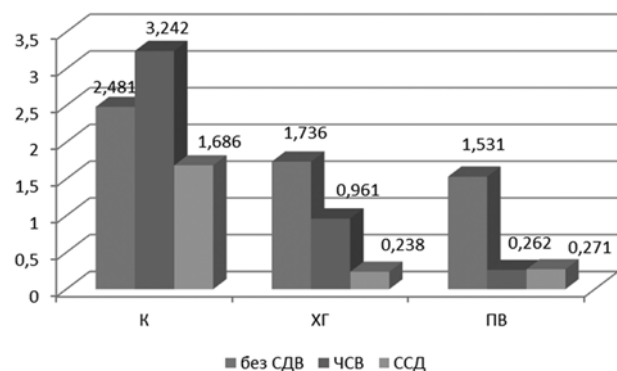


Рис. 2. Формування біоплівки ізолятами *Proteus mirabilis* за дії дослідних препаратів й оптичного випромінювання на суспензійну культуру полірезистентних штамів

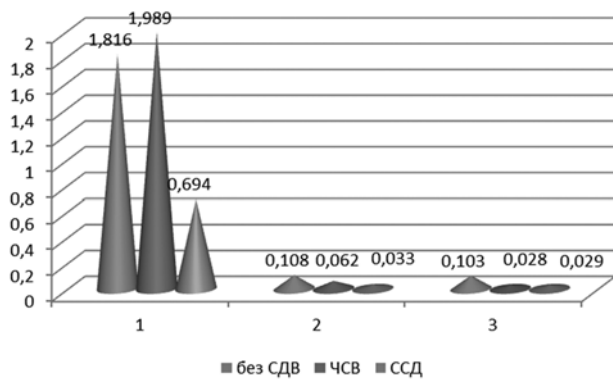


Рис. 3. Щільність планктонних клітин, що утворені біоплівками клінічних штамів *Proteus mirabilis*, за дії антисептичних препаратів і світлодіодного випромінювання червоного та синього спектрів на бактеріальну суспензію (1-контроль, 2 – застосування антисептика хлоргексидина, 3 – застосування перекису водню)

червоного спектрів та антимікробних препаратів на суспензійні культури ізолятів *Proteus mirabilis* встановлено, що під впливом світлодіодного випромінювання синього спектру значно посилюється чутливість ізолятів до хлоргексидину, що запобігає утворенню щільних біоплівок ізолятами: здатність до формування біоплівок знижується у 10,4 рази порівняно з контрольними значеннями без впливу оптичного випромінювання ($0,238 \pm 0,06$ од.ощ. та $2,481 \pm 0,09$ од.ощ.), а при комплексному застосуванні із антисептичним препаратом перекису водню – пригнічення формування біоплівок – у 9,2 рази (рис. 2).

При визначенні здатності добових біоплівок *Proteus mirabilis*, які утворилися після дії антисептичних препаратів і світлодіодного випромінювання на бактеріальні культури ізолятів, утворювати планктонні клітини встановлено, що під впливом світлодіодного випромінювання червоного спектра (рис. 3) спостерігається пригнічення утворення планктонних клітин у комплексі з хлоргексидином - у 29,3 рази, у комбінації з перекисом водню пригнічення утворення планктонних клітин спостерігається у 64,9 рази порівняно з контролем без опромінення, що можна пояснити специфікою механізму дії: у клітинах під впливом ферментів, таких як пероксидаза й каталаза, перекис водню розкладається з виділенням атомарного кисню, який виявляє антимікробні властивості. За дії червоного спектру світлодіодного випромінювання відбувається активація ферментативної активності мікроорганізмів, зокрема пероксидазної та каталазної, тож відбува-

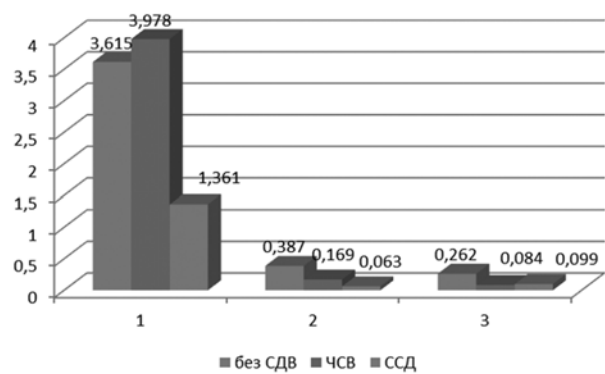


Рис. 4. Щільність нових (вторинних) біоплівок клінічних штамів *Proteus mirabilis*, що сформовані планктонними клітинами за дії антисептичних препаратів і світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів на суспензійну культуру

ється активне виділення кисню з подальшим запобіганням утворення нових мікробних клітин.

Оцінюючи результати, які були отримані після визначення здатності планктонних клітин *Proteus mirabilis* формувати нові біоплівки за впливу світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів і протимікробних препаратів було встановлено пригнічення здатності до формування нових біоплівок планктонними клітинами клінічних штамів *Proteus mirabilis*: у 21,4 рази при застосуванні червоного світлодіодного випромінювання й хлоргексидину: $0,169 \pm 0,08$ од.ощ. та $3,615 \pm 0,05$ од.ощ.; у 43 рази – при червоного світлодіодного випромінювання й перекису водню: $0,084 \pm 0,02$ од.ощ. та $3,615 \pm 0,05$ од.ощ. За дії синього спектру світлодіодного випромінювання й хлоргексидину спостерігається пригнічення формування вторинних біоплівок у 57,4 рази, а у комплексному застосуванні з перекисом водню – у 36,5 рази (рис. 4).

Висновки. Таким чином, в результаті даного дослідження обґрунтовано можливість застосування у комплексній терапії гнійно-запальних процесів оптичного випромінювання синього та червоного спектрів з антисептичними препаратами сприяє пригніченню здатності до формування біоплівок ізолятами *Proteus mirabilis*.

Перспективи подальших досліджень в даному напрямку є вивчення впливу протимікробних препаратів та світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів на добові біоплівки ізолятів *Proteus mirabilis*.

References

1. Svizhak VK, Deyneka SYe. Antybiotykohezystentnist: bahatohrannist problemy. *Klinichna ta eksperymentalna patolohiya*. 2014; XIII (2/48): 222-4. [Ukrainian].
2. Lyeontyeva AV, Voronkova OS, Vinnikov AI. Chutlyvist do antybiotyktiv hramnehatyvnykh bakteriy – zbudnykiv uskladnen ranovykh poverkhon. *Visnyk problem biolohiyi i medytsyny*. 2016; 1 (2): 163-7. [Ukrainian].

3. Sydashenko OY., Voronkova OS, Syrokvasha EA, Vynnykov AY. Vlyyanye tseftryaksona y tetratsyklina na formirovaniye byoplenny shtammamy Staphylococcus epidermidis. *Visnyk Dnipropetrovskoho universytetu. Seriya: Biologiya. Medytsyna*. 2014; 5 (1): 7-11. [Russian].
4. Chaves ME, Araújo AR, Piancastelli AC, Pinotti M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *An Bras Dermatol*. 2014; 89 (4): 616-23. PMID: PMC4148276. doi: 10.1590/abd1806-4841.20142519.
5. Garg T, Jain NK, Rath G, Goyal AK. Nanotechnology-Based Photodynamic Therapy: Concepts, Advances, and Perspectives. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2015; 32 (5): 389-439. PMID: 26559433.
6. *Metodicheskie ukazaniya po primeneniyu unifitsirovannykh mikrobiologicheskikh (bakteriologicheskikh) metodov issledovaniya v kliniko-diahnosticheskikh laboratoriyakh*. Prilozhenie I k Prikazu Ministerstva zdravookhraneniya SSSR № 535 ot 22 Apr 1985. 123 s. [Russian].
7. *Patent 47944 Ukraine*, MPK G09B23/00. Sposib vidtvorennya bioplivok mikroorhanizmiv *in vitro* / Tsihanenko AYa, Mishina MM, Kurbanov RA. (UA); zayavnik i vlasnik patentu Kharkivskiy natsionalniy medichniy universitet MOZ Ukraine (UA). № U200910353; zayavl 12.10.2009; opubl 25.02.2010. Byul № 4. [Ukrainian].
8. Korobov AM, Korobov VA, Lesnaya TA. *Fototerapevticheskie apparaty Korobova serii «Barva»*. Kharkov: IPP «Kontrast», 2008. 176 s. [Russian]
9. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskie metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispolzovaniem Excel. K: MORION, 2000. 320 s. [Russian].
10. Osipov VP, Lukyanova EM, Antipkin YuH, i dr. *Metodika statisticheskoy obrabotki meditsinskoj informatsii v nauchnykh issledovaniyakh*. K: Planeta Iyudey, 2002. 200 s. [Russian].

УДК 579.262:57.085.2:[615.28:615.849].015.21

**КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ
СИНЕГО И КРАСНОГО СПЕКТРОВ И АНТИСЕПТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ
НА СПОСОБНОСТЬ К ФОРМИРОВАНИЮ БИОПЛЕНОК ИЗОЛЯТАМИ
*PROTEUS MIRABILIS***

Дубовик Е. С., Мишина М. М., Коробов А. М.

Резюме. Проведена микробиологическая оценка влияния светодиодного излучения синего и красного спектров и антисептических препаратов на суспензионные культуры *Proteus mirabilis*, возбудителей гнойно-воспалительных процессов и на их способность к формированию биопленок. Показано, что комплексное применение оптического излучения синего и красного спектров с антисептическими препаратами хлоргексидином и перекисью водорода, способствует подавлению способности формирования плотных биопленок изолятами.

Ключевые слова: антисептические препараты, светодиодное излучение синего и красного спектров, биопленки *Proteus mirabilis*.

UDC 579.262:57.085.2:[615.28:615.849].015.21

**Combined Effect of Optical Radiation of the Blue and Red Spectra
and Antiseptic Drugs on the Ability to Form Biofilm
of *Proteus mirabilis* Isolates**

Dubovik O. S., Mishina M. M., Korobov A. M.

Abstract. The relevance of this topic is related to the need of developing rational antimicrobial therapy, the use of which will provide an opportunity to prevent the emergence of resistant to antimicrobial drugs of microorganisms. Despite the progress in the development and improvement of existing methods of antimicrobial therapy of purulent inflammatory processes, this problem remains a priority in modern medicine and microbiology. It happens due to the extremely high growth of antibiotic resistant strains of microorganisms, which is associated with the ability of bacteria to form a protective biofilm around them.

Thus, *the purpose of this study* was to check the complex action of antiseptic drugs that are widely used in practical medicine, and the optical radiation of blue and red spectra on the ability to form biofilm by *Proteus mirabilis* isolates.

Materials and methods. The object of the study was antiseptic drugs (chlorhexidine and hydrogen peroxide) and *Proteus mirabilis*, isolated from patients with purulent-inflammatory processes. Enzymatic identification of microorganisms was carried out using identification kits. The synchronization of periodic culture was carried out after establishing the kinetics growth of asynchronous culture. Measurement of the optical density of microorganisms' biofilm was carried out after one-hour incubation by comparing the optical density of the experimental and control biofilm formed. It helped to determine the degree of biofilm formation. The quantitative expression of the degree of biofilm formation and the ability to aggregate the planktonic cells is the value of the optical density

on the Multiskan EX 355 spectrophotometer at 540 nm. The result was determined in conventional units of optical density of biofilm formation by microorganisms. The exposure to *in vitro* was carried out by LED sources of blue (440–480 nm) and red (620–740 nm) radiation of the photon matrix of the Korobov apparatus "Barva-Flex", which contains an LED matrix with super-fluorescent light-emitting diodes and a power supply. We used the program Exel and Biostat for the statistical processing of the results.

Results and discussion. The analysis of the results showed that in the application of optical radiation of the red spectrum, along with the antimicrobial drug chlorhexidine, the suppression of the formation of *Proteus mirabilis* planktonic cells was 3.2 fold compared with the control objects without irradiation and 5 times the antiseptic preparation of hydrogen peroxide. In the complex application of the LED radiation of the blue spectrum and chlorhexidine, suppression of the suspension culture of *Proteus mirabilis* was detected in 5.9 times, while in the case of hydrogen peroxide application it was 5.6 times compared with the control objects without irradiation. Analyzing the results of the ability of the biofilm formation with planktonic cells after the complex action of optical radiation of blue and red spectra and antimicrobial agents on suspensions of isolates of proteins, *Proteus mirabilis* we found out that under the influence of light emitting diodes of the blue spectrum the sensitivity of the isolates to chlorhexidine significantly increases, which prevents the formation of dense biofilms by isolates: the ability to form biofilm is reduced in 10,4 times in comparison with the control values without any influence of optical radiation and in the complex application with an antiseptic preparation of hydrogen peroxide - inhibition of the formation of biofilm – 9.2 times.

With the definite ability of day biofilm *Proteus mirabilis*, which were formed after applying antiseptic drugs and LED radiation on bacterial cultures of isolates, to form planktonic cells, it was established that under the influence of LED radiation of the red spectrum there is a suppression of the formation of planktonic cells in the complex with chlorhexidine – 29.3 times, in combination with hydrogen peroxide. The inhibition of the formation of planktonic cells was observed to be 64.9 times compared with the control without irradiation, which can be explained by the specific features of action mechanism: the cells under the influence of enzymes such as peroxidase and catalase, hydrogen peroxide decomposes to release atomic oxygen antimicrobial properties. Under the influence of the red spectrum of light-emitting diode radiation, activation of the enzymatic activity of microorganisms, in particular peroxidase and catalase, was taking place, therefore, an active oxygen release occurred, and subsequent prevention of the formation of new microbial cells.

Evaluating the results obtained after determining the ability of planktonic cells *Proteus mirabilis* to form new biofilms under the influence of LED radiation of blue and red spectra and antimicrobial drugs, the inhibition of the ability to form new biofilms with planktonic cells of clinical *Proteus mirabilis* strains was established: 21.4 times with the use of red LED and chlorhexidine and 43 times for the action of red LED and hydrogen peroxide. Under the influence of the blue spectrum of LED radiation and chlorhexidine, the suppression of the formation of secondary biofilms was observed – 57.4 times, and in the complex application with hydrogen peroxide – 36.5 times.

Conclusions. As a result of this study, we substantiated the possibility of application optical radiation of blue and red spectra with antiseptic agents in the complex therapy of purulent-inflammatory processes. This contributes to depression of the ability to form biofilms with *Proteus mirabilis* isolates.

Further research in this area should be dedicated to the study of the effects of antimicrobial drugs and LED radiation of blue and red spectra on the day-to-day biofilm isolates *Proteus mirabilis*.

Keywords: antiseptic drugs, light-emitting diode radiation of the blue and red spectra, biofilm *Proteus mirabilis*.

Стаття надійшла 15.11.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування