

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ТАБЛЕТОВАНИХ АНТИСЕПТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ НА АДГЕЗИВНІ ВЛАСТИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ

Жорняк О. І.*

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова
вул. Пирогова, 56, 21018, Вінниця, Україна
(отримано 28.03.2013, надруковано 02.07.2013)

У роботі представлено результати вивчення впливу антимікробних препаратів на адгезію грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів. Показано, що антисептичні препарати септефрил, себедин, аджисепт пригнічують адгезію бактерій. Найнижчий індекс адгезивності спостерігали в присутності препарату септефрил.

Ключові слова: адгезія, антисептичні препарати, декаметоксин, септефрил, себедин, аджисепт.

* zhornjak.ei@gmail.com

Вступ.

Досягнення в галузі молекулярної природи патогенності, складають основу для впровадження нових і вдосконалення існуючих антимікробних препаратів. Для проникнення крізь захисні бар'єри макроорганізму та подальшої персистенції в ньому бактерії повинні мати високу здатність заселяти слизові оболонки біологічних ніш людини. Здатність бактерій до адгезії є одним з факторів, що забезпечують колонізацію. Не спроможні до адгезії бактерії видаляються з організму людини механізмами природного захисту. Адгезивність мікроорганізмів до еукаріотичних клітин є початковою ланкою патогенезу при розвитку інфекційних захворювань, що викликають патогенні та умовно-патогенні штами і одним із механізмів захисної дії представників нормальної мікрофлори, яка безпосередньо приймає участь у формуванні пристінкових шарів слизових оболонок [1].

Адгезивний процес характеризується специфічністю, що полягає у вибірковій здатності мікробів прикріплюватися до епітеліальних клітин певних органів макроорганізму. У межах одного і того ж органу або системи відмічають мозаїчність адгезії. Мікробна адгезія різна не тільки в різних тканинах, але і у різних особин одного і того ж виду, в залежності від віку, генетичних особливостей і стану здоров'я. Науковці досліджують дію різних засобів на адгезивні властивості мікроорганізмів. Протимікробні препарати діють на структурні елементи

клітинної стінки, що і зумовлює взаємодію з клітинами макроорганізму. Блокування адгезії негативно впливає на розвиток інфекційного захворювання [2].

Видовий склад мікрофлори слизової оболонки ротової порожнини та горла може змінюватись у одного і того ж самого хворого на протязі життя. Суттєве значення має збалансований склад нормофлори, її антагоністичні властивості. В останні десятиріччя намітилась тенденція до зміни видового складу мікрофлори ротової порожнини та глотки в бік збільшення кількості умовно-патогенних мікроорганізмів. Серед них провідне місце займають стафілококи, кишкова паличка, що мають широку розповсюдженість, множинну лікарську стійкість до старих і швидке пристосування до нових антимікробних засобів [3].

Елементи клітинної стінки мікроорганізмів, що взаємодіють з рецепторами клітин макроорганізму називають адгезинами. Грампозитивні та грамнегативні мікроорганізми мають різну будову адгезинів. У грампозитивних бактерій адгезини представлені білковими молекулами, які міцно зв'язані з цитоплазматичною мембраною. Такі адгезини називаються афімбріальними. Рецепторами для адгезинів грампозитивних бактерій є фібронектин та білки міжклітинного матриксу еукаріотичних клітин. У грамнегативних мікроорганізмів адгезини входять до складу ворсинок (фімбрії, пілі), тому їх називають фімбріальними адгезинами. Рецептори чутливих

клітин представлені білковими фрагментами, що комплементарні адгезинами. Фімбрилярні адгезини забезпечують більш ефективну адгезію, ніж афімбриальні. Вони локалізуються на довгій тонкій ніжці, яка полегшує їх контакт з рецепторами і дозволяє подолати бар'єр нормальної мікрофлори та інші захисні механізми.

Профілактика захворюваності потребує детального вивчення колонізуючих властивостей мікроорганізмів, оскільки колонізація це природна форма існування як сапрофітів, так і збудників патологічних процесів. Дослідження взаємодії бактерій з клітинами є актуальним завданням, яке відкриває перспективу створення нових антиадгезивних засобів та ефективних препаратів. Після втрати адгезивних властивостей мікроорганізми втрачають здатність викликати захворювання [4].

Мета дослідження.

Вивчити вплив таблетованих антисептичних препаратів септефрилу (декаметоксин), себедину (хлоргексидину дигідрохлорид), аджисепту (амілметакрезол) на адгезивні властивості мікроорганізмів.

Матеріали і методи.

Для дослідження використовували таблетовані антисептичні лікарські препарати септефрил, себедин, аджисепт в бактеріостатичних концентраціях. Об'єктом дослідження були клінічні штами *S. aureus* 21, *S. aureus* 115, *E. coli* 128, *E. coli* 34, виділені від хворих на гнійно-запальні захворювання. Для порівняння застосовували музейні штами *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* NCTC 7447, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* M-17.

Для вивчення адгезивних властивостей мікроорганізмів в присутності антисептичних препаратів септефрилу, себедину, аджисепту використовували формалізовані еритроцити людини 0(1) групи Rh (+) та суспензію добових культур мікроорганізмів, в розрахунку 10^9 мікробних клітин/мл у забуферному фосфатами фізіологічному розчині хлориду натрію (ЗФР). Еритроцити вибрали в якості універсальної моделі, оскільки на своїй поверхні вони несуть глікофорин – речовину, ідентичну глікокаліксу епітеліальних клітин. Склад забуферного розчину (г/л): натрій фосфорно-кислий 8,01; калій фосфорно-кислий двозамінений 1,78 (рН розчину складав 7,2).

Попередньо у приготовленому ЗФР триразово промивали свіжі еритроцити людини 0(1) групи Rh (+) при 5000 об./хв., протягом 10 хвилин. Потім до відмитих еритроцитів 50% нейтральний формалін та інкубували суміш протягом 2 годин при t 37⁰ С. Після цього еритроцити тричі промивали ЗФР при 5000 об./хв. протягом 10 хвилин. Отримані еритроцити зберігали при t 4⁰С у вигляді суспензії 10^8 /мл у ЗФР.

Для дослідження адгезивності бактерій в хімічно чисті пробірки вносили по 0,5 мл суспензії мікроорганізмів (10^9 /мл), 0,5 мл формалізованих червоних клітин (10^8 /мл), 0,1 мл антимікробного препарату відповідної концентрації. Контролем служили пробірки, які містили вказані вище компоненти, та 0,1 мл ЗФР без антибактеріального препарату.

Отриману суміш інкубували протягом 30 хвилин при t 37⁰ С, періодично збовтуючи. Після проведених досліджень готували мазки, висушували на повітрі, фіксували метиловим спиртом, фарбували за Романовським-Гімза. Під світловим мікроскопом у виготовлених мазках-препаратах на 100 еритроцитах оцінювали адгезивні властивості мікроорганізмів за допомогою коефіцієнту участі еритроцитів в адгезивному процесі (К) та індексу адгезивності мікроорганізмів (ІАМ). К – відсоток еритроцитів, які мають на своїй поверхні адгезовані мікроби. ІАМ – це середнє число адгезованих бактерій на одному еритроциті, який приймав участь в адгезивному процесі. Кратність проведення дослідів з кожним досліджуваним штамом дорівнює трьом [5].

Статистичний аналіз отриманих даних проводили за допомогою програми StatSoft Statistica v 5.0. Використовували метод варіаційного аналізу з визначенням критерія достовірності відмінностей (р). Результати вважалися достовірними при значеннях $p < 0,05$, при значеннях $p < 0,01$ високодостовірними [6].

Результати та їх обговорення.

Отримані результати показали, що антисептичні препарати септефрил, себедин, аджисепт впливали на адгезивну здатність музейних та клінічних штамів стафілококу.

Так, у контролі кількість адгезованих клітин як музейних так і клінічних штамів складала 100%. При порівнянні контрольних та експериментальних досліджень встановлено, що адгезивна здатність стафілококу в присутності антисептичних препаратів зменшилась

(рисунок 1, 2).

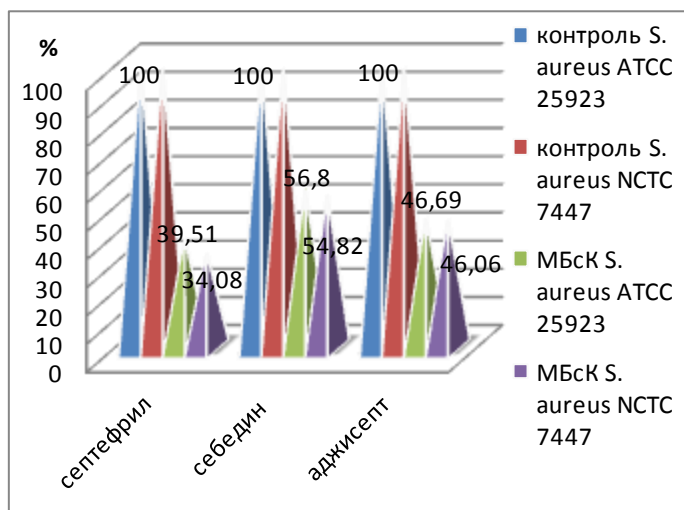


Рисунок 1 - Вплив антисептичних препаратів на адгезивні властивості музейних штамів *S. aureus*.

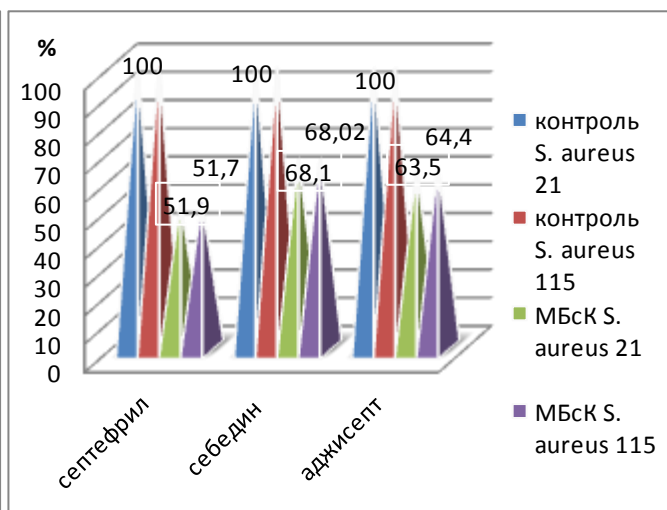


Рисунок 2 - Вплив антисептичних препаратів на адгезивні властивості клінічних штамів *S. aureus*.

У досліді явище прилипання стафілококу при МБсК антисептичних препаратів у музейного штаму *S. aureus* ATCC 25923 знизилось від 56,8% до 39,51%, а у *S. aureus* NCTC 7447 від 54,82% до 34,08%. Адгезивна активність клінічного штаму стафілококу *S. aureus* 21 знизилась від 68,1 до 51,9%, а у *S. aureus* 115 від 68,02% до 51,7%.

Найнижчий відсоток адгезованих стафілококів визначали в присутності препарату септефрил на основі декаметоксину. У музейних штамів стафілококу він дорівнював від 39,51 до 34,08% ($p < 0,001$) при МБсК 20 мкг/мл препарату, що у 2,5 – 2,9 рази менше ніж в контролі. У клінічних штамів при МБсК 9,81 мкг/мл коефіцієнт участі еритроцитів в адгезивному процесі дорівнював 57,5 – 57,6% ($p < 0,001$), що у 1,7 рази менше в порівнянні з контролем. Найкраще адгезія штамів стафілококу проходила в присутності препарату

У подальших дослідженнях було вивчено вплив таблетованих антисептичних препаратів на адгезивні властивості кишкової палички. Слід зазначити, що її адгезивна активність була вище ніж у стафілококу. Можливо, це обумовлено будовою фімбріальних адгезинів кишкової палички, які забезпечували більш ефективну адгезію. Відомо, що кишкова паличка прикріплюється на поверхні чутливих клітин за допомогою

себедин. Для музейних штамів при МБсК 3,9 мкг/мл препарату, відсоток адгезованих бактерій дорівнював від 54,8% до 56,8% ($p < 0,001$), що у 1,9 рази менше в порівнянні з контролем. Кількість клітин клінічного штаму *S. aureus* 21 склав 68,1% ($p < 0,05$), а штаму *S. aureus* 115 – 68,02% ($p > 0,05$) при МБсК 6,24 мкг/мл, що в 1,46 та в 1,6 рази відповідно менше ніж в контролі.

Аналіз протимікробної дії аджисепту на досліджуваний штам *S. aureus* показав, що кількість клітин музейних штамів, які прийняли участь в адгезії в присутності МБсК 15 мкг/мл ($p < 0,001$) складала 46,69% та 46,06%, що в 2,14 рази менше ніж в контролі. Для клінічного штаму *S. aureus* 21 при МБсК 20,25 мкг/мл відсоток адгезованих стафілококів на поверхні еритроцитів дорівнював 63,5% ($p < 0,001$), а для *S. aureus* 115 - 64,4% ($p > 0,05$), що в 1,57 рази менше ніж в контролі.

специфічних фімбрій, що взаємодіють з рецепторами епітеліальних клітин. Фімбрії поділяють на декілька типів, які значно відрізняються по складу у патогенних і непатогенних ешерихій. Це дає змогу кишковій паличці проявляти високу адгезивну активність і успішно конкурувати з патогенними видами ентеробактерій.

У контролі кількість адгезованих клітин як музейних так і клінічних штамів складала 100%.

При порівнянні контрольних та експериментальних досліджень адгезивна здатність кишкової палички, як і стафілококів, в присутності таблетованих антисептичних препаратів зменшувалась. Найнижчий відсоток адгезованих клітин кишкової палички, як і стафілококу, визначали в присутності препарату септефрил. Успішно проходила адгезія кишкової палички в присутності препарату аджисепт. Результати проведених досліджень представлені на рисунку 3, 4.

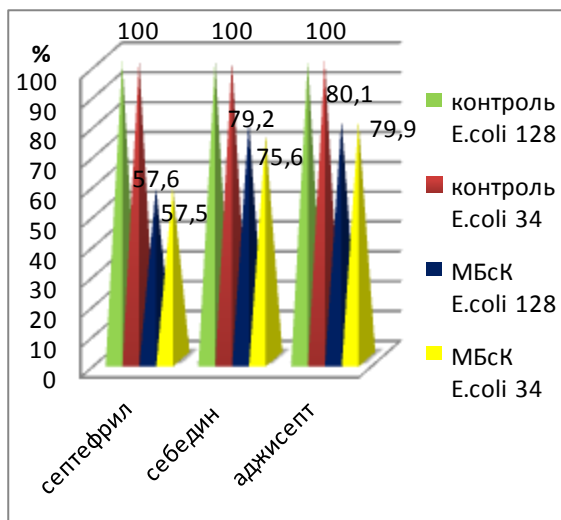


Рисунок 3 - Вплив антисептичних препаратів на адгезивні властивості музейних штамів *E. coli*.

У досліді в присутності антисептичних препаратів явище прилипання кишкової палички у музейного штаму *E. coli* ATCC 25922 знизилось від 72,8% до 43,6%, а у *E. coli* M-17 – від 70,7% до 40,83%. Адгезивна здатність клінічного штаму *E. coli* 128 знизилась від 80,1 до 57,6%, а у *E. coli* 34 – від 79,9% до 57,5%.

Встановлено, що при дослідженні препарату септефрил, відсоток прикріплених клітин музейних штамів *E. coli* до еритроцитів при МБсК 30 мкг/мл складала 40,83 – 43,6% ($p < 0,001$), що в 2,4 рази менше ніж в контролі. Індекс адгезивності дорівнював 2,26 для *E. coli* ATCC 25922 та 2,16 для *E. coli* M-17. У клінічних штамів при МБсК 31,41 мкг/мл септефрилу відсоток прикріплених клітин дорівнював 57,5%. Індекс адгезивності складав 3,03 ($p < 0,05$) для *E. coli* 128 та 2,83 ($p < 0,001$) для *E. coli* 34.

Адгезивна здатність кишкової палички в присутності себедину для штаму *E. coli* ATCC 25922 складала 69,5% ($< 0,05$), а для *E. coli* O-55 – 67,4% ($< 0,05$) при МБсК препарату 250

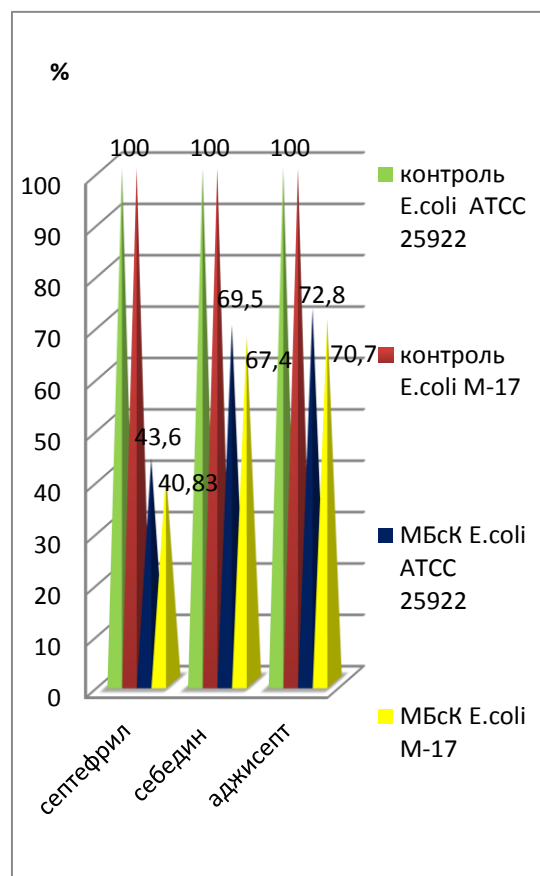


Рисунок 4 - Вплив антисептичних препаратів на адгезивні властивості клінічних штамів *E. coli*

мкг/мл, що в 1,4 рази менше ніж в контролі. Кількість клітин клінічних штамів *E. coli* 128 та *E. coli* 34, що прийняли участь в адгезії в присутності МБсК 426 мкг/мл себедину складала 75,6-79,2% ($> 0,05$).

Вищий відсоток адгезованих ентеробактерій на поверхні еритроцитів було виявлено при дослідженні препарату аджисепт. Кількість клітин музейного штаму *E. coli* ATCC 25922, які прийняли участь в адгезії в присутності МБсК 30 мкг/мл даного препарату складала 72,8% ($< 0,05$), а для *E. coli* M-17 – 70,7% ($< 0,05$), що в 1,37 та 1,41 рази відповідно менше ніж в контролі. Кількість клітин клінічного штаму *E. coli* 128 в присутності аджисепту склав 80,1% ($< 0,05$), а штаму *E. coli* 34 – 79,9% ($> 0,05$) при МБсК 42,86 мкг/мл, що в 1,24 рази менше ніж в контролі.

Висновки.

1. Антисептичні препарати септефрил, себедин, аджисепт впливають на адгезивну здатність музейних, клінічних штамів стафілококу, кишкової палички.

2. Порівняно з музейними штамми, адгезивна активність клінічних штамів виявилась вище.
3. Вивчення впливу таблетованих антисептичних препаратів на адгезивні властивості мікроорганізмів дає змогу поглибити знання про механізм дії на мікроорганізми лікарських антисептичних препаратів, що доцільно враховувати в процесі лікування гнійно – запальних захворювань.

Перспективи подальших досліджень.

На подальшу увагу заслуговує вивчення впливу таблетованих антисептичних препаратів септефрилу, себедину, аджисепту на морфологію внутрішніх органів тварин з метою створення високоефективних схем лікування запальних захворювань ротової порожнини та горла.

Список опрацьованої літератури:

1. Жорняк О.І. Вплив антисептичних препаратів на адгезивні властивості мікроорганізмів / О.І. Жорняк, О.К. Стукан // Буковинський медичний вісник. – 2010. – Т. 14. – № 4. – С. 122–124.
2. Адгезивні властивості та антилізоцимна

активність свіжовилучених від хворих дітей шигел і сальмонел / І.А. Воронкіна, С.А. Деркач, А.І. Носатенко [та ін.] // Вісник СумДУ. Серія Медицина. – 2007. – № 2. – С. 38–43.

3. Жорняк О.І. Дія антисептичних засобів на патогенні механізми бактерій / О.І. Жорняк, О.К. Стукан, В.В. Сухляк // Annals of Mechnikov Institute. – 2010. – № 4. – С. 53–58. Режим доступу до журналу: <http://www.imiamn.org/journ/>.

4. Дія антибактеріальних засобів на патогенні механізми бактерій / В.М. Бойко, Ю.Л. Волянський, А.Ю. Волянський [та ін.] // Biomedical and biosocial anthropology. – 2008. – № 11. – С. 32–38.

5. Брилис В.И. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В.И. Брилис, Х.П. Ленцер, А.А. Ленцер // Лаб. дело. – 1989. – № 4. – С. 210–212.

6. Статистический анализ медицинских данных [Текст] / О.Ю. Реброва. – Москва : Медиа Сфера, 2006. – С. 60–74.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТАБЛЕТИРОВАННЫХ АНТИСЕПТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

Жорняк А. И.

*Винницкий национальный медицинский университет им. М. И. Пирогова
Ул. Пирогова, 56, 21018, Винница, Украина*

В работе представлены результаты изучения влияния антимикробных препаратов на адгезию грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Показано, что антисептические препараты (септефрил, себидин, аджисепт) подавляет адгезию бактерий. Самый низкий индекс адгезивности наблюдали в присутствии препарата септефрил.

Ключевые слова: адгезия, антисептические препараты, декаметоксин, септефрил, себидин, аджисепт.

ACTION OF THE PILL ANTISEPTICS ONTO ADHESION OF MICROORGANISMS

Zhornyak O. I.

*National Pirogov Memorial Medical University
56, Pirogova St., 21018, Vinnitsa, Ukraine*

The research results of antimicrobial agents' effects on the adhesion of gram-positive and gram-negative microorganisms were described. The studies have shown that antiseptics (such as septepril, sebidin, adzhysept) inhibited adhesion of bacteria. The lowest index of adhesiveness observed in the presence of septepril.

Key words: Adhesion, antiseptics, decamethoxin, septepril, sebidin, adzhysept.