

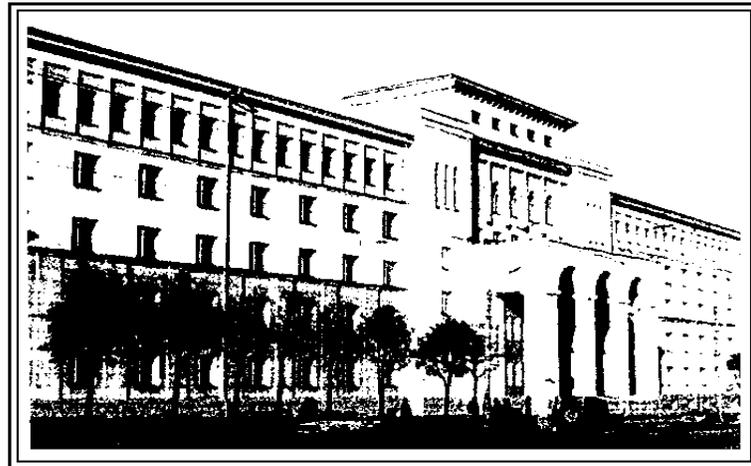
ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 14, №1

2015



УДК 615.28:582.:616.9-089

**НОВЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ АГЕНТЫ, СПОСОБНЫЕ РАЗРУШАТЬ МАТРИКС БИОПЛЕНОК
© Фролова А.В., Сенькович С.А., Плотников Ф.В.**

Витебский государственный медицинский университет, Беларусь, 210023, Витебск, ул. Фрунзе, 27

Резюме: Цель исследования – проанализировать способность биологически активных агентов, эффективных в отношении планктонных форм, воздействовать на экзополимерный матрикс биопленок.

Показано, что растительные извлечения и текстильные материалы, обработанные нано- и микрочастицами металлов, эффективные в отношении планктонных форм микроорганизмов, могут выступать в качестве перспективной альтернативы антибиотикам, благодаря их способности разрушать экзополимерный матрикс биопленок.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, биопленка, растительные извлечения, льняное волокно, наночастицы, «ФитоМП»

NEW ANTIMICROBIAL AGENT CAPABLE OF DESTROYING BIOFILMS MATRIX

Frolova A.V., Senkovich S.A., Plotnikov F.V.

Vitebsk State Medical University, Belarus, 210023, Vitebsk, Frunze St., 27

Summary: The aim of the study – to analyze the ability of biologically active agents that are effective against planktonic forms of microorganisms to affect the matrix of biofilms.

It is shown that the herbal extract and textiles treated metal nano- and microparticles effective against planktonic forms of microorganisms may serve as a promising alternative to antibiotics due to their ability to break down biofilms matrix.

Key words: antibiotic resistance, biofilms, herbal extracts, flax, nanoparticles, "PhytoMP"

Введение

Микробиологические исследования демонстрируют высокий, постоянно прогрессирующий уровень антибиотикорезистентности у вегетирующих в хирургических стационарах возбудителей [2, 3, 10, 15]. Укоренившееся восприятие бактерий, как одноклеточных форм жизни, с развитием техники и молекулярно-генетических методов исследования кардинально изменилось. В настоящее время уже неоспоримым является существование участвующих в патологическом процессе микроорганизмов в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ, окруженных экзополисахаридным матриксом, и функционирующих как скоординированный консорциум [1, 4, 12, 14].

Существуют различные пути преодоления факторов защиты бактерий в составе биопленок, среди которых увеличение концентрации антибактериальных препаратов, использование веществ, разрушающих полисахаридный матрикс или внеклеточную ДНК, применение ингибиторов *quorum sensing* [7]. Однако многообразие локализации и форм хронического и рецидивирующего инфекционного процесса свидетельствует об отсутствии единого подхода к профилактике образования и элиминации биопленок. Внеклеточный матрикс и его компоненты выступают в качестве барьера, уменьшающего концентрацию средства непосредственно возле бактерии. Поэтому особую актуальность на сегодняшний день представляет поиск антимикробных агентов, влияющих на жизнеспособность микроорганизмов в культуре и биопленках. При этом принципиально новым направлением выступает использование наночастиц металлов для придания специфических свойств модифицированным ими материалам [8, 9].

Цель исследования – проанализировать способность биологически активных агентов, эффективных в отношении планктонных форм, воздействовать на экзополимерный матрикс биопленок.

Методика

Для сравнительного анализа антимикробной активности в отношении биопленок возбудителей раневой инфекции были взяты полученные на оборудовании компании ERKO Truetzschler GmbH (Германия) образцы нетканых льносодержащих материалов: № 149 (лен 50% + полипропилен 50% + полиэфирная пленка толщиной 0,02 мм, иммобилизация наночастиц Ag 50 нм в структуру волокна), № 125 (лен 50% + полипропилен 50%, иммобилизация наночастиц Ag 25 нм в структуру волокна) и № 46 (ткань льняная 100% с напылением микрочастиц Cu размером 0,3 мкм). Образец № 139 был получен на опытно-производственном оборудовании ОАО «Научно-исследовательский институт нетканых материалов» (г. Серпухов, Московская область) на основе отбеленного медицинского льноволокна и обработан наночастицами серебра с размером 40 нм, для формирования которых использовался растительный настой «ФитомП» [5]. В качестве контроля использовался нетканый льносодержащий материал без обработки.

Мономикробные биопленки *S. aureus* ATCC 6538 и *P. aeruginosa* ATCC 9027 получены на нитроцеллюлозной мембране. Для этого 10 мл взвеси *S. aureus* ATCC 6538 и *P. aeruginosa* ATCC 9027 в концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл вносили в стерильную чашку Петри с мясо-пептонным агаром. Предварительно на агар помещали стерильную мембрану из инертного материала, на которой и происходило формирование биопленки. После 3 суток инкубации при температуре 37°C мембрану извлекали, биопленку с мембраны смывали стерильным физиологическим раствором. Для визуализации матрикса использован водный раствор Конго красного с добавлением 10% раствора Гвин 80 и 10% карболового фуксина. К полученной суспензии добавляли в избытке 0,5% раствор Конго красного. Суспензию дважды отмывали физиологическим раствором для удаления не связанного раствора Конго красного с осаждением матрикса центрифугированием при 1000 оборотов/минуту в течение 75 мин. после каждой отмывки. Суспензию замораживали и хранили при -25°C до использования.

Непосредственно перед проведением эксперимента готовили рабочую суспензию матрикса. Для этого 0,9% раствором NaCl разводили размороженную суспензию матрикса до оптической плотности 2,5 Еоп на многоканальном спектрофотометре при длине волны 492 нм и вносили по 0,15 мл суспензии матрикса в лунки 96-луночного планшета для иммуноферментного анализа. Далее 0,1 м раствором фосфатного буфера с pH 7,4 доводили оптическую плотность суспензии до 2 Еоп. В качестве консерванта в суспензию добавляли азид натрия до концентрации 2 мг/мл. Затем определяли способность антимикробного агента разрушать матрикс.

Реакционную смесь готовили из 0,1 мл объекта исследования и 0,3 мл рабочего раствора экзополимерного матрикса, в контрольных пробах использовали 0,1 мл 0,9% раствора натрия хлорида. После 24 час. инкубации при $t=37^\circ\text{C}$ в пробирках типа эппендорф проводили осаждение нераспавшихся компонентов матрикса путем центрифугирования при 10000 об/мин. в течение 10 минут. По 0,15 мл надосадка помещали в лунки полистиролового планшета для иммуноферментного анализа и определяли его оптическую плотность на спектрофотометре Ф-300 при $\lambda = 492$ нм. Высвободившийся при разрушении матрикса Конго красный изменял оптическую плотность раствора. Уровень активности объекта оценивали по формуле: $\text{Акт} = (E_{\text{оп}_0} - E_{\text{оп}_k}) \times 1000$, где $E_{\text{оп}_0}$ – оптическая плотность раствора образца, OD; $E_{\text{оп}_k}$ – оптическая плотность раствора в контрольной пробе, OD [11]. Определение активности каждого объекта проводили трехкратно. Также количественная характеристика разрушающей способности антимикробного агента оценена по концентрации (К) Конго красного, высвободившегося при разрушении комплекса красителя с компонентами экзополимерного матрикса, и рассчитана по формуле: $K_{\text{мкг/мл}} = [-0,004 + 0,049 \times (E_{\text{оп}} - E_k)] \times 1000$, где $E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность надосадка в опытной лунке, E_k – оптическая плотность надосадка в контрольной лунке. В качестве контроля использован физиологический раствор.

Способность антимикробного агента разрушать экзополимерный матрикс биопленки выявлена с помощью световой и конфокальной микроскопии.

Полученные данные обработаны с помощью прикладного пакета STATISTICA 7, MS Excel 2002 с использованием методов описательной статистики. Различия считались достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что как на самой нитроцеллюлозной мембране, так и под контрольным образцом нетканого льносодержащего материала (без обработки) формировалась микробная биопленка: на 1-й день – 10^3 КОЕ/см², на 3-й – 10^6 КОЕ/см², на 5-й – 10^9 КОЕ/см². При этом образцы металлизированных льносодержащих материалов на 1-й, 3-й, 5-й дни при

исследовании методом диффузии в агар обладали антимикробным эффектом в отношении культуры *S. aureus*. На рис. 1 продемонстрирована активность образцов в первые сутки эксперимента.

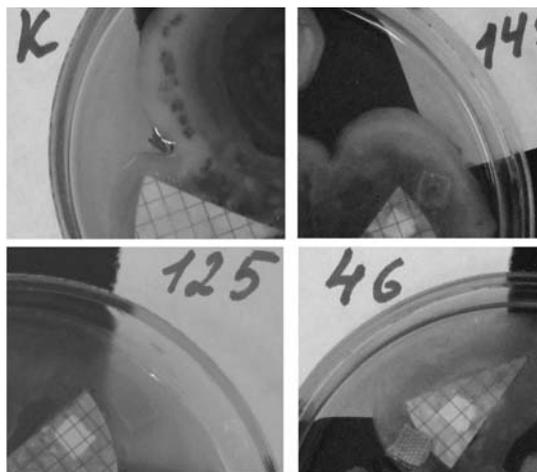


Рис. 1. Антимикробная активность образцов, обработанных частицами металла, в отношении биопленки возбудителя

На рис. 1 отчетливо видны участки нитроцеллюлозной мембраны, на которых в период формирования биопленки возбудителем находились соответствующие образцы текстильных металлизированных материалов (№№ 149, 125, 46).

При просмотре в системе «Leica DM 2000» с программным обеспечением «Leica application suit V.3.6.0, камера DFX 295» обнаружено, что нетканый сорбент № 139 на основе отбеленного медицинского льноволокна и обработанный наночастицами серебра с размером 40 нм, для формирования которых использовался растительный настой «ФитoМП», способен разрушать экзополимерный матрикс как *P. aeruginosa* ATCC 9027, так и *S. aureus* ATCC 6538, однако активность в отношении последнего более выражена (рис. 2).

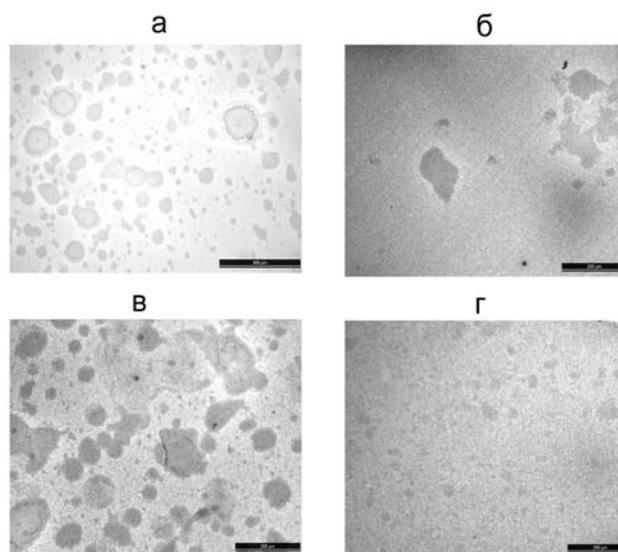


Рис. 2. Разрушение экзополимерного матрикса биопленки под действием нетканого льносодержащего образца № 139.

Примечание. сформированный матрикс: *P. aeruginosa* ATCC 9027 (а) и *S. aureus* ATCC 6538 (в); разрушенный: *P. aeruginosa* ATCC 9027 (б) и *S. aureus* ATCC 6538 (г)

При послыном сканировании на конфокальном микроскопе «Leica TCS SPE DMI 4000» с программным обеспечением «LAS AF» выявлено, что после обработки этим сорбентом поверхности нитроцеллюлозной мембраны происходит уменьшение толщины биопленки *S. aureus* ATCC 6538 со 112 мкм до 53 мкм (рис. 3).

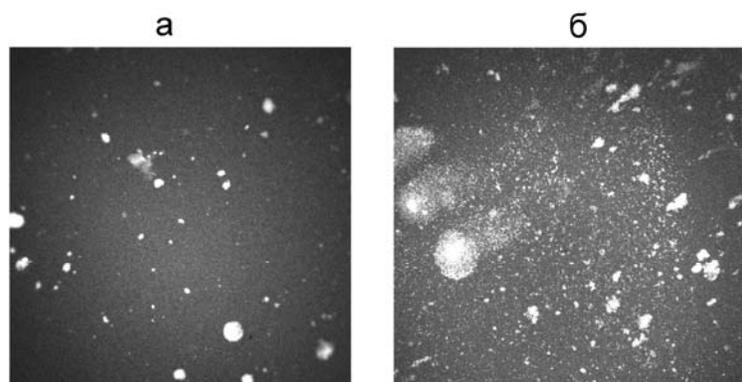


Рис. 3. Суспензия экзополимерного матрикса биопленки *S. aureus* ATCC 6538 после инкубации с 0,9% NaCl (а) и вытяжкой из нетканого льносодержащего образца № 139 (б) (конфокальная микроскопия, объектив 10х)

В настоящее время встречаются ссылки на исследования способности растительных соединений влиять на биопленки, но механизмы их антибиопленочного действия пока не раскрыты [11, 13]. С учетом полученных ранее данных о выраженной антимикробной и модифицирующей активности в отношении персистентного потенциала микроорганизмов у растительных извлечений представляло интерес выявить у них способность влиять на экзополимерный матрикс биопленок. О высокой активности позволяют судить количественные данные, отражающие взаимосвязь между интенсивностью разрушения комплекса биопленки с Конго красным и увеличением оптической плотности надосадка за счет высвобождения красителя. Ранее [6] было определено, что в 1 мл рабочей суспензии должно содержаться 12,2 мг сухого матрикса и 0,1 мг Конго красного.

Так, концентрация высвободившегося Конго красного при разрушении экзополимерного матрикса *S. aureus* ATCC 6538 под воздействием льняного сорбента № 139 составила 18,54 мкг/мл, взятых в качестве контроля – «Септоцида Р плюс» – 5,91 мкг/мл, фенолсодержащих эфирных масел «Базилика» – 3,35 мкг/мл, «Фенхеля» – 4,62 мкг/мл, «Чайного дерева» – 0,61 мкг/мл.

Уровни активности, полученные после 24 часов инкубации в пробирках типа эппендорф реакционной смеси из исследуемого образца и экзополимерного матрикса возбудителя, выраженные в оптической плотности при длине волны 492 нм, отражены в табл.

Таблица. Уровень активности образцов, расщепляющих экзополимерный матрикс *S. aureus* ATCC 6538

Образец	Оптическая плотность при длине волны 492 нм	Достоверность различий, р
Лен, пропитанный iSys	0,187±0,07	p<0,01
«Эвкалипт»	0,119±0,02	p<0,01
сетка «Асептика»	0,170±0,03	p<0,01
Акваспан, пропитанный iSys	0,145±0,02	p<0,01
Ag ⁰ , стабилизированное «ФитоМПом»	0,514±0,12	p<0,01
«Базилик»	0,204±0,00	p<0,01
«ФитоМП»	0,401±0,12	p<0,01
«Фенхель»	0,230±0,06	p<0,01
«Чайное дерево»	0,148±0,00	p<0,01
Контроль (NaCl)	0,054±0,00	

Примечание: Различия во всех опытных группах в сравнении с контрольной носили статистически значимый характер (p<0,05)

Заключение

Установленная выраженная активность в отношении планктонных и биопленочных форм возбудителей раневой инфекции у растительных извлечений, льносодержащих материалов, обработанных микрочастицами меди и наночастицами серебра, стабилизированного настоем «ФитоМП», демонстрируют перспективность биологически активных компонентов растительного происхождения в качестве антимикробных агентов, альтернативных традиционным.

Литература

1. Афиногенова, А.Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А.Г. Афиногенова // Травматол. и ортопедия России. – 2011. – №3. – С. 119-125.
2. Бархатова Н.А. Динамика резистентности возбудителей локальных и генерализованных форм инфекций мягких тканей // Казан. мед. журнал. – 2009. – Т.90, №3. – С. 385-390.
3. Белоцерковский Б.З. Антибиотики в хирургии и интенсивной терапии // Инфекции в хирургии. – 2009. – Т.7, №2. – С. 70-76.
4. Гинцбург, А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина / А.Л. Гинцбург, Ю.М. Романова // Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2011. – №3. – С. 99-109.
5. Косинец А.Н., Фролова А.В., Булавкин В.П. «ФитоМП». Целесообразно ли применение фитосредств при хирургической инфекции? // Новости хирургии. – 2006. – №1. – С. 20-29.
6. Плотников Ф.В. Комплексное лечение пациентов с гнойными ранами в зависимости от способности микроорганизмов-возбудителей формировать биопленку // Новости хирургии. – 2012. – №5. – С. 575-581.
7. Aslam S., Darouiche R.O. Role of antibiofilm-antimicrobial agents in controlling device-related infections // Int. J. Artif. Organs. – 2010. – N34. – P. 752-758.
8. Cavanagh M.H. Evaluating antimicrobial efficacy of new commercially available silver dressings // Int. Wound J. – 2010. – V.7, N5. – P. 394-405.
9. Cencetti C. Preparation and characterization of antimicrobial wound dressings based on silver, gellan, PVA and borax // Carbohydr. Polymers. – 2012. – V.90, N3. – P. 1362-1370.
10. Eady E.A., Cove J.H. Staphylococcal resistance revisited: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2003. – N16. – P. 103-124.
11. Effects of cranberry extracts on growth and biofilm production of *Escherichia coli* and *Staphylococcus* species / K.L. LaPlante, S.A. Sarkisian, S. Woodmansee et al. // Phytother. Resurch. – 2012. – Vol.6, No9. – P. 1371-1374.
12. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections // Cell. Microbiol. – 2009. – N11. – P. 1034-1043.
13. Silva M.S., Brandao D.O., Chaves T.P. et al. Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms [Электронный ресурс] // Evid. Based Complement. Alternat. Med. – 2012. – N681207. – Режим доступа : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
14. Sutherland I.W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework // Microbiology. – 2001. – V.147, Pt.1. – P. 3-9.
15. Plowman R. The rate and cost of hospital-acquired infections occurring in patients admitted to selected specialties of a district general hospital in England and the national burden imposed // J. of Hospital Infection. – 2001. – N47. – P.198-209.

Информация об авторах

Фролова Аэлита Валерьевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры клинической микробиологии УО «Витебский государственный медицинский университет». Респ. Беларусь. E-mail: aelita_frolova@tut.by

Сенькович Сергей Алексеевич – кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической микробиологии УО «Витебский государственный медицинский университет». Респ. Беларусь. E-mail: vokul@tut.by

Плотников Филипп Викторович – ассистент кафедры госпитальной хирургии с курсом урологии. Респ. Беларусь. E-mail: plotnikov@mail.ru