

УДК 579.842.11:579.861.

## ДІЯ АНТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ І СВІТЛОДІОДНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ДОБОВІ БІОПЛІВКИ *S. AUREUS* ТА *E. COLI*

**М.М.Попов, А.М.Коробов, С.Г.Маланчук, Н.І.Філімонова\*, М.М.Мішина\*\*, Ю.М.Мішин\*\***

Харківський національний університет ім. В.Н.Каразіна  
Національний фармацевтичний університет\*  
Харківський національний медичний університет\*\*

*Ключові слова:* антибактеріальні препарати; світлодіодне випромінювання; біоплівки; *S. aureus*; *E. coli*

### THE ACTION OF ANTIMICROBIAL AGENTS AND THE LED RADIATION ON DAILY BIOFILMS OF *S. AUREUS* AND *E. COLI*

**М.М.Попов, А.М.Коробов, С.Г.Маланчук, Н.І.Філімонова\*, М.М.Мішина\*\*, Ю.М.Мішин\*\***

*Kharkiv National University named after V.N. Karazin, National University of Pharmacy\*, Kharkiv National Medical University\*\**

*Key words:* antibiotics; LED radiation; biofilm; *S. aureus*; *E. coli*

*Estimating the results of the antimicrobial action and the LED radiation on diurnal S. aureus and E. coli biofilms it has been found that under the complex effects using optical emission of the orange spectrum and  $\beta$ -lactam antimicrobial drugs the density of biofilms was 1.5 times higher than the control values; under the action of the drug from the group of fluoroquinolones levofloxacin and the orange LED emission spectrum the density of daily S. aureus biofilm was 42.8 times reduced, and E. coli decreased by 18.9 times compared to the control. When determining the impact of the green radiation spectrum together with  $\beta$ -lactam antimicrobial drugs on daily biofilms of multiresistant strains there is inhibition of the density of isolates biofilm of both S. aureus and E. coli compared to the control. In a complex application of levofloxacin and the green LED emission spectrum the destruction of daily biofilms of multiresistant isolates of S. aureus by 2.4 times and E. coli by 3.1 times has been determined compared to the control. The similar results have been reported in determining the ability of irradiated planktonic cells to form the secondary biofilms: the lowest density of the secondary biofilm is registered in application of the optical radiation of the violet spectrum in combination with levofloxacin: the density of the secondary S. aureus biofilm reduced by 52.4, and the density of the E. coli biofilm reduced by 39.3 times compared to the control. As a result of this study the possibility of using the incoherent optical radiation of the violet spectrum with levofloxacin, which is a photosensitizer and contributes to decrease in the proliferative activity and the ability to form biofilms of multiresistant isolates of S. aureus and E. coli and increase their antibiotics resistance, in the treatment of inflammatory processes has been substantiated.*

В останні роки в структурі гнійно-запальних захворювань безперервно зростає відсоток інфекцій, зумовлених полірезистентними мікроорганізмами, зокрема *S. aureus* та *E. coli* [9, 10]. Резистентність мікроорганізмів до багатьох антимікробних препаратів на сьогоднішній день є актуальною проблемою. У літературі описані випадки вилу-

чення полірезистентних ізолятів *S. aureus* та *E. coli* як результат при неефективності антимікробних препаратів з призначенням більш агресивної антибактеріальної терапії [1]. Встановлено, що *S. aureus* та *E. coli* часто виявляються на катетерах, суглобових імплантатах, венфлонах і утворюють щільні біоплівки [6, 11]. Поширення стійких до лікарських препаратів

форм патогенних бактерій, що знижує ефективність традиційних антимікробних засобів, які застосовуються у стаціонарах, і необхідність розробки способів пригнічення формування бактеріями біоплівки ставлять питання про нові стратегії для боротьби з гнійно-запальними захворюваннями та про розробку нових підходів до створення схем комплексної терапії, що впливають на специфічні біохімічні та біофізичні системи мікроорганізмів.

### Матеріали та методи

Предметом дослідження були антибактеріальні препарати: амокциклав, левофлоксацин і цефтриаксон та ізоляти *S. aure-*

**М.М.Попов** – доктор мед. наук, професор, директор ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова Національної академії медичних наук України», завідувач кафедри загальної та клінічної імунології та алергології Харківського національного університету ім. В.Н.Каразіна

**Н.І.Філімонова** – доктор мед. наук, професор, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

**М.М.Мішина** – доктор мед. наук, професор кафедри мікробіології, вірусології та імунології Харківського національного медичного університету

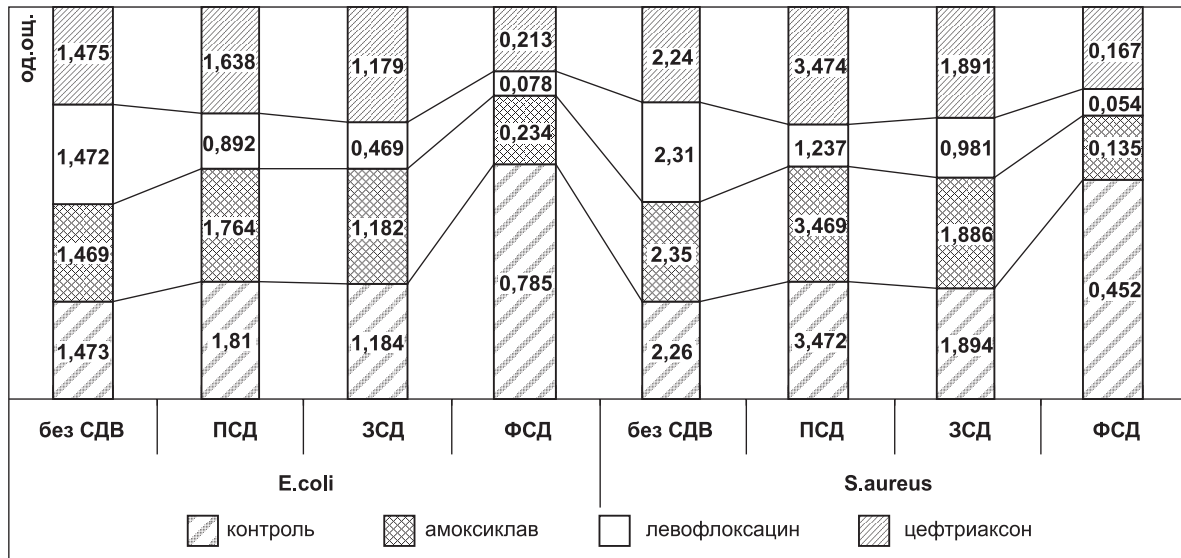


Рис. 1. Дія дослідних препаратів і оптичного випромінювання на добові біоплівки полірезистентних ізолятів *S. aureus* і *E. coli*

ус й *E. coli*, вилучені з венфлонів і дренажних конструкцій та від хворих з гнійно-запальними процесами [5]. Ферментативну ідентифікацію проводили за допомогою ідентифікаційних наборів МІКРО-ЛА-ТЕСТ®. Чутливість ізолятів до антимікробних засобів з різним механізмом дії на мікробну клітину вивчали за допомогою мікротестсистеми з напівкількісною реєстрацією результатів «ТНКтестГр». Синхронізація періодичної культури шляхом селекції (метод Мітчсона і Вінсента). Синхронізація періодичних культур досліджуваних штамів проводилася після встановлення кінетики росту асинхронної культури. Встановлювався режим періодичного культивування таким чином, щоб протягом експоненціального росту клітинна маса збільшувалась в об'ємі 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 згідно з інструкцією до приладу з додаванням дослідних антибактеріальних препаратів та поживного середовища. Вимірювання оптичної щільності

біоплівки *S. aureus* і *E. coli* проводили після добової інкубації при  $t=37^{\circ}\text{C}$  та за порівнянням оптичної щільності дослідних і контрольних сформованих біоплівок і робили висновок про ступінь формування біоплівок. Планктонні клітини, що були вилучені з добових біоплівок, 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. ош.) біоплівкоутворення мікроорганізмами [8].

Опромінення *in vitro* проводилось світлодіодними джерелами помаранчевого (590-600 нм), зеленого (490-570 нм) і фіолетового (380-430 нм) випромінювання фотонної матриці апарату Коровова «Барва-Флекс» [2], що містить світлодіодну матрицю з суперлюмінісцентними світлодіодами (24 шт.) і блок живлення.

Для статистичної обробки результатів використовували про-

граму Excel для персонального комп'ютера і Biostat [4, 7].

### Результати та їх обговорення

Оцінюючи результати визначення дії антимікробних препаратів і світлодіодного випромінювання на добові біоплівки *S. aureus* і *E. coli* було встановлено (рис. 1), що під комплексним впливом із застосуванням оптичного випромінювання помаранчевого спектра та  $\beta$ -лактамних антимікробних препаратів щільність біоплівок була у 1,5 рази вище за контрольні значення і складала: при застосуванні амоксицилаву в ізолятив *S. aureus* –  $3,469 \pm 0,06$  од. ош. та  $2,35 \pm 0,08$  од. ош.; у 1,2 рази в ізолятив *E. coli* –  $1,764 \pm 0,09$  од. ош. та  $1,469 \pm 0,05$  од. ош.; при застосуванні цефтриаксону – в ізолятив *S. aureus*:  $3,474 \pm 0,03$  од. ош. та  $2,24 \pm 0,06$  од. ош. та *E. coli* –  $1,638 \pm 0,09$  од. ош. та  $1,475 \pm 0,05$  од. ош. При комплексному застосуванні препарату з групи фторохінолонів левофлоксацину і світлодіодного випромінювання помаранчевого спектра спостерігалось зниження щільності добової біоплівки *S. aureus* у 42,8 рази ( $0,054 \pm 0,09$  од. ош. та  $2,31 \pm 0,07$  од. ош.) і *E. coli* – у 18,9 рази ( $0,078 \pm 0,08$  од. ош.

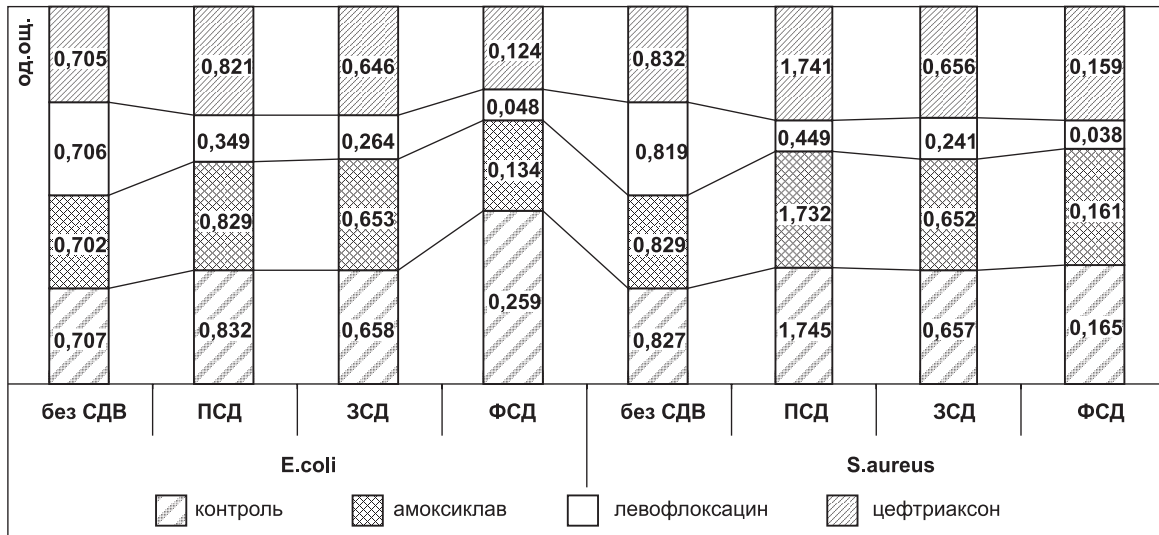


Рис. 2. Продукція планктонних клітин добовими біоплівками полірезистентних ізолятів *S. aureus* і *E. coli* після дії на них дослідних препаратів і оптичного випромінювання

та  $1,472 \pm 0,06$  од. оц. відповідно) порівняно з контролем.

При визначенні впливу низькоінтенсивного некогерентного випромінювання зеленого спектра разом з  $\beta$ -лактаміними антимікробними препаратами на добові біоплівки полірезистентних штамів спостерігається тенденція до пригнічення щільності біоплівки ізоляту як *S. aureus* (амоксиклав –  $1,886 \pm 0,09$  од. оц. та  $2,35 \pm 0,08$  од. оц.; цефтриаксон –  $1,891 \pm 0,05$  од. оц. та  $2,24 \pm 0,06$  од. оц.), так і *E. coli* (амоксиклав –  $1,182 \pm 0,09$  од. оц. та  $1,469 \pm 0,05$  од. оц.; цефтриаксон –  $1,179 \pm 0,04$  од. оц. та  $1,475 \pm 0,05$  од. оц.) порівняно з контролем. А при комплексному застосуванні левофлоксацину і світлодіодного випромінювання зеленого спектра встановлено руйнування добових біоплівок полірезистентних ізолятів *S. aureus* у 2,4 рази ( $0,981 \pm 0,02$  од. оц. та  $2,31 \pm 0,07$  од. оц.), а *E. coli* у 3,1 рази ( $0,469 \pm 0,08$  од. оц. та  $1,472 \pm 0,06$  од. оц. відповідно) порівняно з контролем.

Застосування антимікробних препаратів і світлодіодного випромінювання фіолетового спектра привело до зниження щільності добових біоплівок *S. aureus*: у 17,4 рази при застосуванні амоксиклаву ( $0,135 \pm 0,08$  од. оц. та  $2,35 \pm 0,08$  од. оц.),

у 13,4 рази при застосуванні цефтриаксону ( $0,167 \pm 0,07$  од. оц. та  $2,24 \pm 0,06$  од. оц.) та у 42,8 рази в комплексі з левофлоксацином ( $0,054 \pm 0,009$  од. оц. та  $2,31 \pm 0,07$  од. оц. відповідно). Аналогічні результати одержані при дослідженні антимікробних препаратів і світлодіодного випромінювання фіолетового спектра на добові біоплівки полірезистентних ізолятів *E. coli*: у 6,3 рази при застосуванні амоксиклаву ( $0,234 \pm 0,03$  од. оц. та  $1,469 \pm 0,05$  од. оц.), у 7 разів при застосуванні цефтриаксону ( $0,213 \pm 0,06$  од. оц. та  $1,475 \pm 0,05$  од. оц. відповідно) та у 18,9 рази в комплексі з левофлоксацином ( $0,078 \pm 0,009$  од. оц. та  $1,472 \pm 0,06$  од. оц. відповідно) порівняно з контролем.

При визначенні здатності добових біоплівок полірезистентних штамів *S. aureus* і *E. coli* після дії світлодіодного випромінювання та  $\beta$ -лактаміних антимікробних препаратів продукувати планктонні клітини встановлено, що при дії помаранчевого спектра спостерігається підвищення проліферативної активності ізолятами *S. aureus* у 2,1 рази порівняно з контролем (при застосуванні амоксиклаву –  $1,732 \pm 0,09$  од. оц. і  $0,829 \pm 0,08$  од. оц. та при застосуванні цефтриаксону –  $1,741 \pm$

$\pm 0,06$  од. оц. і  $0,832 \pm 0,09$  од. оц. відповідно) та спостерігається тенденція до проліферації планктонних клітин полірезистентних штамів *E. coli* (при застосуванні амоксиклаву –  $0,829 \pm 0,02$  од. оц. і  $0,707 \pm 0,05$  од. оц. та при застосуванні цефтриаксону –  $0,821 \pm 0,04$  од. оц. і  $0,705 \pm 0,09$  од. оц. відповідно) (рис. 2).

При комплексному застосуванні препарату з групи фторхінолонів левофлоксацину і світлодіодного випромінювання помаранчевого спектра встановлено пригнічення продукції планктонних клітин *S. aureus* у 1,8 рази  $0,449 \pm 0,08$  од. оц. та  $0,819 \pm 0,04$  од. оц., а *E. coli* – у 2 рази:  $0,349 \pm 0,03$  од. оц. та  $0,706 \pm 0,07$  од. оц. відповідно. При застосуванні світлодіодного випромінювання фіолетового спектра та левофлоксацину пригнічення продукції планктонних клітин добовими біоплівками *E. coli* – 14,7 рази ( $0,048 \pm 0,06$  од. оц. та  $0,706 \pm 0,07$  од. оц. відповідно) та *S. aureus* – 21,6 рази ( $0,038 \pm 0,02$  од. оц. та  $0,819 \pm 0,04$  од. оц.) порівняно з контролем.

Аналогічні результати були зафіксовані при визначенні здатності планктонних клітин опроміненими добовими біоплівками з інокульованими антимікробними препаратами: найменша щільність вторинної біоплів-

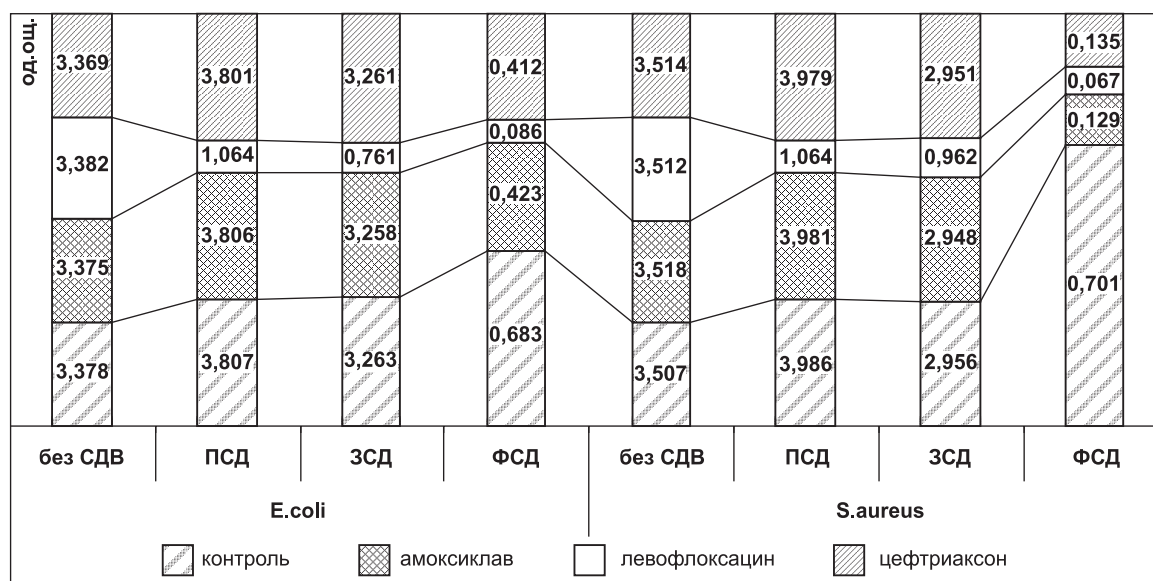


Рис. 3. Утворення вторинних біоплівки планктонними клітинами *S. aureus* і *E. coli* після дії дослідних препаратів і оптичного випромінювання на добову біоплівку полірезистентних ізолятів

ки зареєстрована при застосуванні оптичного випромінювання фіолетового спектра комплексно з левофлоксацином: щільність вторинної біоплівки *S. aureus* знижена у 52,4 рази ( $0,067 \pm 0,04$  од. оц. та  $3,512 \pm 0,08$  од. оц.) і у 39,3 рази – знижена щільність вторинної біоплівки *E. coli* ( $0,086 \pm 0,05$  од. оц. та  $3,382 \pm 0,09$  од. оц. відповідно) порівняно з контролем (рис. 3).

Таким чином, у результаті даного дослідження обґрунтовано можливість застосування у комплексній терапії гнійно-запальних процесів низько-

інтенсивного некогерентного оптичного випромінювання фіолетового спектра з левофлоксацином, який є фотосенсибілізатором [3], що сприяє пригніченню проліферативної активності і здатності до формування біоплівки полірезистентних ізолятів *S. aureus* та *E. coli* та підвищенню їх антибіотичної чутливості. Отже, найважливішою фенотипічною властивістю ізолятів, що забезпечує в сучасних умовах виживаність бактерій у стаціонарі, а також в організмі пацієнта при існуванні інфекційного процесу, є

біоплівка. В біоплівці у мікроорганізмів підвищена стійкість до антибіотиків, антисептиків, дезінфектантів, що створює труднощі в лікуванні і збільшує частоту виникнення внутрішньолікарняних інфекцій. У зв'язку з цим використання світлодіодного випромінювання фіолетового спектра з антимікробним препаратом левофлоксацином сприяє руйнуванню вже сформованих добових біоплівки і запобігає формуванню нових біоплівки та, як наслідок, антибіотикорезистентних штамів.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Іваниця В.О., Галкін М.Б. // Мікробіол. і біотехнол. – 2011. – №2. – С. 8-22.
2. Коробов А.М., Коробов В.А., Лесная Т.А. Фототерапевтические аппараты Коробова серии «Барва». – Х.: ИПП «Контраст», 2008. – 176 с.
3. Курочкина А.Ю., Плавский В.Ю., Юдина Н.А. Классификации фотосенсибилизаторов антимикробной фотодинамической терапии / Белорусская медицинская академия последипломного образования, Институт физики НАН Беларуси [Электронный ресурс]: режим доступа до журналу <http://www.bsmu.by>.
4. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: МОРИОН, 2000. – 320 с.
5. Методические указания по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинико-диагностических лабораториях / Прилож. 1 к Приказу Министерства здравоохранения СССР №535 от 22 апреля 1985 г. – 123 с.
6. Мирошниченко И.И., Зачиняев Я.В., Зачиняева А.В. // Иммунопатол., алергол., инфектол. – 2009. – №1. – С. 27.
7. Осипов В.П., Лукьянова Е.М., Антипкин Ю.Г. и др. Методика статистической обработки медицинской информации в научных исследованиях. – К.: Планета людей, 2002. – 200 с.

8. Пат. на корисну модель 47944 Україна, МПК G 09 B 23/00. Спосіб відтворення біоплівки мікроорганізмів *in vitro* / А.Я.Циганенко, М.М.Мишина, Р.А. Курбанов (UA); Харк. націон. мед. ун-т. – № u200910353; Заявл.: 12.10.2009. Опубл.: 25.02.2010. – Бюл. №4.
9. Фадеев С.Б., Чевычалова Е.В., Сгибнев А.В., Бадьянова Е.В. Видовое разнообразие возбудителей хирургической инфекции мягких тканей, вызванной микробными ассоциациями // Сб. тр. V науч.-практ. конф. врачей Приволжско-Уральского Военного округа. – Оренбург, 2004. – С. 326-327.
10. Фадеев С.Б., Тарасенко В.С., Стадников Б.А., Казеннов А.Н. Изменение видового состава возбудителей хирургической инфекции мягких тканей // Тезисы 11-й науч. конф. Европейского общества химиотерапии инфекционных заболеваний и 6-й Рос. конф. «Современные проблемы антибактериальной терапии». – М., 2004. – С. 30.
11. Brinkmann V., Laube Br., Abed U. et al. // J. of Visualized Experiments. – 2010. – Vol. 36. – P. 1724.
12. Rešliński A., Mikucka A., Szmytkowski J. // Pol. J. Microbiol. – 2009. – №58 (4). – P. 367-369.
13. Stewart P.S. Antibiotic tolerance in biofilms and its role in persistent infections / In: 11-th Intern. Congr. on infectious dis. Cancun, Mexico. – 2004. Abstr. №56.002.
14. Weigel L.M. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2007. – Vol. 51, №1. – P. 231-238.
15. Wolcott R.D. // J. Wound Care. – 2010. – Vol. 19, №2. – P. 45-50, 52-53.

#### **ДІЯ АНТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ І СВІТЛОДІОДНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ДОБОВІ БІОПЛІВКИ S. AUREUS І E. COLI**

**М.М.Попов, А.М.Коробов, С.Г.Маланчук, Н.І.Філімонова\*, М.М.Мишина\*\*, Ю.М.Мишин\*\***

**Харківський національний університет ім. В.Н.Каразіна, Національний фармацевтичний університет\*, Харківський національний медичний університет\*\***

**Ключові слова:** антибактеріальні препарати; світлодіодне випромінювання; біоплівки; *S. aureus*; *E. coli*

Оцінюючи результати щодо визначення дії антимікробних препаратів і світлодіодного випромінювання на добові біоплівки *S. aureus* і *E. coli* було встановлено, що під комплексним впливом із застосуванням оптичного випромінювання помаранчевого спектра та β-лактамних антимікробних препаратів щільність біоплівок була у 1,5 рази вища за контрольні значення, препарату з групи фторхінолонів левофлоксацину і світлодіодного випромінювання помаранчевого спектра зниження щільності добової біоплівки *S. aureus* у 42,8 рази а *E. coli* – у 18,9 рази порівняно з контролем. При визначенні впливу випромінювання зеленого спектра разом з β-лактамними антимікробними препаратами на добові біоплівки полірезистентних штамів спостерігається пригнічення щільності біоплівки ізолятів як *S. aureus*, так і *E. coli* порівняно з контролем. А при комплексному застосуванні левофлоксацину і світлодіодного випромінювання зеленого спектра встановлено руйнування добових біоплівок полірезистентних ізолятів *S. aureus* у 2,4 рази, а *E. coli* у 3,1 рази порівняно з контролем. Застосування антимікробних препаратів і світлодіодного випромінювання фіолетового спектра призвело до зниження щільності добових біоплівок *S. aureus* у 17,4 рази при застосуванні амоксицилаву, у 13,4 рази при застосуванні цефтриаксону та у 42,8 рази в комплексі з левофлоксацином. Аналогічні результати були зафіксовані при визначенні здатності опромінених планктонних клітин утворювати вторинні біоплівки: найменша щільність вторинної біоплівки зареєстрована при застосуванні оптичного випромінювання фіолетового спектра комплексно з левофлоксацином: щільність вторинної біоплівки *S. aureus* знизена у 52,4 та у 39,3 рази – знизена щільність вторинної біоплівки *E. coli* порівняно з контролем. У результаті цього дослідження обґрунтовано можливість застосування у комплексній терапії гнійно-запальних процесів низькоінтенсивного некогерентного оптичного випромінювання фіолетового спектра з левофлоксацином, який є фотосенсибілізатором та сприяє пригніченню проліферативної активності і здатності до формування біоплівок полірезистентних ізолятів *S. aureus* та *E. coli* і підвищенню їх антибіотикочутливості.

#### **ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ И СВЕТОДИОДНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СУТОЧНЫЕ БИОПЛЕНКИ S. AUREUS И E. COLI**

**М.М.Попов, А.М.Коробов, С.Г.Маланчук, Н.И.Филимонова\*, М.М.Мишина\*\*, Ю.М.Мишин\*\***

**Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина, Национальный фармацевтический университет\*, Харьковский национальный медицинский университет\*\***

**Ключевые слова:** антибактериальные препараты; светодиодное излучение; биопленки; *S. aureus*; *E. coli*

Оценивая результаты действия противомикробных препаратов и светодиодного излучения на суточные биопленки *S. aureus* и *E. coli*, было установлено, что под комплексным воздействием с применением оптического излучения оранжевого спектра и β-лактамных противомикробных препаратов плотность биопленок была в 1,5 раза выше контрольных значений, препарата из группы фторхинолонов левофлоксацина и светодиодного излучения оранжевого спектра наблюдалось снижение плотности суточной биопленки *S. aureus* в 42,8 раз; а *E. coli* – в 18,9 раз по сравнению с контролем. При определении влияния излучения зеленого спектра вместе с β-лактамными антимикробными препаратами на суточные биопленки полирезистентных штаммов наблюдается угнетение плотности биопленки изолятов как *S. aureus*, так и *E. coli* по сравнению с контролем. А при комплексном применении левофлоксацина и светодиодного излучения зеленого спектра установлено разрушение суточных биопленок полирезистентных изолятов *S. aureus* в 2,4 раз, а *E. coli* в 3,1 раз по срав-

*нению с контролем. Аналогичные результаты были зафиксированы при определении способности облученных планктонных клеток образовывать вторичные биопленки: наименьшая плотность вторичной биопленки зарегистрирована при применении оптического излучения фиолетового спектра комплексно с левофлоксацином: плотность вторичной биопленки *S.aureus* снижена в 52,4 и в 39,3 раза – снижена плотность вторичной биопленки *E.coli* сравнению с контролем. В результате данного исследования обоснована возможность применения в комплексной терапии гнойно-воспалительных процессов низкоинтенсивного некогерентного оптического излучения фиолетового спектра с левофлоксацином, который является фотосенсибилизатором и способствует подавлению пролиферативной активности и способности к формированию биопленок полирезистентных изолятов *S. aureus* и *E. coli* и повышению их антибиотикочувствительности.*

Адреса для листування:

61022, м. Харків, пр. Леніна, 4.

Тел. (57) 707-72-90. E-mail: mishina1969@mail.ru.

Харківський національний медичний університет

Надійшла до редакції 24.09.2014 р.