© Попов М.М., Мішина М.М., Маланчук С.Г., Козлов О.П.
УДК: 579.841.1.017:544.023:[615.849.1+615.281.9

Попов М.М.[1], Мішина М.М.[2], Маланчук С.Г.[3], Козлов О.П.[3]
[1]Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова (вул. Пушкінська, 14-16, м. Харків, 61057, Україна); [2]Харківський національний медичний університет (пр. Науки, 4, м. Харків, 61022, Україна); [3]Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна (площа Свободи, 4, м. Харків, 61022, Україна)

КОМПЛЕКСНА ДІЯ СВІТЛОДІОДНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ТА АНТИСЕПТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ, ЩО МІСТЯТЬ ДИНАТРІЮ ЕДЕТАТ, НА ДОБОВІ БІОПЛІВКИ КЛІНІЧНИХ ШТАМІВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Резюме. *Останнім часом відзначається збільшення кількості випадків локалізованих гнійно-запальних процесів, що викликанні грамнегативними бактеріями, і серед збудників значну роль відіграє Pseudomonas aeruginosa. Набута стійкість клінічних штамів мікроорганізмів до існуючих лікарських засобів пов'язана зокрема із утворенням біоплівок. Метою даного дослідження є вивчення впливу світлодіодного випромінювання та антисептичних препаратів, що містять динатрію едетат, на добові біоплівки P.aeruginosa. Проведено вивчення дії світлодіодного випромінювання різних довжин хвилі та антисептичних препаратів, що містять динатрію едетат, на ізоляти P.aeruginosa. Встановлено, що під впливом світлодіодного випромінювання червоного, помаранчевого та зеленого спектрів на добові біоплівки ізолятів P.aeruginosa спостерігається підвищення показника їх оптичної щільності та активація продукції планктонних клітин. Під впливом синього та фіолетового спектрів світлодіодного випромінювання пригнічується як біоплівкоутворення, так і продукція планктонних клітин P. aeruginosa. Доведено, що світлодіодне випромінювання усіх спектрів, що були досліджені, сприяє посиленню чутливості полірезистентних клінічних штамів P. aeruginosa до катіонних антисептиків, що містять динатрію едетат.*
Ключові слова: *біоплівки, Pseudomonas aeruginosa, світлодіодне випромінювання, антисептичні препарати, що містять динатрію едетат.*

Вступ

Останнім часом відзначається збільшення кількості локалізованих гнійно-запальних процесів, що викликанні грамнегативними бактеріями, і серед збудників значну роль відіграє *Pseudomonas aeruginosa* [2, 13]. Для лікування гнійно-запальних процесів застосовується комплекс лікувальних заходів, спрямований на пригнічення патогенних мікроорганізмів, стимуляцію репаративних процесів, поліпшення кровообігу, тощо. У свою чергу, антибактеріальні засоби, які широко використовуються, значно пригнічують імунні механізми захисту макроорганізму, стимулюють активацію механізмів адаптації мікроорганізмів та, як наслідок, появу полірезистентних нозокоміальних штамів. Набута лікарська стійкість клінічних штамів мікроорганізмів обумовлена, з одного боку, придбанням нової генетичної інформації чи то зміною рівня експресії власних генів, а з другого - пов'язана з утворенням біоплівок [1, 15]. В даний час є доведеним той факт, що для бактерій базовим станом існування є форма біоплівки, а планктонна форма розглядається як форма, що забезпечує переміщення мікробної клітини від місця локалізації первинної біоплівки до іншої поверхні, на якій в подальшому формується нова (вторинна) біоплівка [4, 7]. Незважаючи на активні наукові розробки схем протимікробної терапії гнійно-запальних захворювань проблема боротьби з бактеріальними біоплівками залишається актуальною. Багатьма науковцями в усьому світі проводяться дослідження щодо вивчення механізму формування біоплівок [6, 10, 14] та пошуку засобів які зможуть попереджати формування біоплівки та пригнічувати утворення планктонних клітин.

В клінічній та експериментальній практиці встановлена перспективність використання світлодіодного випромінювання для попередження та лікування багатьох різноманітних захворювань [3, 5], зокрема гнійно-запальних.

Особливу цікавість представляє визначення здатності світлодіодного випромінювання та антисептичних препаратів дезорганізовувати добові біоплівки та пригнічувати продукцію планктонних клітин при локалізованих гнійно-некротичних процесах, обумовлених полірезистентними клінічними штамами *Pseudomonas aeruginosa*.

Тому *метою* даного дослідження є вивчення впливу світлодіодного випромінювання та антисептичних препаратів, що містять Динатрію едетат, на добові біоплівки *P.aeruginosa*.

Матеріали та методи

Здатність утворювати біоплівки визначали в полістиролових планшетах з попередньою синхронізацією періодичної культури штамів, що досліджувались. Синхронізація бактеріальної культури проводилася після встановлення кінетики росту асинхронної культури,

шляхом селекції за методом Мітчісона і Вінсента. Оптичну щільність біоплівок та планктонних клітин вимірювали на спектрофотометрі "Multiskan EX 355" довжина хвилі 540 нм, виражали в одиницях оптичної щільності (од.ощ.) [11]. Опромінення in vitro проводилось світлодіодними джерелами фотонної матриці апарата Коробова "Барва-Флекс" [8]. Дослідження проведені з антисептичними препаратами: 1 - 0,01% розчин декаметоксину, що містить 0,02% динатрію едетат (ЕДТА); 2 - 0,01% розчин мирамістину, що містить 0,02% ЕДТА; 3 - 0,01% розчин бензалконію хлориду, що містить 0,02% ЕДТА; 4 - 0,01% розчин цетилпиридинію хлориду, що містить 0,02% ЕДТА; та ізолятами P.aeruginosa, що виділені з венфлонів і дренажних конструкцій (n=10) та від хворих з локалізованими гнійно-запальними процесами (n = 10). При обробці результатів використовували статистичні програми "Statistica" и "Biostat" [9, 12].

Результати. Обговорення

В результаті проведеного дослідження встановлено, що після дії світлодіодного випромінювання червоного та помаранчевого спектрів спостерігається підвищення оптичної щільності біоплівки *P. aeruginosa* (3,98±0,23 од.ощ. та 3,47±0,28 од.ощ.), а після дії світлодіодного випромінювання зеленого спектру - тенденція до пригнічення формування біоплівки *P. aeruginosa* (2,14±0,22 од.ощ.) порівняно з контролем (2,81±0,46 од.ощ.). Щільність добової біоплівки *P. aeruginosa* після дії світлодіодного випромінювання фіолетового спектру знижується у 3,8 рази порівняно з оптичною щільністю біоплівки *P. aeruginosa* до опромінення (0,74±0,03 та 2,81±0,46 од.ощ. відповідно). Аналогічні дані здобуті при вивченні дії світлодіодного випромінювання синього спектру: зафіксовано зниження показника оптичної щільності у 3,3 рази порівняно з таким до опромінення (0,85±0,07 та 2,81±0,46 од.ощ. відповідно), що свідчить про порушення цілісності сформованих біоплівок ізолятів (табл. 1).

При комплексному застосуванні антисептичних препаратів, що містять ЕДТА, та світлодіодного випромінювання звертає на себе увагу той факт, що світлодіодне випромінювання усіх спектрів, що були досліджені, сприяють посиленню чутливості ізолятів *P. aeruginosa* до катіонних антисептиків. Під впливом світлодіодного випромінювання червоного спектру та розчину декаметоксину з ЕДТА щільність добової біоплівки знижується у 4,8 рази, під впливом помаранчевого світлодіоду та декаметоксину з ЕДТА - у 5,7 рази, під впливом зеленого світлодіоду та декаметоксину з ЕДТА - у 7,8 рази, під впливом синього світлодіоду та декаметоксину з ЕДТА - у 33 рази, а під впливом світлодіодного випромінювання фіолетового спектру та антисептиків щільність добової біоплівки знижується у середньому у 40 разів порівняно з контролем.

Оцінюючи здатність до проліферації нових планктонних клітин добовою біоплівкою *P. aeruginosa* після дії світлодіодного випромінювання встановлено (табл. 2), що світлодіодне випромінювання червоного, помаранчевого та зеленого спектрів має тенденцію до посилення продукції нових клітин *P.aeruginosa* (1,97±0,12 од.ощ.; 1,89±0,14 од.ощ. та 1,78±0,18 од.ощ. відповідно) порівняно з контролем (0,96±0,08 од.ощ.), а світлодіодне випромінювання синього та фіолетового спектрів сприяє пригніченню продукції планктонних клітин добовою біоплівкою *P. aeruginosa* у 1,7 та 2,2 рази відповідно (0,55±0,03 од.ощ. та 0,43±0,04 од.ощ.).

Дослідження комплексного застосування світлодіодного випромінювання та антисептиків, що містять динатрію едетат, дозволило визначити, що продукція планктонних клітин *P. aeruginosa* добовою біоплівкою значно пригнічується за дії світлодіодного випромінювання синього та фіолетового спектрів (в середньому у 10 рази порівняно з дією тільки антисептику без світлодіодного випромінювання та в середньому у 28 рази порівняно з контрольними значеннями без застосування антисептику).

Результати дослідження здатності планктонних клітин *P. aeruginosa* формувати вторинні біоплівки після

Таблиця 1. Оптична щільність добових біоплівок P. aeruginosa за дії антисептичних препаратів та світлодіодного випромінювання.

СДВ	К (без антисептиків)	антисептичні препарати			
		декаметоксин з ЕДТА	мірамістин з ЕДТА	бензалконію хлорид з ЕДТА	цетилпиридинію хлорид з ЕДТА
К (без СДВ)	2,81±0,46	1,52±0,16	1,89±0,14	1,74±0,16	1,36±0,18
ЧСД	3,98±0,23	0,318±0,029	0,369±0,04	0,334±0,05	0,298±0,09
ПСД	3,47±0,28	0,269±0,021	0,289±0,03	0,283±0,08	0,254±0,06
ЗСД	2,14±0,22	0,196±0,09	0,255±0,04	0,241±0,06	0,189±0,04
ССД	0,85±0,07	0,046±0,003	0,054±0,006	0,048±0,008	0,042±0,005
ФСД	0,74±0,03	0,038±0,004	0,046±0,005	0,042±0,009	0,036±0,004

Примітка. СДВ - світлодіодне випромінювання; ЧСД - червоний спектр світлодіодного випромінювання; ПСД - помаранчевий спектр світлодіодного випромінювання; ЗСД - зелений спектр світлодіодного випромінювання; ССД - синій спектр світлодіодного випромінювання ФСД - фіолетовий спектр світлодіодного випромінювання.

Таблиця 2. Оптична щільність планктонних клітин, утворених після дії досліджуваних препаратів та світлодіодного випромінювання на первинні біоплівки *P. aeruginosa.*

СДВ	К (без антисептиків)	антисептичні препарати			
		декаметоксин з ЕДТА	мірамістин з ЕДТА	бензалконію хлорид з ЕДТА	цетилпиридинію хлорид з ЕДТА
К (без СДВ)	0,96±0,08	0,381±0,036	0,494±0,038	0,458±0,042	0,379±0,028
ЧСД	1,97±0,12	0,167±0,018	0,195±0,016	0,184±0,014	0,162±0,016
ПСД	1,89±0,14	0,161±0,014	0,188±0,014	0,173±0,018	0,158±0,019
ЗСД	1,78±0,18	0,149±0,012	0,157±0,018	0,154±0,016	0,146±0,012
ССД	0,55±0,03	0,044±0,006	0,049±0,008	0,046±0,004	0,041±0,003
ФСД	0,43±0,04	0,036±0,004	0,042±0,009	0,039±0,008	0,034±0,009

Таблиця 3. Оптична щільність вторинних біоплівок, утворених планктонними клітинами, після дії досліджуваних препаратів та світлодіодного випромінювання на первинні біоплівки *P. aeruginosa*.

СДВ	К (без антисептиків)	антисептичні препарати			
		декаметоксин з ЕДТА	мірамістин з ЕДТА	бензалконію хлорид з ЕДТА	цетилпиридинію хлорид з ЕДТА
К (без СДВ)	2,98±0,16	1,69±0,18	0,198±0,016	0,176±0,015	0,158±0,019
ЧСД	3,89±0,29	0,068±0,008	0,089±0,009	0,071±0,003	0,064±0,008
ПСД	3,82±0,24	0,062±0,004	0,084±0,006	0,067±0,009	0,059±0,006
ЗСД	2,63±1,91	0,059±0,006	0,073±0,002	0,062±0,006	0,053±0,005
ССД	0,89±0,06	0,036±0,003	0,041±0,008	0,037±0,007	0,034±0,002
ФСД	0,68±0,09	0,034±0,008	0,038±0,004	0,035±0,006	0,033±0,009

дії світлодіодного випромінювання на добову біоплівку показали, що тільки світлодіодне випромінювання синього та фіолетового спектрів пригнічує здатність планктонних клітин *P. aeruginosa* формувати щільні вторинні біоплівки (0,68±0,09 та 0,89±0,06 од.ощ. відповідно) порівняно з контролем (без опромінення - 2,98±0,16 од.ощ.), що є дуже важливим фактом запобігання колонізації P.aeruginosa (табл. 3).

Після дослідження результатів застосування антисептиків та світлодіодного випромінювання встановлено, що самими ефективними комбінаціями є комплексне поєднання синього або фіолетового світлодіодів разом з декаметоксином, що містить динатрію едетат (0,036±0,003 од.ощ. та 0,034±0,008 од.ощ.) та цетилпиридинієм хлоридом, що містить динатрію едетат (0,034±0,002 од.ощ. та 0,033±0,009 од.ощ.) порівняно з контролем (щільність вторинної біоплівки *P. aeruginosa* без впливу СДВ і антисептичних препаратів 2,98±0,16 од.ощ.), тобто формування планктонними клітинами *P. aeruginosa* вторинної біоплівки пригнічується у 90 разів. При застосуванні бензалконію хлориду, що містить динатрію едетат, і світлодіодного випромінювання синього або фіолетового спектрів відбувається пригнічення формування вторинної біоплівки P. aeruginosa у 85 рази (0,037±0,007 од.ощ. та 0,035±0,006 од.ощ. відповідно) порівняно з контролем.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Встановлено, що під впливом світлодіодного випромінювання червоного, помаранчевого та зеленого спектрів на добові біоплівки ізолятів *P. aeruginosa* спостерігається тенденція до підвищення їх щільності та активація продукції планктонних клітин. Під впливом синього та фіолетового спектрів світлодіодного випромінювання пригнічується як біоплівкоутворення, так і продукція планктонних клітин *P.aeruginosa*.

2. Світлодіодне випромінювання усіх спектрів, що були досліджені, сприяє посиленню чутливості полірезистентних клінічних штамів *P.aeruginosa* до катіонних антисептиків.

3. На підставі проведеного дослідження можна запропонувати застосування світлодіодного випромінювання синього та фіолетового спектрів у складі комплексної протимікробної терапії локалізованих гнійно-запальних процесів з метою попередження генералізації та запобігання розвитку нозокоміальних інфекцій.

Перспективи подальших розробок в даному напрямку полягають у проведенні експериментальних досліджень впливу світлодіодного випромінювання та протимікробних препаратів на добові біоплівки мікроорганізмів з подальшою розробкою схем комплексної терапії гнійно-запальних процесів.

Список літератури

1. Антибиотикорезистентность биопленочных бактрий /И.В.Чеботарь, А.Н.Маянский, Е.Д.Кончакова [и др.] //Клин. микробиол. и антимикробная химиотерапия.- 2012.- №14(1).- С.51-58.

2. Афиногенова А.Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса /А.Г-.Афиногенова, Е.Н.Даровская // Травматол. и ортопедия.- 2011.- №3(61).- С.119-125.
3. Буравский А.В. Светодиодное излучение: результаты антимикробного фотодинамического воздействия в эксперименте *in vitro* /А.В.Буравский, Е.В. Баранов, Г.А. Скороход // Новые технологии в медицине.- 2014.- №4.- С.80-86.
4. Винник Ю.С. Микробные биопленки в хирургии: механизмы образования, лекарственная устойчивость, пути решения проблемы /Ю.С.Винник, Перьянова, Е.В.Онзуль, О.В.- Теплякова //Новости хирургии.- 2010.- Т.18, №6.- С.115-125.
5. Гейниц А.В. Фотодинамическая терапия. История создания метода и ее механизмы /А.В.Гейниц //Лазерная медицина.- 2007.- Т.11.- Вып.3.- С.42-46.
6. Голуб А.В. Бактериальные биопленки - новая цель терапии /А.В.Голуб //Клин. микробиол. и антимикробная химиотерапия.- 2012.- №14.- С.23-29.
7. 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.1445-1456.
8. Коробов А.М. Фототерапевтические аппараты Коробова серии "Барва" /А.М.Коробов, В.А.Коробов, Т.А.Лесная.- Харьков: ИПП "Контраст", 2006.- 176с.
9. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н.Лапач, А.В.Чубенко, П.Н.Бабич.- К.: МОРИОН, 2000.- 320с.
10. Мальцев С.В. Что такое биопленка? /С.В.Мальцев, Г.Ш.Мансурова // Природная медицина.- 2013.- №1(13).- С.86-90.
11. Пат. 47944 Україна, G09B 23/00. Спосіб відтворення біоплівок мікроорганізмів *in vitro* /Циганенко А.Я., Мішина М.М., Курбанов Р.А.; заявн. та патентовласник ХНМУ.- №u200910353; заявл. 12.10.09; опубл. 25.02.10, Бюл. №4.
12. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA /О.Ю.Реброва.- Москва: МедиаСфера, 2003.- 312с.
13. Sauer K. Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm /K.Sauer //J. Bacteriol.- 2002.- Vol.11.- P.1140-1154.
14. Stoodley P. Biofilms as complex differentiated communities /P.Stoodley //Ann. Rev. Microbiol.- 2002.- Vol.56.- P.187-209.
15. Toole G.A. Biofilm formation as microbial development /G.A.Toole, H.Kaplan, R.Kolter //Ann. Rev. Microbiol.- 2000.- Vol.54.- P.49-79.

Попов Н.Н., Мишина М.М., Маланчук С.Г., Козлов А.П.

КОМПЛЕКСНОЕ ДЕЙСТВИЕ СВЕТОДИОДНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И АНТИСЕПТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ ДИНАТРИЯ ЭДЕТАТ, НА СУТОЧНЫЕ БИОПЛЕНКИ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Резюме. *В последнее время отмечается увеличение количества случаев локализованных гнойно-воспалительных процессов, вызванных грамотрицательными бактериями, и среди возбудителей значительную роль играет Pseudomonas aeruginosa. Приобретенная устойчивость клинических штаммов микроорганизмов к существующим лекарственным средствам связана, в том числе, и с образованием биопленок. Целью данного исследования является изучение влияния светодиодного излучения и антисептических препаратов, содержащих динатрия эдетат, на суточные биопленки P.aeruginosa. Проведено изучение действия светодиодного излучения различных длин волны и антисептических препаратов, содержащих динатрия эдетат, на изоляты P.aeruginosa. Установлено, что под влиянием светодиодного излучения красного, оранжевого и зеленого спектров на суточные биопленки изолятов P.aeruginosa наблюдается увеличение показателя их оптической плотности и активация продукции планктонных клеток. Под влиянием синего и фиолетового спектров светодиодного излучения подавляется как биопленкообразование, так и продукция планктонных клеток P. aeruginosa. Доказано, что светодиодное излучение всех спектров, которые были исследованы, способствует усилению чувствительности полирезистентных клинических штаммов P. aeruginosa к катионным антисептикам, содержащим динатрия эдетат.*

Ключевые слова: *биопленки, Pseudomonas aeruginosa, светодиодное излучение, антисептические препараты, содержащие динатрия эдетат.*

Popov M.M., Mishina M.M., Malanchuck S.G., Kozlov O.P.

COMPLEX ACTIVITY OF LED EMISSION WITH ANTISEPTIC PREPARATIONS CONTAINING DISODIUM EDETATE, ON DAILY BIOFILMS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLINICAL STRAINS

Summary. *The increase of localized purulent-inflammatory processes caused by gram-negative bacteria is marked lately and Pseudomonas aeruginosa plays an essential role among agents. Acquired resistance of clinical strains to existing drugs particularly associated with the formation of biofilms. The goal of the given investigation is the study of the effect of LED emission with antiseptic preparations containing disodium edetate, on daily biofilms of P.aeruginosa. The study of action LED emission of different wavelengths and antiseptic preparations containing disodium edetate on isolates P.aeruginosa. It was found that under the influence of LED emission of red, orange and green spectra on biofilms of P.aeruginosa isolates observed increase in the optical density and the activation of planktonic cells production. Under the influence of the blue and violet LED emission spectrum is suppressed as biofilm formation, as production of planktonic P.aeruginosa cells. It is proved that all LED emission spectra that were investigated, enhances the sensitivity of multi-drug resistant clinical strains of P. aeruginosa to the cationic antiseptics containing disodium edetate.*

Key words: *biofilms, Pseudomonas aeruginosa, LED emission, antiseptic preparations, containing disodium edetate.*

Рецензент - д.мед.н., проф. Палій Г.К.

Стаття надійшла до редакції 19.11.2015 р.

Попов Микола Миколайович - д.мед.н., професор, директор Інституту мікробіології та імунології імені І.І.. Мечникова; imidir@ukr.net

Мішина Марина Митрофанівна - д.мед.н., професор кафедри мікробіології, вірусології та імунології Харківського національного медичного університету; mishina1969@mail.ru

Маланчук Світлана Генадіївна - к.біол.н., асистент кафедри загальної та клінічної імунології та алергології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна; svetlanagen@ukr.net
Козлов Олександр Петрович - к.мед.н., доцент кафедри загальної та клінічної імунології та алергології Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна; kozlov@karazin.ua