

імуносупресивний ефект клітинної та гуморальної ланок імунітету, розвиток гіперчутливості негайного типу (I-типу), сповільненого типу (IV-тип), імунокомплексного (III-тип) та зменшення кількості природних кілерів. Характер та виразність імунологічних змін залежали від дози та терміну дії хімічних сполук.

ЛІТЕРАТУРА

1. Винарська О.І. Імунотоксичні фактори і здоров'я / О.І. Винарська // Досвід та перспективи наукового супроводу проблем гігієнічної науки та практики. — К., 2011. — С. 60-67.

2. Черниченко І.О. Канцерогенні фактори навколишнього середовища та їхня роль у формуванні онкологічної патології у населення / І.О. Черниченко // Досвід та перспективи наукового супроводу проблем гігієнічної науки та практики. — К., 2011. — С. 50-59.

3. Методи імуноаналізу в інфекційній і клінічній імунології. Навч. посібник / Ю.Л. Валянський, В.І. Чернявський, С.Е. Бірюкова та ін. — Харків: Стиліздат, 2011. — 112 с.

4. Антомонов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных / М.Ю. Антомонов. — К., 2006.

REFERENCES

1. Vynarska O.I. In : Dosvid ta perspektyvy naukovoho suprovodu problem hihienichnoi nauky ta praktyky [Experience and Perspectives of the Scientific Support of the Problems in the Hygienic Science and Practice]. Kyiv ; 2011 : 60-67. (in Ukrainian)

2. Chernychenko I.O. In : Dosvid ta perspektyvy naukovoho suprovodu problem hihienichnoi nauky ta praktyky [Experience and Perspectives of the Scientific Support of the Problems in the Hygienic Science and Practice]. Kyiv ; 2011 : 50-59. (in Ukrainian)

3. Valianskyi Yu.L., Cherniavskiy V.I., Biriukova S.E. et al. Methody imunoanalizu v infektsiinii i klinichnii imunolohii [Methods of Immunoanalysis in Infectious and Clinical Immunology] : Navchalnyi posibnyk. Kharkiv : Stylizdat ; 2011 : 112 p. (in Ukrainian)

4. Antomonov M.Yu. Matematicheskaia obrabotka i analiz mediko-biologicheskikh dannykh [Mathematical Processes and Analysis of Medico-Biological Data]. Kiev ; 2006 : 558 p. (in Russian).

Надійшла до редакції 16.06.2013

INFLUENCE HIBISCI EXTRACTUM SICCUM ON FORMATION BIOFILMS MIKROORGANISMS – PATHOGEN CATHETER-ASSOCIATED URINARY TRACT INFECTIONS

Pokas E.V., Synetar E.A., Loskutova M.N.

ВПЛИВ HIBISCI EXTRACTUM SICCUM НА ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ МІКРООРГАНІЗМАМИ – ЗБУДНИКАМИ КАТЕТЕР-АСОЦІЙОВАНИХ ІНФЕКЦІЙ СЕЧОВИВІДНИХ ШЛЯХІВ



ПОКАС О.В., СИНЕТАР Е.О., ЛОСКУТОВА М.М.

ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України", м. Київ

УДК 615.281.9+579.262:616-089.819+616.6-008.22

Іні встановлено, що однією з ланок патогенезу катетер-асоційованих інфекцій сечовивідних шляхів є формування госпітальними штамами біоплівки на поверхні катетерів [1]. За даними зарубіжних та вітчизняних дослідників, нозокоміальна бактеріурія та кандидурія, які пов'язані з інструментальними маніпуляціями, розвивається більш ніж у 25% пацієнтів протягом вже перших 5 діб катетеризації, а у 4% з них розвивається бактеріємія. Саме тому катетер-асоційовані інфекції сечовивідних шляхів (КАІСВШ) посідають друге місце серед причин розвитку сепсису [2]. Утворені бактеріальні біоплівки на імплантованому обладнанні продукують екзополімер, який захищає мікро-

ВЛИЯНИЕ HIBISCI EXTRACTUM SICCUM НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ МИКРООРГАНИЗМАМИ – ВОЗБУДИТЕЛЯМИ КАТЕТЕР-АССОЦИИРОВАННЫХ ИНФЕКЦИЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ

Покас Е.В., Синетар Э.А., Лоскутова М.Н.

Цель работы: изучение влияния действующего вещества гибискуса экстракта сухого на способность к формированию биопленок микроорганизмами рода *Enterococcus* и дрожжевыми грибами вида *S. albicans*, выделенных при катетер-ассоциированных инфекциях мочевыводящих путей.

Материалы и методы: способность к формированию биопленки определяли на плоскостных планшетах для иммуноферментного анализа. Количество сформированных биопленок оценивали по интенсивности окрашивания спиртового раствора на фотометре при длине волны 630 нм.

Результаты и обсуждение. Установлено, что действующее вещество в субингибирующей концентрации 200 мг/мл оказалось более эффективным при одномоментной инкубации бактерий рода *Enterococcus* в течение 48 часов, чем при влиянии действующего вещества на сформировавшуюся биопленку в течение 24 часов. Действующее вещество в комбинации с левофлоксацином приводило к большему разрушению уже сформировавшейся биопленки бактерий рода *Enterococcus*. Для дрожжеподобных грибов вида *S. albicans* исследованное вещество оказалось менее эффективным.

Ключевые слова: катетер-ассоциированные инфекции мочевыводящих путей, условно патогенные микроорганизмы, биопленки, гибискус экстракт сухой.

© Покас О.В., Синетар Е.О., Лоскутова М.М. СТАТТЯ, 2013.

організми від бактеріофагів, фагоцитів, уповільнює проникнення антибіотиків, що призводить до хронізації інфекційного процесу та незадовільних результатів антибіотикотерапії [3]. Серед збудників, що формують біоплівки, найбільше клінічне значення мають представники роду *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* та дріжджоподібні гриби роду *Candida* [4].

Одним з важливих напрямків сучасної медицини є розробка препаратів, здатних запобігати утворенню біоплівок мікроорганізмами та руйнувати вже сформовані біоплівки [5]. Останнім часом приділяється все більше уваги створенню препаратів рослинного походження, здатних впливати на основні біологічні властивості найпоширеніших

госпітальних збудників. Тому **метою** нашої роботи було вивчення впливу гібіскусу екстракту сухого (*hibisci extractum siccum*) на формування біоплівки мікроорганізмами, виділеними у випадках катетер-асоційованих інфекцій сечовивідних шляхів.

Матеріали і методи. У роботі було вивчено вплив діючої речовини гібіскусу екстракту сухого у субінгібуючій концентрації 200 мг/мл та препарату "левофлоксацин" у концентрації 5 мг/мл. Для досліджень використано 14 штамів представників роду *Enterococcus*, 5 штамів *S. albicans*, виділених від хворих, що перебували у відділенні реанімації та інтенсивної терапії після оперативного втручання та підлягали катетеризації протягом 3-5 діб.

Дослідження щодо здатності формування мікроорганізмами біоплівки проводили за методиками Романової Ю.М. зі співавторами [6]. Бактеріальні культури вирощували у триптиказосоевому бульйоні за температури 37°C. Визначення проводили у планшетах для імуноферментного аналізу. Доводі культури штамів розводили поживним середовищем 1:100, готували суспензію мікроорганізмів з додаванням до неї діючої речовини, концентрація якої у даному розчині становила 200 мг/мл. Отри-

мані суспензії вносили по 150 мкл у лунки планшетів (у 4 лунки для кожного штаму). Культури інкубували протягом 24-48 годин за температури 37°C. В якості контролю у 4 лунки вносили поживний бульйон, в якому інкубували культури.

Вплив діючої речовини гібіскусу екстракту сухого та його комбінації з левофлоксацином у концентрації останнього 5 мг/мл на сформовану біоплівку вивчали шляхом вирощування біоплівки протягом 24 годин, використовуючи два окремих планшети для кожного досліду. Вміст лунок видаляли та вносили розчин дослідної речовини у концентрації 200 мг/мл та її суміш з левофлоксацином у субінгібуючій концентрації, які інкубували 24 години за температури 37°C. Результати враховували після 48 годин інкубації. Знову вміст лунок видаляли, вносили по 150 мкл дистильованої води та фарбували 1% спиртовим розчином кристал-віолету. За 45 хвилин барвник видаляли, а лунки триразово промивали дистильованою водою та вносили по 200 мкл 96% етанолу. Кількість сформованої біоплівки оцінювали на мікро-спектрофотометрі (Rayto RT-2100C Microplate Reader) за довжиною хвилі 630 нм. Кількісним визначенням ступеня утворення біоплівок слугували значен-

Таблиця 1
Кількісна оцінка формування біоплівки у збудників катетер-асоційованих інфекцій

Штами мікроорганізмів	Протягом 48 годин без впливу діючої речовини	Протягом 48 годин за впливу діючої речовини	Вплив діючої речовини на сформовану протягом 24 годин біоплівку	Вплив діючої речовини на сформовану протягом 24 годин біоплівку з додаванням левофлоксацину
	M±m	M±m	M±m	M±m
<i>E. faecalis</i> № 8	0,387±0,05	0,188±0,04	0,270±0,06	0,122±0,01
<i>E. faecalis</i> № 17	0,241±0,05	0,160±0,03	0,160±0,05	0,037±0,003
<i>E. faecalis</i> № 6	0,347±0,02	0,249±0,03	0,144±0,03	0,075±0,04
<i>E. faecalis</i> № 19	0,240±0,05	0,085±0,01	0,115±0,02	0,044±0,02
<i>E. faecalis</i> № 30	0,317±0,09	0,150±0,01	0,169±0,04	0,066±0,02
<i>E. faecalis</i> № 14	0,170±0,02	0,094±0,03	0,130±0,01	0,107±0,02
<i>E. faecalis</i> № 27	0,196±0,06	0,109±0,04	0,031±0,01	0,087±0,02
<i>E. faecalis</i> № 26	0,262±0,03	0,105±0,05	0,145±0,06	0,042±0,02
<i>E. faecalis</i> № 16	0,207±0,04	0,062±0,02	0,118±0,01	0,050±0,02
<i>E. faecalis</i> № 28	0,170±0,05	0,097±0,03	0,100±0,01	0,024±0,01
<i>E. faecium</i> № 9	0,245±0,04	0,183±0,03	0,193±0,06	0,061±0,02
<i>E. faecium</i> № 32	0,370±0,09	0,117±0,02	0,211±0,05	0,047±0,02
<i>E. faecium</i> № 31	0,321±0,03	0,105±0,1	0,233±0,03	0,027±0,01
<i>E. faecium</i> № 25	0,280±0,06	0,069±0,02	0,182±0,02	0,013±0,002

INFLUENCE HIBISCI EXTRACTUM SICCCUM ON FORMATION BIOFILMS MIKROORGANISMS — PATHOGEN CATHETER-ASSOCIATED URINARY TRACT INFECTIONS

Pokas E.V., Synetar E.A., Loskutova M.N.

The objective to study: the effect of active substance on ability formation biofilms microorganisms genus Enterococcus and yeast C. albicans, pathogen catheter-associated urinary tract infections.

Materials and methods: *ability to formation biofilms study on the plate for enzyme immunoassay, ability performed biofilms evaluated by the color intensity alcohol*

on photometer with wavelength at 630 nm.

Results and discussion. *We established, that the active substance in subinhibitory concentrations (200 mg/ml) was more than effective on simultaneous incubation with active substance for microorganisms genus Enterococcus from 24 hours. In combination with levofloxacin resulted was more destruction on already formed biofilms for microorganisms genus Enterococcus. For yeast C. albicans active substance was less effective.*

Keywords: *catheter-associated urinary tract infections, opportunistic microorganisms, biofilms, hibisci extractum sicccum.*

ня оптичної густини (ОД ОГ). Отримані кількісні результати досліджень статистично обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики з розрахунком середнього арифметичного (M), середньоквадратичного відхилення (σ), помилки середнього арифметичного (m), оцінкою достовірності розбіжностей за критерієм Ст'юдента (t) з урахуванням рівня значущості (p) та з використанням програми "Біостат" [7].

Результати та їх обговорення. У результаті проведених досліджень встановлено, що культивування бактерій роду Enterococcus разом з діючою речовиною призвело до утворення менш кількісної біоплівки з достовірною різницею порівняно з контролем $p < 0,05$ (табл. 1).

Кількість сформованої біоплівки E. faecalis без додавання гібіскусу екстракту сухого коливалась у межах від $170 \pm 0,02$ до $0,387 \pm 0,05$ ОД ОГ, а для штамів E. faecium цей показник становив від $0,245 \pm 0,04$ до $0,370 \pm 0,09$. З додаванням діючої речовини кількість біоплівки становила від $0,062 \pm 0,02$ до $0,188 \pm 0,04$ ОД ОГ. Під впливом діючої речовини гібіскусу на вже сформовану біоплівку протягом 24 годин у 5 штамів E. fa-

ecalis кількість біоплівки збільшилась, і показники коливались у межах від $0,115 \pm 0,02$ до $0,270 \pm 0,06$ ОД ОГ, а у трьох штамів цього саме виду діюча речовина у досліджуваній концентрації призводила до утворення менш кількісної біоплівки. Їхні показники становили від $0,031 \pm 0,01$ до $0,145 \pm 0,06$ ОД ОГ, тоді як в усіх штамів E. faecium відслідковувалася тенденція до зниження показників кількості сформованої біоплівки, що була у межах від $0,182 \pm 0,02$ до $0,233 \pm 0,03$ ОД ОГ.

Наступним етапом було вивчення впливу діючої речовини у комбінації з антибіотиком. Додавання діючої речовини гібіскусу (200 мг/мл) та левофлоксацину (5 мг/мл) призвело до більшого руйнування вже сформованої біоплівки щодо бактерій роду Enterococcus. Отримані показники коливались у межах від $0,013 \pm 0,002$ до $0,122 \pm 0,01$ ОД ОГ.

Аналіз результатів електронно-мікроскопічних досліджень показав, що інкубація сегментів силіконового катетера протягом 24 годин у суспензії бактеріальної культури E. faecalis та діючої речовини гібіскусу з загальною концентрацією останнього 200 мг/мл не призводила до формування біоплівки.

Встановлено, що серед штамів виду C. albicans додавання діючої речовини на різних етапах експерименту не призвело до суттєвого зниження показників ОД ОГ порівняно з контролем $p > 0,05$ (табл. 2).

Отримані дані свідчать, що діюча речовина у концентрації 200 мг/мл пригнічує утворення біоплівок, показники яких становили від $0,082 \pm 0,03$ до $0,179 \pm 0,01$ ОД ОГ, а внесення діючої речовини за 24 години від початку утворення біоплівки у 4-х штамів призвело до незначного зменшення показників біоплівки ($p > 0,05$).

Даний бактеріостатичний ефект на досліджувані штами C. albicans можна пояснити особливістю будови клітинної стінки дріжджоподібних грибів, основним компонентом якої є полісахарид хітин.

Середнє значення показників ОД ОГ біоплівки серед штамів E. faecalis, E. faecium, C. albicans становило $0,259$, $0,299$, $0,2$ відповідно. Під впливом діючої речовини формування біоплівки протягом 48 годин у штамів E. faecium зменшилось і склало $0,047$ ОД ОГ, тоді як у штамів E. faecalis — $0,13$ ОД ОГ. Серед дріжджоподібних грибів виду C. albicans показники знизились несуттєво і склали $0,135$ ОД ОГ (рис.).

Таблиця 2

Кількісна оцінка формування біоплівки у збудників катетер-асоційованих інфекцій

Штами мікроорганізмів	Протягом 48 годин без впливу діючої речовини	Протягом 48 годин з діючою речовиною	Вплив діючої речовини на сформовану протягом 24 годин біоплівку
	M \pm m	M \pm m	M \pm m
C. albicans № 13	0,155 \pm 0,02	0,089 \pm 0,03	0,151 \pm 0,02
C. albicans № 24	0,201 \pm 0,02	0,179 \pm 0,01	0,218 \pm 0,01
C. albicans № 11	0,337 \pm 0,07	0,135 \pm 0,05	0,287 \pm 0,04
C. albicans № 30	0,187 \pm 0,02	0,107 \pm 0,03	0,132 \pm 0,03
C. albicans № 15	0,157 \pm 0,01	0,082 \pm 0,03	0,103 \pm 0,03

речовина гібіскусу у субінгібуючій концентрації 200 мг/мл суттєво не впливала на формування біоплівки.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гостев В.В. Бактериальные биопленки и инфекции / В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // Журнал инфектологии. — 2010. — Т. 2, № 3. — С. 4-15.
2. Проблема катетер-ассоциированных инфекций мочевого тракта и бактериальных биологических пленок в современной урологии / Ю.П. Серняк, А.С. Фуkszон, Ю.В. Рощин, М.В. Криштопа // Здоровье мужчины. — 2005. — № 2. — С. 40-44.
3. Циганенко А.Я. Достижения та перспективи розвитку антибіотикотерапії гнійно-септичних інфекцій / А.Я. Циганенко // Експериментальна та клінічна медицина. — 2004. — № 2. — С. 8-11.
4. Честнова Т.В. Особенности существования бактерий в составе биопленок на примере уропатогенных кишечных палочек / Т.В. Честнова, Н.В. Середина // Вестник новых медицинских технологий. — 2010. — Т. XVII, № 4 — С. 28-30.
5. Тец В.В. Влияние экзогенных протеолитических ферментов на бактерии / В.В. Тец, Г.Ю. Кнорринг, Н.К. Артеменко // Антибиотики и химиотерапия. — 2004. — Т. 29, № 12. — С. 9-13.
6. Способность к формированию биопленок в искус-

ственных системах у различных штаммов Salmonella typhimurium / Ю.М. Романова, Н.В. Алексеева, Т.А. Смирнова и др. // Журн. микробиол. — 2006. — № 4. — С. 38-42.

7. Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. — Л.: Медгиз, 1962. — 179 с.

REFERENCES

1. Gostev V.V., Sidorenko S.V. Zhurnal infekologii. 2010 ; 2 (3) : 4-15. (in Russian)
2. Serniak Ju.P., Fuksz A.S., Roschin Ju.V., Krishtopa M.V. Zdorove muzhchiny. 2005 ; 2 : 40-44. (in Russian)
3. Tsyhanenko A.Ya. Eksperymentalna ta klinichna medytsyna. 2004 ; 2 : 8-11. (in Ukrainian)
4. Chestnova T.V., Seredina N.V. Vestnik novykh medicinskikh tehnologii. 2010 ; XVII (4) : 28-30. (in Russian)
5. Tec V.V., Knorring G.Yu., Artemenko N.K. Antibiotiki i khimioterapiia. 2004 ; 29 (12) : 9-13. (in Russian)
6. Romanova Yu.M., Alekseeva N.V., Smirnova T.A., Andreev A.L., Didenko L.V., Gincburg A. L. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii. 2006 ; 4 : 38-42. (in Russian)
7. Ashmarin I.P., Vorobiev A.A. Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniakh [Statistical Methods in Microbiological Research]. Leningrad : Medgiz ; 1962 : 179 p. (in Russian)

Дія гібіскусу екстракту сухого на сформовані біоплівки досліджуваних штамів бактерій роду Enterococcus протягом 24 годин виявилася менш ефективною (середні показники склали від 0,138 до 0,225 ОД ОГ), а у комбінації з левофлоксацином призвела до суттєвого зниження показників кількості біоплівок (від 0,037 до 0,065 ОД ОГ).

Висновки

1. Діюча речовина гібіскусу при її внесенні у субінгібуючій концентрації 200 мг/мл призводить до пригнічення утворення бактеріальної біоплівки на початку культивування штамів представників роду Enterococcus. У разі внесення протягом 24 годин досліджувана речовина діє менш ефективно.
2. У комбінації з левофлоксацином діюча речовина гібіскусу призводила до суттєвого зменшення уже сформованої біоплівки протягом 24 годин.
3. На різних етапах культивування штамів *S. albicans* діюча

Рисунок

Оцінка середніх показників одиниць оптичної густини біоплівки серед досліджених штамів *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. albicans*

