

УДК 579.61:616-035

УКПІ 86.90.15

№ держреєстрації 0118U003577

Інв. №

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
40007, м.Суми, вул. Р.Корсакова, буд. 2
e-mail:a.loboda@med.sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової

роботи д.ф.-м.н., професор

_____ А.М. Чорноус

ЗВІТ

**ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ
ЕФЕКТИВНІСТЬ ПРОТИМІКРОБНОЇ ДІЇ
НАНОКОМПЗИТНИХ КОМПЛЕКСІВ (ХІТОЗАН-НАНОМЕТАЛИ)
ВІДНОСНО ПОЛІРЕЗИСТЕНТНИХ КЛІНІЧНИХ ІЗОЛЯТІВ
(проміжний)**

Начальник НДЧ,

к. ф.-м. н., с.н.с

Керівник НДР,

д.мед.н., доцент

Д.І. Курбатов

А.М. Лобода

Суми – 2018

Рукопис закінчено 20 грудня 2018 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою, протокол №6 від 27.12.2018р.

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР,

директор МІ СумДУ

д.мед.н., доцент

(25.12.2018)

А.М. Лобода

(реферат, вступ,
висновки)

Відповідальний виконавець

Заступник директора МІ СумДУ

К.мед.н., доцент

(25.12.2018)

В.М. Голубнича

(реферат,
вступ, розділ 1, 2)

Науковий співробітник

К.мед.н. асистент

(25.12.2018)

В.В. Корнієнко

(розділ 1, 3)

Молодший науковий співробітник

Асистент

(25.12.2018)

Є.В. Гусак

(розділ 1)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 40 с. 6 табл., 5 рис., 40 джерел

АНТИБАКТЕРІАЛЬНА ДІЯ, ХІТОЗАН, НАНОМЕТАЛИ, АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ, КЛІНІЧНІ ІЗОЛЯТИ

Об'єкт дослідження – антибіотикорезистентність та антибактеріальні властивості.

Предмет дослідження – механізми антибактеріальної дії та ефективність нанокompatитних комплексів (хітозан-нанометали) відносно полірезистентних штамів мікроорганізмів.

Метою проекту є встановлення механізму дії та ефективності нанокompatитів складу «хітозан-нанометали» стосовно найрозповсюдженіших антибіотикорезистентних клінічних ізолятів.

Методи дослідження – в роботі використовувався мультидисциплінарний підхід із залученням класичних методик в галузі хімії, біоматеріалів, мікробіології та клінічної медицини.

Результати та їх новизна

Під час виконання НДР було вивчено особливості мікробіоти пацієнтів із патологією респіраторного тракту в різних типах стаціонарів. Виявлено, що особливості формування складу мікроорганізмів, виділених від пацієнтів, залежать від сезону, особливостей складу мікробіоти стаціонару, видового складу мікробіоти пацієнтів, які перебувають на лікуванні в цей час. Було з'ясовано основні тренди у розвитку антибіотикорезистентності у північно-східному регіоні України та встановлено основні антибактеріальні препарати, які доцільно використовувати для лікування гнійно-запальних процесів. Сформовано унікальну для регіону колекцію полірезистентних мікроорганізмів, які входять до складу групи «ESKAPE». Визначено чутливість полірезистентних штамів до нанометалів та хітозану.

ЗМІСТ

	С.
Скорочення та умовні позначки	5
Вступ.....	6
1 Сучасний стан проблеми антибіотикорезистентності.....	8
2 Об'єкти і методи дослідження проблеми антибіотикорезистентності	
2.1 Моніторинг антибіотикорезистентності серед мікроорганізмів ізольованих у північно-східному регіоні України.....	18
2.2 Синтез наночастинок срібла.....	19
2.3 Синтез наночастинок міді.....	19
2.4 Приготування хітозанового гелю.....	20
2.5 Оцінка антибактеріальної активності хітозанового гелю, наночастинок Ag, наночастинок Cu, та композитів Ag НЧ -хітозан, Cu НЧ – хітозан відносно полірезистентних штамів стафілококів.....	20
3 Характеристика об'єктів дослідження	
3.1 Особливості мікробіоти респіраторного тракту та її чутливість до антибіотиків.....	22
3.2 Характеристика НЧ Ag, НЧ Cu та хітозану, який було використано для приготування гелю <i>in situ</i>	28
3.3 Антибактеріальна активність НЧ Ag, НЧ Cu та хітозанових гелів.....	31
Висновки.....	35
Перелік джерел посилання.....	36

СКОРОЧЕННЯ ТА УМОВНІ ПОЗНАЧКИ

Cu-НЧ – наночастинки міді

MRSA – метицелін резистентний золотистий стафілокок

CLSI – інститут клініко-лабораторних стандартів

EUCAST – Європейське товариство клінічної мікробіології та інфекційних хвороб

НЧ – нано-частинки

МІК – мінімальна інгібуюча концентрація

ВСТУП

Незважаючи на значні досягнення у медицині, інфекційні захворювання залишаються однією з головних причин захворюваності та смертності у всьому світі [1]. Згідно зі статистичними звітами санітарно-епідеміологічної служби, протягом останніх 20 років спостереження, інфекційні хвороби щорічно вражали від 7 до 10 млн. мешканців України. Частка дитячих інфекцій у загальній структурі захворюваності має стійку тенденцію до зростання (від 49,1% в 1995р. до 65,4 % у 2013 р.) із суттєвим збільшенням кількості, як вірусних, так і бактеріальних інфекцій [2]. Єдиним варіантом етіотропної терапії, який дозволяє приборкати інфекційний процес, попередити розвиток ускладнень та сприяє швидкому покращенню стану пацієнтів [3] є використання антибіотиків. Відмічається, що їх використання за останнє десятиліття зросло у всьому світі на 40 % [4]. Однак, у своїй статті L. L. Founou [5] зазначив, що антибіотики стали «зникаючими видами», які знаходяться у небезпеці через швидке поширення антибіотикорезистентності у всьому світі [6]. Відомо, що гени відповідальні за формування резистентності, можуть потрапляти в бактеріальну популяцію від коменсалів (непатогенних представників) та від мікроорганізмів, що мешкають в навколишньому середовищі. Отже, для повного розуміння механізмів надбання та поширення антибіотикорезистентності серед патогенних для людини бактерій, необхідно ретельно вивчати всю мікробіоту [1]. Наукові досягнення останніх років суттєво поглибили знання про біологічні властивості збудників, їх генетичні характеристики, адаптивну мінливість, здатність до персистенції на біотичних та абіотичних об'єктах у складі біоплівки та створення асоціацій патогенних, умовно-патогенних бактерій з представниками нормофлори тощо [7]. Однак, проблеми діагностики і лікування гнійно-запальних захворювань залишаються актуальними та різноплановими.

Важливим кроком у профілактиці ускладнень та хронізації гнійно-запальних процесів є моніторинг видового складу та антибіотикорезистентності мікроорганізмів, які виділяються від хворих та з епідеміологічно значущих об'єктів внутрішнього середовища лікувальних закладів. Результати такого дослідження використовуються для корегування антимікробної терапії та призначення найбільш ефективних препаратів.

Іншим напрямком у боротьбі зі зростаючою полірезистентністю є пошук нових ефективних протимікробних препаратів, які володіють множинними механізмами дії. Останнім часом, пильна увага приділяється дослідженню нових матеріалів на основі наночастинок у якості потенційних антимікробних хіміопрепаратів [8].

З огляду на все перераховане, метою нашого дослідження було вивчити видовий склад мікроорганізмів, виділених від пацієнтів із запальними процесами різної локалізації, провести моніторинг чутливості виділених мікроорганізмів до найчастіше вживаних антибіотиків та вивчити чутливість виділених препаратів до композитів хітозан-нанометали.

1 СУЧАСНИЙ СТАН ПРОБЛЕМИ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ

Винахід антибіотиків вважають однією із найважливіших наукових подій за всю історію людства. Однак, пройшло менше ста років від того моменту, а цінність антибактеріальних препаратів значно знизилась. Основною причиною такого стану речей є поява антибіотико-резистентних мікроорганізмів. При важкому та середньо важкому перебігові інфекційних захворювань призначення антибіотикотерапії зазвичай проводиться емпірично, без урахування антибіотикочутливості етіологічних агентів. У цій ситуації широке розповсюдження стійкості до багатьох препаратів підвищує ймовірність неадекватної початкової антибактеріальної терапії, що значно знижує ефективність лікування [9].

Швидкість формування та поширення мікроорганізмів із множинною стійкістю до антибіотиків вражає. Зростання антибіотико-резистентності призводить до звуження переліку ефективних препаратів та збільшення смертності серед населення від інфекційних захворювань. Згідно даних британських дослідників [10], щороку через неефективність антибактеріальної терапії у Європі та США гине 50 тисяч хворих, а в світі ця цифра сягає близько 700 тисяч осіб. Автори проекту AMR Review припускають, що при збереженні наявних тенденцій до 2050 року смертність від інфекційних захворювань перевищуватиме аналогічні показники онкологічної патології та перевищуватимуть 10 млн смертей в рік [10].

Беручи до уваги важливість означеної проблеми для всього людства та розуміння необхідності активних дій спрямованих на подолання антибіотикорезистентності у широкого загалу, питання резистентності мікроорганізмів до антибіотиків входить до пріоритетних завдань багатьох міжнародних організацій.

Експерти вважають, що є два варіанти вирішення проблеми: інтенсифікація розробки нових препаратів із антимікробними властивостями та оптимізація заходів спрямованих на гальмування розповсюдження антибіотико-резистентності серед мікроорганізмів[11, 12].

З огляду на те, що розробка нових антибіотиків є економічно не вигідною, оскільки для отримання нового препарату необхідний тривалий час, інколи десятиліття, а поява резистентних штамів до нових препаратів, зазвичай, фіксується через 2-3 роки від моменту їх виходу на ринок, необхідно спрямовувати свій пошук у напрямку альтернативних антибіотикам препаратів з протимікробною активністю. Одним із яскравих прикладів цього є поява метицилін резистентних штамів стафілококів.

Метицилін– це антибіотик із групи пеніциліну. Перші штами MRSA було виділено в 1961 році, через рік після впровадження метициліну в клінічну практику. У 90-х роках минулого століття було зареєстровано епідемічне поширення штамів MRSA, які почали виділяти, як в межах, так і поза межами лікувальних закладів. 2000-і роки відзначаються появою позалікарняних штамів MRSA, які викликали інфекції шкіри та м'яких тканин [13].

Дані літератури щодо стану антибіотикорезистентності серед збудників респіраторних інфекцій у Європі відмічають прогресивне зростання кількості антибіотирезистентних представників у мікробіоті респіраторного тракту. У 2008 р стійкість *S.pneumoniae* до антибактеріальних препаратів коливалась від 25% у Болгарії і Польщі до 50% в Угорщині і перевищувала 50% у Румунії. [8]. У той же час масштабне дослідження чутливості пневмококів до антибіотиків, яке проводилось у 2014 - 2016 рр. в Україні, показало, що 97% штамів *S. pneumoniae* були чутливими до внутрішньовенного пеніциліну (згідно з контрольними точками CLSI), 83% – до перорального пеніциліну (відповідно до CLSI та EUCAST). Для порівняння: чутливість штамів *S. pneumoniae*, виділених у Словаччині, була значно нижчою в порівнянні з Україною [11].

Інший відомий респіраторний патоген (*H. Influenzae*), виділений в країнах Європи в період 2002—2008 рр., був чутливим до ампіциліну в межах від 11,8 до 45,5%. [8]. Дослідження чутливості *H. influenzae* до цефтриаксону, левофлоксацину та моксифлоксацину в Україні в 2014-2016 рр. показало 100% чутливості.

Дослідження чутливості до антибіотиків, ще одного збудника респіраторних інфекцій (*M. Catarrhalis*) показало, що більше 95% штамів були стійкими до ампіциліну [11].

В одній із вітчизняних робіт, яка присвячена дослідженню антибіотикорезистентності, зазначається, що штамів MRSA із рани не було виділено, та всі досліджувані мікроорганізми були чутливими до оксациліну та ванкоміцину. [12]. Автори також зазначають, що досліджувані представники родин Enterobacteriaceae (*E.coli*, *K.pneumoniae*, *Enterobacter spp.*) були чутливими до цефтриаксону, ципрофлоксацину, амікацину, фосфоміцину та меропінему, у той же час штами *P.aeruginosae* були резистентними до цефтриаксону, ципрофлоксацину, амоксициліну та амікацину.

Порівняльний аналіз результатів отриманих в Україні та уряді європейських країн підтверджує правильність думки про необхідність постійного моніторингу та публікації національних і регіональних даних щодо антибіотикорезистентності.

Іншим напрямком у подоланні антибіотикорезистентності є дослідження чутливості основних збудників до широко використовуваних антибіотиків. У кожному регіоні мікроорганізми мають свої специфічні профілі антибіотикорезистентності. Особливості профілів антибіотикорезистентності мікроорганізмів насамперед залежать від особливостей надання медичної допомоги та інших чинників не пов'язаних із системою охорони здоров'я. Одним із ключових питань є постійна мінливість чутливості мікроорганізмів, а тому моніторинг антибіотикорезистентності у кожному регіоні повинен

проводитись систематично, а інформація стосовно актуальної ефективності антибактеріальних препаратів оновлюватись.

Антимікробні матеріали, що використовуються у клініці сьогодні, мають значні недоліки, включаючи їх слабку антимікробну активність, ризик виникнення мікробної резистентності, труднощі контролю антимікробної активності, а також особливості їх функціонування в динамічному внутрішньому середовищі. Таким чином, отримання нових ефективних антибактеріальних препаратів наразі є важливим завданням сучасної медицини [14].

Нанотехнології сьогодні забезпечують велике підґрунтя для модифікації фізико-хімічних властивостей багатьох матеріалів та створення новітніх ефективних антимікробних препаратів. В останні роки антибактеріальні властивості наночастинок викликали значний інтерес у дослідників. Наноматеріали можуть бути стратегічно вигідними у якості речовин з антибактеріальними властивостями, оскільки площа активної поверхні наночасточок надзвичайно велика відносно їх розміру. Це забезпечує високу активність таких препаратів, при низькій їх токсичності [15]. Отже, наноматеріали можуть служити альтернативою антибіотикам для боротьби з бактеріальними інфекціями. Оскільки спосіб дії наночастинок (НЧ) базується на їх безпосередньому контакті НЧ із стінкою бактеріальної клітини, без подальшого проникнення в клітину, то більшість механізмів, які використовують мікроорганізми для подолання дії антибіотиків, є несуттєвими. Через їх малі розміри наночастинок мають значну активність щодо багатьох мікроорганізмів. Чим менша частка, тим більше співвідношення площі поверхні до об'єму, це посилює його біологічну і хімічну активність, збільшуючи контактну область металу з мікроорганізмом. Фізико-хімічні властивості частинок, включаючи розмір, форму, хімічну модифікацію і покриття, а також змішування НЧ у різних співвідношеннях з іншими речовинами та розчинниками, сильно впливають

на їх антибактеріальну активність [16]. Таким чином, зважаючи на велику кількість регулюючих факторів, стає зрозумілим відсутність чітких уявлень щодо механізмів антибактеріальної дії нанометалів та ступінь їх небезпечності, що підтверджується значною кількістю суперечливих даних в літературі про антимікробну активність нанометалів [17].

Багато досліджень присвячено вивченню механізмів антимікробної дії наночастинок металів. Незважаючи на суттєві успіхи у даній галузі незаперечним є те, що механізм антимікробної дії НЧ все ще залишається недостатньо зрозумілим. Наявність одночасно декількох різноспрямованих впливів на бактеріальні структури надає переваги НЧ металів у порівнянні з антибіотиками, кожний з яких передбачає залучення одного конкретного механізму дії. Мішенями для наночастинок є зовнішні та внутрішні бактеріальні структури: клітинна стінка, плазматична мембрана, білки та ДНК [18].

Метали та оксиди металів були широко вивчені щодо їх антимікробної активності. Наночастинки оксидів металів, які добре відомі своєю вираженою антибактеріальною дією, включають срібло (Ag), оксид заліза (Fe_3O_4), оксид титану (TiO_2), оксид міді (CuO) та оксид цинку (ZnO) [19, 20, 21]. Використання нанометалів дозволяє досягти у сотні разів меншої концентрації та одночасно збільшення антимікробних властивостей: зменшення розміру частинок від 10 мкм до 10 нм збільшує площу контакту в 10^9 разів [22].

Взаємодія між наночастинками та різними бактеріальними структурами краще вивчена для наночастинок срібла; механізм дії інших наночастинок все ще недостатньо зрозумілий. Особливо важливими вважається інтенсивність впливу та механізм дії комбінацій різних наночастинок одна з одною та з іншими сполуками на бактеріальні клітини. Хоча існує велика кількість даних щодо механізмів антимікробної дії срібла та його іонів, однак повністю механізм дії наночастинок срібла ще не з'ясовано [23]. У невеликій

кількості, срібло нешкідливе для клітин людини, але є біоцидним відносно мікробних клітин. Антимікробні властивості срібла використовували у боротьбі проти інфекцій упродовж багатьох століть. У медицині сполуки зі сріблом зазвичай застосовуються для лікування опіків, ран та різних інфекційних захворювань [24]. Антимікробна ефективність срібла залежить від розміру частинок. Більш того, антибактеріальна активність наночастинок Ag перевищує активність розчинів звичайного срібла. Тим не менш, висока поверхнева енергія може поставити під загрозу їх ефективність через їх схильність до агрегації у великі частки, що може призвести до втрати їх антибактеріальної активності. Після відкриття антибіотиків, від срібла (Ag), як і від інших не-антибіотичних препаратів з протимікробною активністю, практично відмовилися. Але сьогодні, з появою антибіотикорезистентних штамів, срібло набуло нового, але досі суперечливого інтересу [25]. Срібло, як було досліджено, є ефективним бактерицидним антибактеріальним засобом проти різних патогенів *in vitro* та *in vivo*. Більш того, вважають, що бактерії не набувають резистентності до Ag, на відміну від звичайних антибіотиків [26]. Тим не менш, ще залишається ряд невирішених питань: визначення мінімальної інгібуючої концентрації срібла (МІК), з'ясування можливості виникнення резистентних до наносрібла штамів [27], чи здійснює срібло згубний вплив на біоплівки чи тільки на планктонні клітини, а також побічні ефекти Ag на людину. Крім того, бактерицидні механізми наночастинок срібла залишаються недостатньо зрозумілими [28]. Проте, незважаючи на все зазначене, наночастинки срібла, є перспективними антибактеріальними препаратами.

Наночастинка міді є ще однією перспективною антимікробною речовиною. Добре відомо, що мідь з валентністю нуль та оксид міді демонструють антимікробну дію на віруси, гриби, грампозитивні та грамнегативні бактерії [29]. Щодо наночастинок Cu, то поєднання їх унікальних біологічних, фізико-хімічних та фармакологічних властивостей з

антибактеріальною, протигрибковою та противірусною дією металу визначають важливість їх оцінки як протимікробних препаратів нового класу. Сьогодні спостерігається інтенсифікація досліджень біоцидних властивостей наночастинок міді. Описані вище дослідження проводилися на бактеріальних та грибових пробних штаммах і не містять жодних даних про вплив наночастинок Cu на клінічні ізоляти мікроорганізмів. Наукове дослідження останнього має велике значення, оскільки такі патогенні мікроорганізми часто виявляють стійкість до традиційних антибіотиків. Існує також відсутність даних про біологічну безпеку наночастинок Cu у згаданих вище дослідженнях. Важливо забезпечити відповідне співвідношення ризик / користь при розробці нових наночастинок на основі лікарських засобів [30].

Незважаючи на те, що наночастинок оксиду міді (CuO) були ефективними проти різних бактеріальних патогенів, їх антибактеріальна ефективність дещо поступається Ag або ZnO. Отже, для досягнення тих самих результатів необхідна порівняно більша концентрація наночастинок [31]. Крім того, активність наночастинок CuO сильно залежить від виду бактерій. Тим не менше, оскільки Cu набагато дешевше, ніж інші нанометалеві матеріали, його можна використовувати для підвищення ефективності в нанокompозитах. Загалом, наночастинок Cu є менш потужними, ніж НЧ срібла, хоча в деяких випадках – навпаки. Наприклад, *E. coli* та *S. aureus* більш чутливі до срібла порівняно з НЧ Cu. Порівняння CuO НЧ з іншими металевими НЧ, крім НЧ Ag, показало, що вони мають найсильнішу антибактеріальну активність [32]. Таким чином, здається, що в окремих випадках було б вигідніше використовувати CuO НЧ замість інших, навіть наночастинок срібла. Синтез Cu НЧ зазвичай здійснюється за допомогою відносно токсичних відновлюючих засобів, які не є придатними для медичного застосування. Раніше було оптимізовано синтез Cu НЧ, використовуючи крохмаль та аскорбінову кислоту як більш біосумісні хімічні агенти [33].

Необхідність отримання засіб для стабілізації та транспортування наночастинок до певних ділянок зі збереженням активності стимулює чисельні спроби до застосування речовин різного походження. Використання гідрогелів у якості транспортних препаратів показало відмінні результати; однією з таких речовин, які використовуються для одержання гідрогелів, є хітозан [34]. Хітозан – це катіонний амінополісахарид, одержаний лужним деацетилюванням хітину. Йому властиві такі характеристики, як біоадгезивність, здатність до біологічного розкладання, біосумісність, безпечність, нетоксичність і сприяння поглинанню лікарських засобів. Всі вищезазначені характеристики роблять можливим використання хітозану у якості стабілізуючого компонента [35].

У літературі описано дослідження активності різних комбінацій хітозану та срібла [36], однак спосіб з'єднання хітозану та наночастинок срібла відрізняється від нашого. Зазначається можливість використання наночастинок у вигляді суспензії з молекулами хітозану або плівок для перорального або нашкольного використання. У цій роботі було підготовлено і охарактеризовано гібридний гідрогель, що складається з хітозану та НЧ срібла та було оцінено його бактерицидну активність. Про приготування та дослідження антимікробної активності композиційних матеріалів із хітозану з Си НЧ не проводилось.

Хітозан має визнану антимікробну активність, що є однією з основних властивостей полімеру. Кілька дослідників стверджують, що цей полісахарид має антимікробну дію щодо безлічі мікроорганізмів, включаючи водорості, грибки та бактерії. Цей глікозаміноглікан продемонстрував антимікробну активність проти деяких патогенних мікроорганізмів, і треба підкреслити його ефективність проти грам-позитивних бактерій та різних видів дріжджів [37]. Широке застосування хітозану в основному ґрунтується на його біосумісності, нетоксичності, антибактеріальних властивостях, низькій імуногенності та здатності діяти як посилювач поглинання. Хітозан

одержують шляхом деацетилювання N-ацетилглюкозаміну хітину, що міститься в екзоскелеті комах.

Антимікробна дія хітозану та його похідних піддається впливу ряду факторів, які можуть бути класифіковані на чотири основні категорії:

1. Мікробні фактори (вид мікроорганізма, вік клітини);
2. Внутрішні фактори хітозану (густина позитивного заряду, молекулярна маса, гідрофобні та гідрофільні характеристики, здатність до хелатування);
3. Фактори фізичного стану (у розчині та у твердому стані);
4. Фактори навколишнього середовища (рН, іонні сили, температура, час). Механізм антимікробної дії хітозану залишається неповністю зрозумілим [38].

Є припущення, що хітозан діє на клітинну стінку мікроорганізму, шляхом модифікації електричного потенціалу клітинної мембрани. Деякі автори стверджують, що аміногрупи хітозану, коли вони контактують із фізіологічними рідинами, протонізуються і зв'язуються з аніонними групами мікроорганізмів, що приводить до аглютинації мікробних клітин та гальмування росту [39]. З іншого боку, коли хітозан взаємодіє з бактеріальною кліткою, він сприяє витісненню іонів Ca^{++} з аніонних ділянок мембрани, що призводить до пошкодження клітин. Іншим постулатом є взаємодія між позитивно зарядженим хітозаном та негативно зарядженою клітинною стінкою мікроорганізмів, що спричиняє її розрив та втрату цілісності внутрішньоклітинного складу мікроорганізмів.

Хітозан низької молекулярної маси приводить до утворення похідних, наділених більшою розчинністю. З іншого боку, бактерицидна потужність зростає з збільшенням молекулярної маси розчинного у воді хітозану, ці результати суперечать тим, які були отримані при вивченні хітозану з

низькою молекулярною вагою, що показало більшу ефективність щодо гальмування росту грибіву порівнянні з хітозаном з високою молекулярною вагою [40]. Полісахарид демонструє кращу бактерицидну та бактеріостатичну дію відносно грамнегативних бактерій, ніж грампозитивних, завдяки складу фосфоліпідів та карбонових кислот бактеріальної клітинної стінки. Ці результати вказують на те, що ефекти хітозану відрізняються у двох типах бактерій: у випадку грампозитивних – хітозан високомолекулярної маси може утворювати плівки навколо клітини, які перешкоджають поглинанню поживних речовин, тоді як хітозан низької молекулярної маси більш ефективно діє на грамнегативні бактерій, що зумовлене порушенням метаболізму цих мікроорганізмів.

Беручи до уваги все перераховане стає зрозумілою необхідність подальших досліджень присвячених вивченню протимікробної активності наночастинок та їх комбінацій з іншими класами антимікробних агентів проти полірезистентних мікроорганізмів.

2 ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОБЛЕМИ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ

2.1 Моніторинг антибіотикорезистентності серед мікроорганізмів ізольованих у північно-східному регіоні України

Упродовж 2016–2018 рр. нами було обстежено 517 пацієнтів із гострими запальними процесами носоглотки. Хворим проводили комплексне обстеження згідно стандартів надання медичної допомоги. Процедура обстеження даних осіб відповідала стандартам етичного комітету. Збір від хворих досліджуваного матеріалу виконували під час першого звернення до лікаря, до призначення та здійснення етіопатогенетичної терапії. Після отримання зразки негайно транспортували в лабораторію в транспортному середовищі.

Для встановлення етіологічної структури збудників запальних процесів було проведено мікробіологічне дослідження змивів із носоглотки на базі мікробіологічної лабораторії Сумського державного університету:

- збір анамнестичних та клінічних даних;
- посів змивів із носоглотки на 5 % кров'яний, жовтково-сольовий агари, середовище Ендо та середовище Сабуро, з подальшим виділенням чистої культури та визначенням кількості мікроорганізмів. Ідентифікацією збудників проводили на підставі морфологічних, тинкторіальних та біохімічних властивостей збудників.

Вивчення чутливості виділених мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів проводилось диско-дифузійним методом (паперові диски виробництва ТОВ «Фармактив» (м. Київ, Україна) та Himedia (Індія). Досліджувані мікроорганізми інкубували у присутності антибіотиків в аеробних умовах при 37 ° С протягом 24 годин. По закінченню вимірювали діаметр кожної зони затримки росту(в міліметрах) та порівнювали із нормативними показниками. У разі якщо зона затримки росту була меншою

за норму мікроорганізм розцінювався як резистентний. Стандартний штам *S. Aureus* ATCC 25923 був використаний у якості контролю.

Результати проведених досліджень були піддані статистичній обробці. Для проведення обчислень використовували програму Graph Pad Quik Calcs із визначенням критерію t-Ст'юдента.

2.1 Синтез наночастинок срібла

Наночастинки Ag синтезували методом хімічного відновлення, використовуючи підходи, що застосовуються в так званій «зеленій хімії». Для цього ми використовували екстракт імбиру (*Zingiber officinale*), як поверхнево-активну речовину, та аскорбінову кислоту (вітамін С), як відновник. Спочатку 250 г кореневища імбиру ретельно промивають дистильованою водою, а потім нарізають невеликими шматочками. Різане кореневище імбиру витримували у водно-етанольному розчині (250 мл, співвідношення 1:1) протягом 5 днів (при кімнатній температурі у темному місці). Потім супернатант фільтрували через вакуумний фільтр та зберігали в холодильнику при 4 °С. Нітрат срібла (840 мг) розчиняють у воді (20 мл) та додають екстракт кореневища імбиру (20 мл). Потім додавали до розчину нітрату срібла суміш розчину L-аскорбінової кислоти (10%, 10 мл) та екстракту імбиру (20 мл) при постійному перемішуванні у магнітній мішалці. Реакційна суміш набувала темного кольору. Потім отриманий розчин нагрівали (60 °С, 1,5 год). Свіжо синтезовані НЧ срібла промивали водою, поки рН досягала 7, наприкінці використовували центрифугування (4000 об / хв., 30 хв).

2.3 Синтез наночастинок міді

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,02 моль) розчиняли в 10 мл іонізованої води. До цього розчину додавали гарячий етанольний розчин 10 см^3 ліганду бензилдиетилентріаміну (0,004 моль). Після перемішування та нагрівання упродовж 1,5-2,0 години при помірній температурі колір розчину ставав блідо-синім, майже чорним. Після зберігання розчину протягом ночі наночастинок Cu формуються та їх виділяють з розчину шляхом

центрифугування (6000 об / хв, 10 хв) для видалення ліганду. Частки очищають ацетоном та сушать при кімнатній температурі протягом 24 годин. Цю процедуру було використано для отримання 100 мл суспензії Cu НЧ 400 ppm.

2.4 Приготування хітозанового гелю

Для отримання хітозанового гелю хітозан з молекулярною масою 200 та 500кДа розчиняли у 2% розчині оцтової кислоти (інкубували протягом 24 годин при кімнатній температурі до повного розчинення хітозану), ступінь деацетилювання –85%.

2.5 Оцінка антибактеріальної активності хітозанового гелю, наночастинок Ag, наночастинок Cu, та композитів Ag НЧ -хітозан, Cu НЧ – хітозан відносно полірезистентних штамів стафілококів

Для подальшого дослідження було відібрано 10 штамів *S. aureus* резистентних до метициліну (MRSA). Антимікробну активність хітозанового гелю, НЧ срібла та міді, а також композитних субстанцій з НЧ срібла та хітозану та НЧ міді з хітозаном визначали відповідно до рекомендацій NCCLS (1999) за допомогою методу серійних розведень.

Досліджувані штами вирощували впродовж ночі в поживному бульйоні при 37 °С. Концентрацію бактерій стандартизували до оптичної щільності 0,08 при 600 нм (приблизно $1,5 \cdot 10^8$ КУО / мл) за допомогою шкали McFarland. Після цього 100 мкл суспензії мікроорганізмів інокулювали в пробірки з НЧ срібла та міді, з композитами з наночастинок срібла та хітозану та Cu НЧ-хітозану гелів у концентраціях, як це показано в таблицях 1 та 2. Пробірки, які містили лише поживне середовище та досліджувані речовини було використано у якості контролю. Всі пробірки інкубували при 37 °С протягом 24 годин. Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) визначалася як найнижча концентрація, яка демонструвала відсутність видимого росту (середовище залишалося прозорим). Всі дослідження повторювали тричі.

Таблиця 1 – Концентрації хітозану та НЧ срібла в експериментальному розчині

Концентрація								
хітозану, мкг/мл	НЧ Ag, мкг/мл							
3,3	9,6	4,8	2,4	1,2	0,6	0,3	0,15	0,075
5,0	9,6	4,8	2,4	1,2	0,6	0,3	0,15	0,075
6,0	9,6	4,8	2,4	1,2	0,6	0,3	0,15	0,075

Таблиця 2 – Концентрації хітозану та НЧ міді в експериментальному розчині

Концентрація						
хітозану, мкг/мл	Cu, мкг/мл					
0,62	0,7	0,35	0,17	0,085	0,042	0,021
1,25	0,7	0,35	0,17	0,085	0,042	0,021
2,5	0,7	0,35	0,17	0,085	0,042	0,021
5,0	0,7	0,35	0,17	0,085	0,042	0,021
10,0	0,7	0,35	0,17	0,085	0,042	0,021

3 ХАРАКТЕРИСТИКА ОБ'ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1 Особливості мікробіоти респіраторного тракту та її чутливість до антибіотиків

На підставі клініко-епідеміологічних даних пацієнтам було попередньо встановлено наступні діагнози: 43,1 % випадків тонзиліт; 15,7 % - ангіна; 32,3 % - риносинусити; 8,9 % - аденоїди, ринофарингіти.

Загалом було ізольовано та ідентифіковано 401 штаб мікроорганізмів із зіву та 167 - із носа. Частота виділення мікроорганізмів у монокультурі із зіву становила 90,9 % (318 ізолятів), із носа – 100 % (167 штабів). Мікробні асоціації були виділені у 32 пацієнтів (9,1 % обстежених) із зіву. Видова структура збудників гнійно-запальних процесів представлена у таблиці 3.

Таблиця 3 – Видова структура збудників гнійно-запальних процесів пацієнтів хворих із гострими запальними процесами носоглотки

Вид мікроорганізму	Кількість виділених мікроорганізмів					
	із зіву (n = 401)		із носа (n =167)		Загалом (n=568)	
	абс	%	абс	%	абс	%
<i>S. aureus</i>	98	24,5	100	59,9	198	34,9
<i>S. pyogenes</i>	129	32,2	54	32,3	183	32,2
<i>Candida spp.</i>	64	15,9	-	0	64	11,3
<i>K.pneumoniae</i>	57	14,2	-	0	57	10,0
<i>S. haemoliticus</i>	43	10,7	13	7,8	56	9,9
<i>K.ozanae</i>	7	1,7	-	0	7	1,2
<i>Moraxella spp.</i>	3	0,8	-	0	3	0,5

При вивченні частоти зустрічаємості різних таксонів мікроорганізмів у клінічно значущій кількості ($\geq 10^6$ КУО/мл змиву з тампону) у досліджуваних

біотопах було встановлено, що мікроорганізми виділені зі слизової зівали були представлені 5 родами, зі слизової носа – 3 родами (табл. 3).

У загальній структурі видового спектру перше місце посів *S. aureus* (34,9 %) та був домінуючим у матеріалі із носа (59,9 %). Слід звернути увагу, що *S. Aureus* вважають транзиторним представником мікрофлори носа і даний результат свідчить про значне поширення в популяції носійства патогенного стафілокока. За частотою виділення зі слизової зівали перше місце посів представник роду *Streptococcus* – *S. pyogenes* (32,2 %). Отриманий результат змушує по новому оцінити патогенний потенціал даного мікроорганізму, оскільки він є представником нормальної мікрофлори дихальних шляхів і за певних умов може викликати гнійно-запальні процеси в респіраторному тракті. На третьому місці за частотою виділення знаходились гриби роду *Candida* (15,9 %), які при цьому виділялись лише зі слизової оболонки зівали. На четвертому була *Klebsiella pneumoniae* (14,2 %). Аналізуючи результати мікробіологічного дослідження матеріалу із зівали від пацієнтів з ЛОР-патологією, слід зазначити, що у всіх випадках виділення асоціацій мікроорганізмів спостерігались 2-х або 3-х компонентні грибково-бактеріальні комплекси. У 13 (3,7 %) пацієнтів виділялися *S. aureus* та *Candida spp.*; у 16 (4,6 %) – *S. aureus*, *K. pneumoniae* та *Candida spp.*, у 3 (0,85 %) – *S. pyogenes* та *Candida spp.*

Наші результати відрізняються від даних Красій Н. І. [7], яка із ротоглотки хворих із відділення анестезіології та інтенсивної терапії виділяла переважно представників родини *Enterobacteriaceae* (59,7±2,2) %, а стафілококи при цьому становили лише (10,6±1,4) %. Дана відмінність, ймовірно, зумовлена тим, що слизові оболонки ротоглотки пацієнтів реанімаційного відділення колонізувались нозокоміальними штамами, а в нашому дослідженні від пацієнтів виділяли переважно умовно-патогенних представників автохтонної мікрофлори носа та зівали.

Необхідність дослідження видового складу мікробіоти та вивчення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків вважається ключовою ланкою у

ефективній терапії інфекційної патології. Однак, у практичній діяльності лікарі частіше проводять емпіричну антибіотикотерапію, спираючись у виборі препаратів на світові та місцеві дані антибіотикорезистентності. А тому, постійний моніторинг видового складу мікробіоти та її чутливості до антибактеріальних препаратів повинен здійснюватись на всіх рівнях - міжнародному, національному, регіональному та локальному. І хоча в різних країнах, регіонах і навіть лікувальних закладах чутливість мікроорганізмів до антибіотиків сильно варіює, існує уявлення про групу проблемних мікроорганізмів (ESKAPE- *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.*), дослідженню яких приділяється значно більше уваги. Результати, отримані нами, свідчать про знане поширення серед пацієнтів із запальними процесами носоглотки деяких представників із групи ESKAPE, що додаткові підтверджує необхідність ретельного вивчення їх антибіотикограм. При вивченні чутливості до антибіотиків нами було відібрано антибіотики з різними механізмами дії, а тому при формуванні резистентності до них, як правило, задіяні різні генетичні механізми. Результати дослідження чутливості виділених мікроорганізмів до антибіотиків відображено в таблиці 4.

Таблиця 4 – Чутливість виділених мікроорганізмів до антибіотиків

Вид мікроорганізму	Відносна кількість штамів (%) чутливих до антибіотиків							
	ципрофлоксацин	оксацилін	цефтриаксон	амоксцилін	цефазолін	азитроміцин	кларитроміцин	еритроміцин
<i>S. aureus</i> <i>n=198</i>	56,0± 0,3	56,1± 0,3	72,2± 0,3	45,9± 0,6	62,6± 0,4	42,9± 0,6	54,1± 0,3	45,9± 0,3
<i>S. haemoliticus</i> <i>n=43</i>	58,7± 1,1	53,5± 1,1	84,0± 0,9	80,0± 0,9	65,1± 1,1	66,7± 1,1	76,7± 1,0	27,9± 1,0
<i>S. pyogenes</i> <i>n=183</i>	74,9± 0,3	46,4± 0,6	63,4± 0,4	33,3± 0,8	49,2± 0,6	78,7± 0,3	48,6± 0,6	42,1± 0,6
<i>K.pneumoniae</i> , <i>n=57</i>	37,9± 0,9	10,0± 0,5	11,6± 0,6	9,3±0,5	41,9± 0,9	8,5±0,5	5,4±0,4	7,0± 0,4
<i>K.ozanae</i> , <i>n=7</i>	14,3±5, 8	-	0	28,6± 7,5	71,4± 7,5	57,1± 8,2	-	-
<i>Moraxella spp.</i> , <i>n=3</i>	33,3± 23,6	33,3± 23,6	33,3± 23,6	0	66,7± 23,6	0	-	-

Як видно з наведеного (табл. 4), найбільш активним антибіотиком відносно всіх досліджуваних мікроорганізмів є цефазолін, до якого були чутливими від 41,9 % до 71,4 % мікроорганізмів. Серед бактерій штами *K. pneumoniae* були найчастіше резистентними до різних за механізмом дії антибіотиків (від 95,6 до 58,2 % резистентних ізолятів). Особливу увагу привертає виділення значної кількості штамів з множинною стійкістю до антибіотиків – 49,1 % ізолятів *K. pneumoniae*, 32,6 % ізолятів *S. haemoliticus*, 36,9 % ізолятів *S. aureus*, 30,6 % ізолятів *S. pyogenes*.

У зв'язку з тим, що в структурі збудників гнійно-запальних процесів пацієнтів хворих із гострими запальними процесами носоглотки не завжди виявляється моноінфекція, терапія має проводитися з обов'язковим урахуванням чутливості збудників до антибіотиків. З іншого боку,

відсутність результатів мікробіологічного дослідження матеріалу від пацієнтів та результатів антибіотикограми може призвести до ускладнень грибкової етіології. За результатами досліджень встановлено, що у 6,2 % випадків зі слизової оболонки зіву пацієнтів з ЛОР-патологією виявляються бактеріально-грибкові асоціації. При чому *Candida spp.* виділені у асоціації з бактеріями проявляли високий рівень резистентності до антимікотичних препаратів: 96,9 % штамів були резистентними до ністатину, 56,3 % - до ітраконазолу, 46,9 % - клотримазолу, 34,4 % - кетоконазолу, 21,9 % - флуконазолу.

Для повного розуміння тенденцій у формуванні антибіотикорезистентності нами було сформовано профілі резистентності бактерій, які відображують набір притаманних і набутих генів резистентності конкретної клональної популяції. Профілі антибіотикорезистентності є маркерами ізолятів, які можуть бути використані для епідеміологічного аналізу збудників та визначення закономірностей їх циркуляції. Сформований профіль резистентності виглядав таким чином: Z (азитроміцин), С (цефтриаксон), І (ципрофлоксацин), О (оксицилін), А (амоксицилін), К (кларитроміцин), Е (еритроміцин), F (цефазолін). При інтерпретації профілю велика літера означає резистентність штаму до антибіотика або помірну чутливість, □ – чутливість мікроорганізма до антибіотика. Отримані нами дані представлені у таблиці 5.

Як видно з таблиці, серед мікроорганізмів з множинною резистентністю було виявлено 24 профілі. Сто п'ятнадцять (23,9 %) штамів були резистентними до 4 та більше антибіотиків. Серед стафілококів 10,3 % штамів були резистентними до всіх антибіотиків, в тому числі і до оксациліну. Серед клебсієл 29,8 % ізолятів були резистентними до 5 антибіотиків, в тому числі до цефалоспоринів 3 покоління. П'ять штамів стрептококів були резистентними до всіх антибіотиків. Виділення від пацієнтів та з зовнішніх об'єктів лікувальних закладів штамів

Таблиця 5 – Профілі резистентності виділених мікроорганізмів

Вид мікроорганізмів, кількість	Профілі антибіотико- резистентності	Відносна кількість полірезистентних штамів, %
<i>S. aureus</i> , n=198	Z□□OА□Е□	19,1
	□C□□AK□□	6,0
	□CI□AK□□	4,0
	ZCIOAKEF	5,6
	Z□I□A□□□	3,0
	ZC□□□□□F	2,5
	□□I□A□□F	2,0
	□□□A□□□F	1,5
<i>S. haemoliticus</i> , n=43	□□ IO□□Е□	11,6
	□□□O□□EF	9,3
	□□I□AK□□	6,9
	ZCIOAKEF	4,7
<i>S. pyogenes</i> , n=183	□C□OА□Е□	10,9
	□□I□AK□□	1,1
	□C IOA□Е□	4,4
	□C□OAK□□	2,7
	□□□OAKEF	3,3
	ZCIOAKEF	2,7
	Z□I□A□□□	3,3
	□CI□A□□□	1,1
<i>K. pneumonia</i> , n=57	□C□OА□□□	14,0
	ZC□OAK□□	14,0
	□□□OAKEF	15,8
	Z□I□A□Е□	5,3

мікроорганізмів з однотипними профілями антибіотикорезистентності (штами у яких діаметри зон затримки росту навколо дисків з однаковими антибіотиками однакові або відрізняються не більше ніж на 3 мм) може вказувати на їх госпітальне походження. Окрім того, вважають, щогоспітальні штами мікроорганізмів мають множинну стійкість, принаймні до 5 антибіотиків. Маркерними для стафілококів є стійкість до метициліну (оксациліну) та/або ванкоміцину, а для ентеробактерій - до гентаміцину і/або до цефалоспоринових антибіотиків III-IV поколінь. З огляду на отримані нами результати, можна припустити циркуляцію госпітальних штамів у пацієнтів, які перебували на амбулаторному лікуванні. Оскільки ймовірність інфікування в умовах стаціонару була мінімальною, то можна говорити про поширення госпітальних ізолятів за межі ЛПЗ. Це свідчить про негативні тенденції, щодо поширення госпітальних штамів, які вимагають більш ретельного і зваженого призначення антибіотиків з урахуванням антибіотикограми.

3.2 Характеристика НЧ Ag, НЧ Cu та хітозану, який було використано для приготування гелю *in situ*

Результати рентген-структурного аналізу НЧ срібла показали наявність чотирьох гострих піків при 38.15, 44.33, 64.48, 77.47 та 81.54 °2 Тета (рис. 1а). Згідно з базою даних про структуру кристалів американських мінералогів (AMCSD) ці піки були розцінені як характерні для срібла. Спектр інфрачервоної спектроскопії НЧ срібла представлений на рис. 1 с. Як видно, на спектрі є дві слабкі смуги на рівні 1635 і 3425 см⁻¹. Ці піки були віднесені до режиму коливання груп О-Н, які були присутні на поверхні частинок Ag. При проведенні трансмісивної електронної мікроскопії (ТЕМ) з'ясували, що НЧ Ag мають округлу форму та розміри 5-9 нм. Таким чином, результати рентген-структурного аналізу, ультрафіолетової віскозиметрії, ТЕМ та інфрачервоної спектроскопії підтвердили хімічний склад наночастинок, які було застосовано, а також їх високу чистоту та кристалічність.

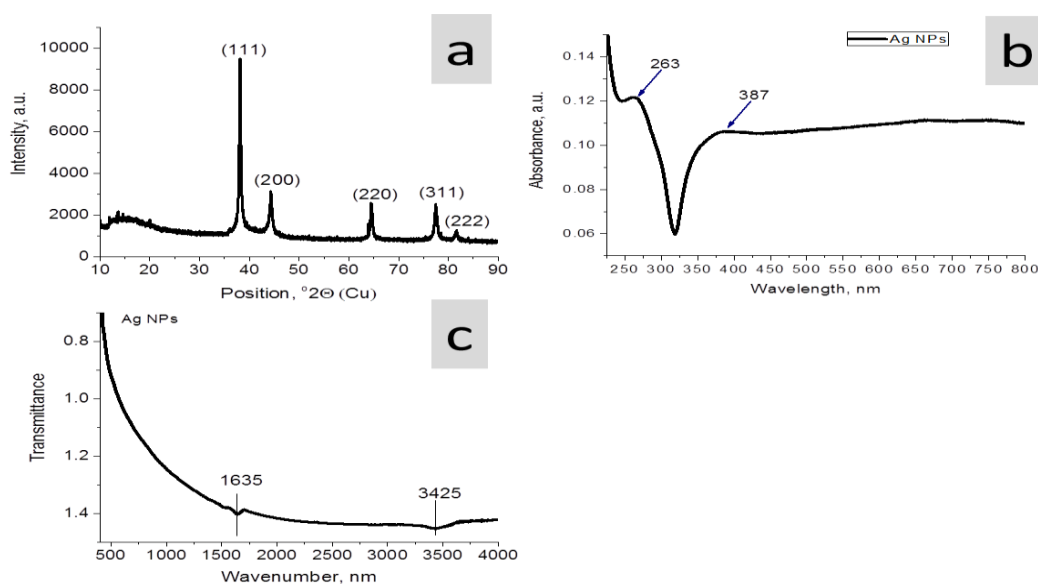


Рисунок 1 - Характеристика наночастинок срібла: (а) рентген-структурний аналіз, (b) ультрафіолетова віскозиметрія, (c) інфрачервона спектроскопія

Рентген-структурний аналіз зразків міді показав, що кристалічна природа досліджуваних речовин відповідає наночастинкам Cu (рис.2). Підтвердженням цього є наявність характерних піків, які притаманні для наночастинок Cu ($2\theta = 42.5$). Кристалічний розмір 'D' був отриманий шляхом вимірювання розширення дифракційних ліній та застосування формули Дебая-Шерера.

Зображення TEM підтвердили, що наночастинки металів знаходяться в нанодіапазоні і мають приблизно сферичну форму. Середні розміри частинок були 15-20 нм за даними квазіупругого розсіювання світла (QELS).

Рентген-структурний аналіз хітозану демонструє широкі дифракційні піки при $2\theta \sim 10^\circ$ та 20° , які є типовими для напівкристалічного хітозану. Кристалічна будова хітозану забезпечується водневими зв'язками між відповідними гідроксильними та N-ацетильними групами. Кожен кристалічний пік характеризує кристалографічну структуру, яка утворюється з паралельних та антипаралельних ліній полімерних ланцюгів.

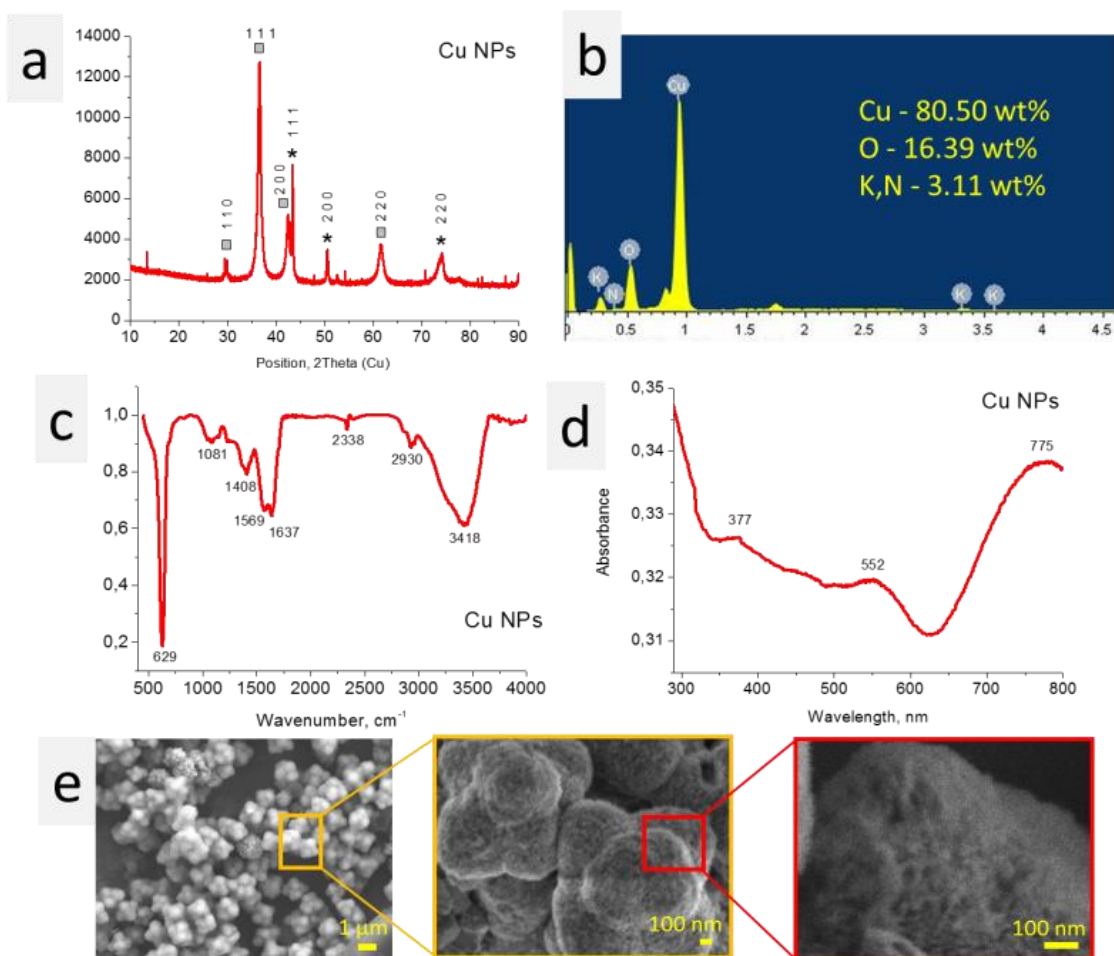


Рисунок 2 – Характеристика наночастинок міді: (а) рентген-структурний аналіз, (b) ультрафіолетова віскозиметрія, (c, d) інфрачервона спектроскопія, (e) трансмісійна електронна мікроскопія

Напівкристалічний хітозан має аморфні та кристалічні області. Типові дифракційні схеми демонструють сильне відбиття при 9-10 ° та 20-21 °, а також на незначні відбиття при 26 ° [35]. Хітозан з молекулярною масою 200 кДА показав аморфний пік в області 20 ° і відсутність інших фаз кристала.

Інфрачервоні спектри хітозану показують широкі і інтенсивні смуги при 3450-3200 см⁻¹, що можна пов'язати з тим, що водневі зв'язки ОН накладені на NH смуги розтягування, в СН-діапазоні розтягування при 2783 см⁻¹ та смугі аміду при 1652 см⁻¹ (рис. 3 -В). Коливання метиленових та метильних груп також виявлялися при $\nu = 1375$ см⁻¹ та $\nu = 1426$ см⁻¹, відповідно.

Поглинання в діапазоні від 1160 cm^{-1} до 1000 cm^{-1} пов'язано з коливаннями групи CO. Смуга, розташована поблизу $\nu = 1150\text{ cm}^{-1}$, пов'язана з асиметричними коливаннями CO в кисневій зоні, спричиненій деацетилюванням хітозану. Діапазони, близькі до $1080\text{--}1025\text{ cm}^{-1}$, відносяться до ν CO SONкільця, COS та CH_2OH . Малий пік при $\sim 890\text{ cm}^{-1}$ відповідає збудженню цукрової структури хітозану [35].

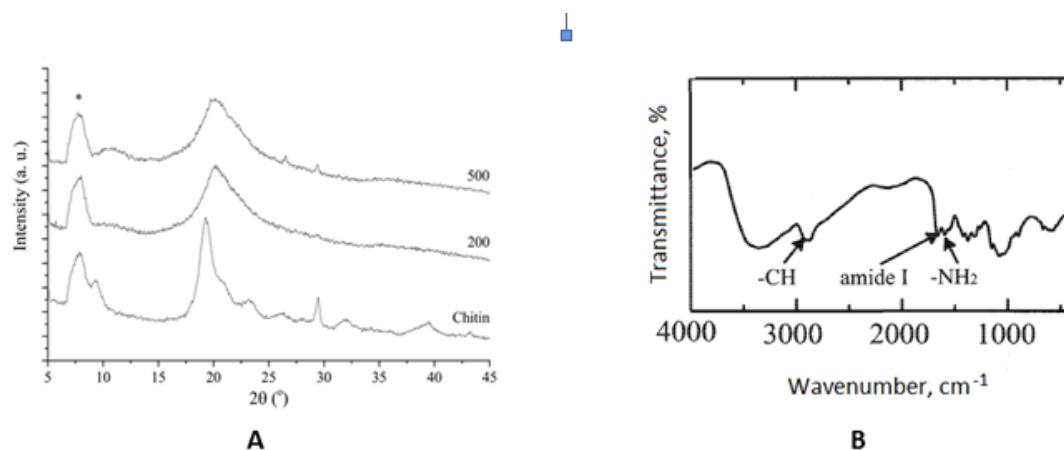


Рисунок 3 – Ренген-структурний аналіз (А) зразків гелю хітозану з різною молекулярною вагою та (В) інфрачервоний спектральний аналіз хітозану

3.3 Антибактеріальна активність НЧ Ag, НЧ Cu та хітозанових гелів

Антибактеріальна активність хітозанового гелю була перевірена на 10 метицилен-стійких штамів *S. aureus*. Мікроби були виділені у пацієнтів з гострими респіраторними захворюваннями. Бактерії культивували на живильному агарі і зберігали перед використанням у мікробіологічній лабораторії Сумського державного університету.

Антибактеріальна активність хітозанового гелю з концентрацією 6 мкг / мл була найвищою (ефективною проти 100% MRSA). У той же час хітозановий гель з концентрацією 3.3 та 5 мкг / мл показали антибактеріальну активність проти 60 і 80% штамів відповідно.

НЧ срібла з концентрацією 9,6µg / ml показали антибактеріальну ефективність проти 100% штамів (рис.4). Результати показали, що найнижча концентрація НЧ Ag, що демонструє антибактеріальний ефект (20%), становила 0,6 мкг / мл.

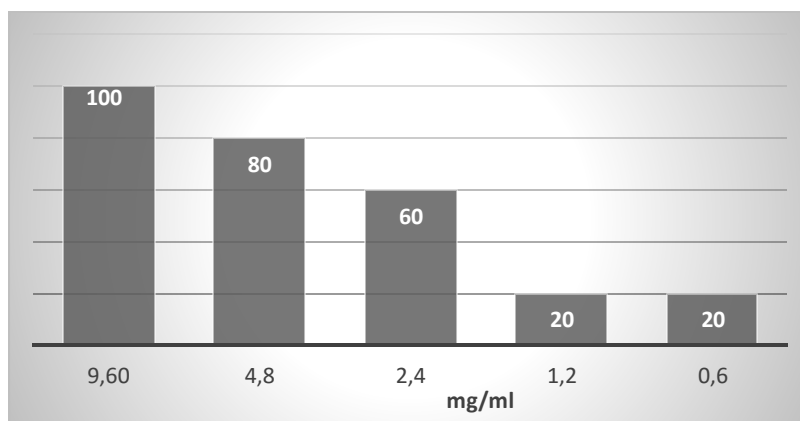


Рисунок 4 - Відсоток штамів MRSA чутливих до НЧ Ag

Результати, отримані після перевірки композитів хітозан-Ag до метицилін-резистентних штамів *S. aureus*, наведені в таблиці 6.

Таблиця 6 – Антибактеріальна активність хітозан-Ag-гелів до метицилін-стійких штамів *S. aureus*

Концентрація хітозану, мкг/мл	Відсоток чутливих штамів/ концентрація Ag, мкг/мл					
	2,4	1,2	0,6	0,3	0,15	0,075
3,3	100 %	100 %	70%	50 %	-	-
5,0	100 %	100 %	90%	50%	20%	10%
6,0	100 %	100 %	100%	100%	70%	30%

Було виявлено, що хітозан-Ag композит показав вищу антимікробну ефективність порівняно з його чистими формами.

Суспензії наночастинок Cu є перспективними для розробки нового класу альтернативних антимікробних препаратів. Антибактеріальна активність наночастинок Cu залежить від часу зберігання, дисперсійного середовища та

розмірів частинок. Особлива увага повинна приділятися вивченню активності НЧ та їх комбінації з іншими класами антимікробних препаратів проти мікроорганізмів, що стійкі до багатоконпонентних препаратів. Описано кілька спроб, спрямованих на підвищення стабільності та ефективності Cu НЧ протягом певного часу, і деякі автори проводили оцінку антимікотичної активності суміші наночастинок Cu та хітозану [6].

У своєму дослідженні ми встановили, що НЧ Cu та суміш Cu-НЧ / хітозанового були ефективними протимікробними препаратами відносно клінічних штамів MRSA, що відображено на рисунку 4.

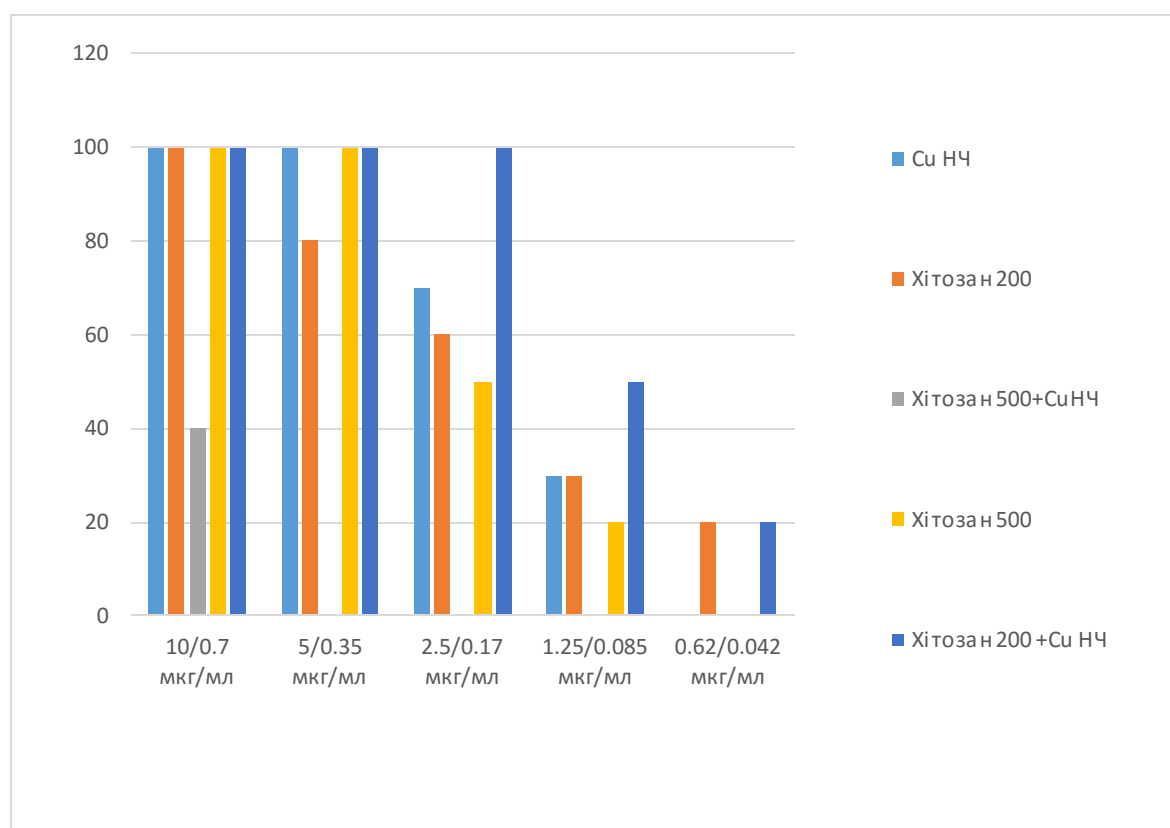


Рисунок 5 - Відсоток штамів MRSA чутливих до НЧ Cu, хітозанового гелю та Cu-НЧ-хітозанового гелю

Результати підтвердили, що НЧ Cu демонструють антибактеріальну активність проти грампозитивного антибіотикорезистентного штаму (MRSA). Крім того, 100% штамів MRSA були чутливими до НЧ Cu в концентрації 0,35 мкг / мл. Як видно з наведеного хітозан з молекулярною

масою 500 кДа експресував більшу антибактеріальну активність порівняно з хітозаном 200 кДа.

Суміш Cu-НЧ з хітозановим гелем продемонструвала вищу антибактеріальну активність відносно штамів MRSA порівняно з антибактеріальною активністю чистих розчинів НЧ Cu та хітозанового гелю взятих окремо. У той же час при змішуванні наночастинок міді з хітозаном молекулярна вага 200 кДа продемонструвало значно вищу антибактеріальну активність. Отримання таких результатів можна пояснити тим, що низькомолекулярний хітозан демонструє кращу антибактеріальну активність через блокування мРНК всередині бактеріальних клітин, і, ймовірно, Cu НЧ збільшують цей ефект. Розчин хітозану з високою молекулярною вагою (500 кДа) може зв'язувати НЧ Cu та зменшувати їх антибактеріальний ефект.

ВИСНОВКИ

1. У роботі проведено дослідження якісного та кількісного складу мікробіоти слизових оболонок носа та зіву у хворих з гострими запальними процесами носоглотки. Встановлено, що формування складу мікроорганізмів, виділених від пацієнтів, залежать від сезону, особливостей складу мікробіоти стаціонару, видового складу мікробіоти пацієнтів, які перебувають на лікуванні в цей час. Мікрофлора була представлена переважно моноізолятами стафілококів та стрептококів. Чутливість виділених мікроорганізмів до антибіотиків варіювала між різними видами мікроорганізмів так і між різними антибіотиками.
2. Наночастинки Ag та Cu демонструють високу антибактеріальну ефективність проти 100% клінічних штамів MRSA в концентрації 9,6 мкг /мл та 0,35 мкг / мл відповідно.
3. Композитний гель хітозану з НЧ срібла та міді демонстрував синергічне підсилення антибактеріальної активності обох компонентів, із суттєвим зниженням їх активних концентрацій в 4 та 2 рази відповідно (2,4мкг / мл та 0,17мкг / мл).

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Murugadoss A., Prasad P.V., Ghosh S.S., Chattopadhyay A., The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite. *Int. J. Food Microbiol.* 124:142–146, 2008.
2. Деркач С.А. Мікробіологічні аспекти лікування гнійно-запальних захворювань. *Інфекційні хвороби.* № 4 (82). С. 5-15. 2015.
3. Van Boeckel TP et all. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data, *Lancet Infect Dis.* № 14(8). P. 742-750. 2014.
4. Luria Leslie Founou, Raspail Carrel Founou, Sabiha Yusuf Essack. Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Frontiers in Microbiology.* Volume 7. P 1-19. 2016.
5. Manju Raj Purohit, Antibiotic Resistance in an Indian Rural Community: A ‘One-Health’ Observational Study on Commensal Coliform from Humans, Animals, and Water. *Int J Environ Res Public Health.* № 14(4). P. 386. 2017.
6. Luis Martines, Fernando Baquero. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter Space. *Jose Upsala Journal of Medical Sciences.* №119. P. 68–77. 2014.
7. World Health Organization. Antimicrobial resistance Draft global action plan on antimicrobial resistance. URL: (дата зверення 20 листопада 2018).
8. Красій Н.І. Біологічні властивості та динаміка формування антибіотикорезистентності мікроорганізмів у хворих зі штучною вентиляцією легень: дис. канд. мед. наук : 03.00.07 – мікробіологія / Тернопіль. держ. мед. ун-т, Тернопіль, 2016 р. 172 с.
9. Гуменюк М.І., Денисов О.С., Фещенко Ю.І. Антибіотикорезистентність мікроорганізмів стан проблеми та шляхи вирішення *Український хіміотерапевтичний журнал* №1-2 (23). 2010.
<http://www.uf.ua/ua/terapevt/antybiotykozystentnist-mikroorganizmiv-stan-problemy-ta-shlyahy-vyrishennyu/>

10. Torumkuney D. Pertseva T. Bratus E. et al. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2014-16 in Ukraine and the Slovak Republic. *J Antimicrob Chemother* 2018, Vol. 73, Iss. 5, 1 April 2018; p. v28-v35 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://academic.oup.com/jac/article/73/suppl_5/v28/4958393?searchresult=1
11. Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final report and Recommendations. The review on Antimicrobial Resistance. Chaired by J. O’Neill. May 2016 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final_paper_with_cover.pdf
12. В.К. Свіжак, А.Г. Данчук, С.Є.Дейнека, В.Й. Свіжак Локальний моніторинг антибіотико-чутливості основних збудників гнійно-запальних інфекцій. Частина 2 Антибіотикорезистентність основних збудників. Клінічна та експериментальна патологія Том XIV, № 4(54), С. 143-150. 2015.
13. Levy S.B., Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine Supplement*. 10(12): 123 – 129. 2004.
14. Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents Clarence S. Yah1,2* and Geoffrey S. SimateYah and Simate DARU Journal of Pharmaceutical Sciences (2015) 23:43
15. P.G. Luo and F. J. Stutzenberger, “Nanotechnology in the detection and control of microorganisms”, *Adv. Appl. Microbiol.* (2008), vol. 63, pp. 145-181.
16. NairN., BiswasR., GötzF. Impact of *Staphylococcus aureus* on pathogenesis in polymicrobial infections. LalithaBiswas *Infection and Immunity*. 2014; 82(6):2162– 2169.
17. PerveenI., MajidA., KnawalS., NazI., SeharS., AhmedS., Raza M. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci in Rawalpindi. *Pakistan British Journal of Medicine & Medical Research*. 2013; 3 (1):198-209.
18. HansraN.K., ShinkaiK., 2011. Cutaneous community-acquired and hospital-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Dermatologic Therapy*, 24: 263-272.

19. Laura R.M., Emily A., Clementi P. Hakansson A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* to Methicillin and Other Antibiotics *In Vitro* and *In Vivo* in the Presence of HAMLET. *PLoS One*. 2013; 8(5): e63158.
20. Davies, J. and D. Davies, 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74: 417-433.
21. Clarence S. Yah and Geoffrey S. Simate Yah and Simate Daru Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2015) 23:43
22. Bangyekan Ch., Aht-Ong D., Srikulkit K. Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films. *Carbohydrate Polymers*. 2006; 63 (1): 61–71.
23. Luo P.G., Stutzenberger F. J. Nanotechnology in the detection and control of microorganisms, *Adv. Appl. Microbiol.* (2008), vol. 63, pp. 145-181.
24. Cao X., Cheng C., Ma Y. L., Zhao C.S. Preparation of silver nanoparticles with antimicrobial activities and the researches of their biocompatibilities. *Journal of Materials Science*. 2010; 21(10): 2861–2868.
25. Ghosh I.N., Patil S.D., Sharma T.K. Synergistic action of cinnamaldehyde with silver nanoparticles against spore-forming bacteria: a case for judicious use of silver nanoparticles for antibacterial applications. *Int. J. Nanomedicine*. 2013; 8:4721–4731.
26. Zakharova O.V. Considerable Variation of Antibacterial Activity of Cu Nanoparticles Suspensions Depending on the Storage Time, Dispersive Medium, and Particle Sizes.
27. Perelshtein, I., G. Applerot, N. Perkas, E. Wehrschetz-Sigl, A. Hasmann, G.M. Guebitz and A. Gedanken, 2009. Antibacterial properties of an in situ generated and simultaneously deposited nanocrystalline ZnO on fabrics. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 1: 361-366.
28. Hamal D.B., Haggstrom J.A., Marchin G.L., Ikenberry M.A., Hohn K., Klabunde K.J., 2010. A multifunctional biocide/sporicide and photocatalyst based

- on titanium dioxide (TiO₂) codoped with silver, carbon, and sulphur. *Langmuir*, 26: 2805-2810.
29. Jain J., Arora S., Rajwade J.M. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Mol. Pharm.* 2009; 66(5): 1388–1401.
 30. Ivaska A., Kurvet I., Kasemets K., Blinova I., Aruoja V., Suppi S. Size - Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles to Bacteria, Yeast, Algae, Crustaceans and Mammalian Cells In Vitro. *PLoS ONE*. 2014; 9(7): e102108.
 31. Maqsood A., Mohamad S.A., Siddiqui M.K.J. Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica Chimica Acta*. 2010; 411 (23-24):1841-1848;
 32. Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005; 16(10): 2346–2353.
 33. Siwach O.P., Sen P. Fluorescence properties of Ag nanoparticles in water. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2008; 69:659–63.
 34. Thiel J., Pakstis L., Buzby S. Antibacterial properties of silver-doped titania. *Small*, 2007;3(5):799–803.
 35. Singh R., Wagh P., Wadhvani S. Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *Int. J. Nanomedicine*. 2013; 8: 4277–4290.
 36. J. Díaz-Visurraga, C. Daza, C. Pozo, A. Becerra, C. von Plessing, and A. García, “Study on antibacterial alginate-stabilized copper nanoparticles by FT-IR and 2D-IR correlation spectroscopy. *International Journal of Nanomedicine*, vol. 7, pp. 3597–3612, 2012.
 37. A. Jamshidi, M. Jahangiri-rad Synthesis of Cooper Nanoparticles and its Antibacterial Activity against *Escherichia coli* *Asian Journal of Biological Sciences* 7 (4):183-186, 2014

38. Xiong L, Tong ZH, Chen JJ, Li LL, Yu HQ. *Ecotoxicology*. Morphology-dependent antimicrobial activity of Cu/Cu_xO nanoparticles. 2015 Dec;24(10):2067-72.
39. Giannousi K., Lafazanis K., Arvanitidis J., Pantazaki A., Dendrinou-Samara C. Hydrothermal synthesis of copper based nanoparticles: antimicrobial screening and interaction with DNA *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 133, pp. 24–32, 2014
40. Villanueva ME, Diez AM, González JA, Pérez CJ, Orrego M, Piehl L, Teves S, Copello GJ. *ACS Appl Mater Interfaces*. Antimicrobial Activity of Starch Hydrogel Incorporated with Copper Nanoparticles. 2016 Jun 29;8(25)