

ВПЛИВ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ПЕКТИНУ НА АДГЕЗИВНІ ВЛАСТИВОСТІ КЛІНІЧНИХ ІЗОЛЯТІВ, ОТРИМАНИХ ВІД ХВОРИХ НА МУКОВІСЦИДОЗ

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (м. Дніпро)

med.oksana2017@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота виконана згідно плану НДР кафедри пропедевтики дитячих хвороб та кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» на 2017-2021 рр. «Бронхіти у дітей з коморбідними станами: клінічний перебіг та їх сучасна етіологія» (№ державної реєстрації 0116U004962).

Вступ. Муковісцидоз (МВ) – генетичне захворювання з аутосомно-рецесивним типом успадкування. При МВ вражаються усі органи і системи, і до початку ери антибіотиків більшість випадків були летальними у перші роки життя [1]. Дисфункція трансмембранно-регуляторного білка муковісцидозу (ТРБМ) при МВ в легенях призводить до порушення транспорту іонів натрію та карбонатів, зниження мукоциліарного кліренсу та обтурації дихальних шляхів в'язким слизом. Це створює умови для появи хронічної бронхолегеневої інфекції, що є основною причиною захворюваності та смертності серед пацієнтів з МВ [1-4].

Хронічна інфекція при МВ пов'язана з утворенням біоплівки мікроорганізмами. Формування біоплівки починається з адгезії мікроорганізмів до живих або абіотичних поверхонь. Адгезія в результаті молекулярної взаємодії між адгезинами мікроорганізму та рецепторами макроорганізму є специфічною і незворотною. Варто зазначити, що *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus* мають такі адгезини, які надають їм здатності колонізувати епітелій саме дихальних шляхів [4]. Адгезини – поверхневі структури мікробних клітин, що містять макромолекули лектинів та протеїнів здатних комплементарно зв'язуватись з рецепторами чутливої еукаріотичної клітини. Адгезивна здатність стафілококів виражена у відношенні епітеліальних клітин, фібрoneктину, колагену, фібриногену та ін. Проте білок А клітинної стінки стафілококів не тільки зв'язується з фібрoneктином (адгезивний глікопротеїн позаклітинного матриксу), але й володіє антифагоцитарними властивостями [5]. Адгезія до клітин епітелію у *P. aeruginosa* реалізується мікрворсинками, а її нейрамінідаза полегшує таку специфічну взаємодію. *P. aeruginosa* з мукоеїдним фенотипом синтезують слиз з великою кількістю альгінату. Мікроорганізми *S. aureus* та *P. aeruginosa* утворюють капсулу полісахаридної природи. Така дія факторів патогенності мікроорганізму на ряду з дефектом ТРБМ відіграє провідну роль у їх персистенції [6-8].

Після адгезії мікроорганізмів одразу починається продукція матриксу, а зрілі біоплівки викидають в оточуюче середовище планктонні клітини для заселення нових територій.

Морфологічно біоплівки є організованими консорціумами мікробних клітин резистентних до механічного кліренсу, фагоцитозу, антимікробної терапії [6-10]. У біоплівках стійкі до антибіотиків клітини ви-

діляють антибіотикзв'язуючі протеїни та відбувається обмін детермінантами хіміорезистентності. Окрім того, відсутність процесів біосинтезу у метаболічно неактивних клітин-персистерів робить їх невразливими до дії хіміопрепаратів. Відомо, що біоплівки синьогнійної палички є в десятки разів стійкішими до дії усіх бета-лактамних антибіотиків, ніж ізоляти, які не утворюють біоплівок [8]. Таким чином, можливості впливу на патогени, що знаходяться у складі біоплівки, істотно обмежені [7-10].

Використання про- та пребіотиків в якості ад'ювантів до основної терапії ряду патологічних станів сьогодні широко обговорюється. Прикладом є вивчення протимікробної активності пектину. Повідомлялося, що олігогалактуронід пектину виявляє антиоксидантну активність, здатен інгібувати окислення ліпідів, має антибактеріальний ефект на патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми [11].

З огляду на вище сказане, вважаємо, що вплив на адгезивну здатність мікроорганізмів з метою профілактики хронічної інфекції при МВ з використанням природного пектину є перспективним питанням для вивчення [7-12].

Мета роботи – вивчити вплив різних концентрацій пектину на адгезивні властивості клінічних ізолятів *P. aeruginosa* та *S. aureus*.

Об'єкт і методи дослідження. На базі наукової лабораторії кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України» проведено бактеріологічне дослідження 20 клінічних ізолятів з музею культур кафедри. Ізоляти були отримані з патологічного матеріалу з дихальних шляхів дітей хворих на муковісцидоз. Рандомізовано відібрано по 10 ізолятів *P. aeruginosa* та *S. aureus*.

Для визначення адгезивних властивостей мікроорганізмів був застосований метод Бриліса В. І. та співавторів з використанням комерційно доступних еритроцитів барана. Визначали такі показники: СПА – середній показник адгезії, тобто середня кількість мікроорганізмів, що прикріпилися до поверхні одного еритроцита при підрахунку не менше 25 еритроцитів, враховуючи не більше п'яти з них в одному полі зору; КУЕ – коефіцієнт участі еритроцитів, тобто відсоток еритроцитів, що мають на своїй поверхні адгезовані мікроорганізми; ІАМ – індекс адгезивності мікроорганізму, середня кількість мікробних клітин на еритроциті, враховуючи тільки еритроцити, що беруть участь в адгезивному процесі. Формула для підрахунку ІАМ = (СПА/КУЕ) x100.

Мікроорганізми вважали неадгезивними при ІАМ ≤ 1,75, низькоадгезивними – від 1,76 до 2,5, середньоадгезивними – від 2,51 до 4,0, високоадгезивними – при ІАМ від 4,00. Мазки еритроцитів з ад-

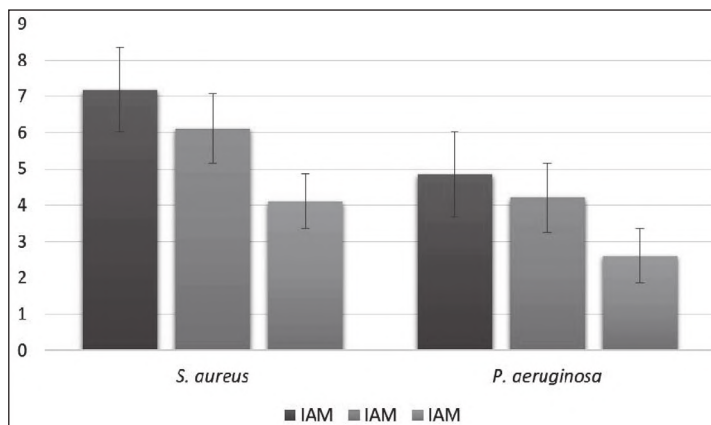


Рисунок 1 – Адгезивні властивості клінічних ізолятів, отриманих від хворих на муковісцидоз.

гезованими на них мікроорганізмами фарбували за Романовським-Гімзою [13].

Далі в експерименті вивчали вплив різних концентрацій пектину на адгезивні властивості наведених тест-культур. Для цього після першого дослідження протягом однієї години культивували 1 мл суспензії мікроорганізмів, 1,0 за McFarland, в 1 мл розчинах пектину 10 мг/мл і 50 мг/мл. Далі повторно визначали адгезивні властивості зазначених ізолятів за вище наведеною методикою. Показники адгезії порівню-

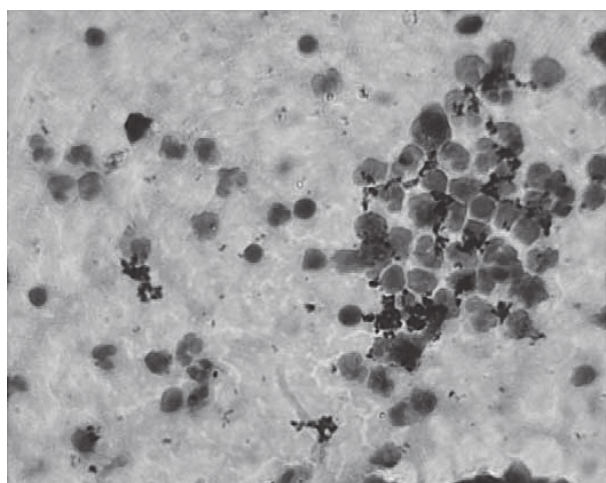


Рисунок 2 – Адгезія *P. aeruginosa* до еритроцитів барана.

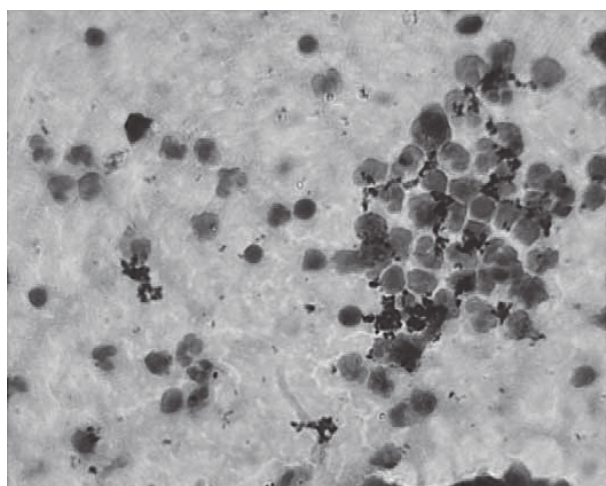


Рисунок 3 – Адгезія *P. aeruginosa* до еритроцитів барана після інкубації в розчині пектину.

вали до та після культивації. Статистична обробка даних – Microsoft Office Excel 2010.

Результати дослідження та їх обговорення. Для проникнення крізь захисні бар'єри макроорганізму та подальшої персистенції в ньому бактерії повинні мати високу здатність заселяти слизові оболонки біологічних ніш людини. Адгезія є одним із факторів, що забезпечують колонізацію та їх подальше розмноження в певних біотопах. Отже, адгезивність мікроорганізмів до еукаріотичних клітин є початковою ланкою патогенезу при розвитку інфекційних захворювань. Адгезія мікроорганізмів є важливим фактором вірулентності, і визначає перший етап колонізації субстратів [13].

Результати вивчення адгезивних властивостей ізолятів *P. aeruginosa* та *S. aureus* необроблених та на фоні впливу 1% та 5% розчинів пектину наведені та узагальнені у **рис. 1**.

При вивченні адгезивних властивостей клінічних ізолятів *P. aeruginosa* (**рис. 2**) та *S. aureus* таких, що мали низькі показники адгезії або неадгезивних не було. Клінічні ізоляти *S. aureus* мали високу здатність до адгезії. Серед усіх досліджуваних штамів золотистих стафілококів 2 ізоляти (20%) були середньоадгезивними, а решта 80% – мали високі адгезивні властивості.

Половина клінічних ізолятів *P. aeruginosa* мала середні показники адгезії, а інша половина – високі. Такі результати свідчать про високий вірулентний потенціал цього представника грамнегативної мікробіоти.

В численних дослідженнях доведено, що адгезивні властивості мікроорганізмів змінюються внаслідок впливу на них антибіотиків, тому ми намагалися перевірити, чи є такий самий зв'язок з пектином.

Було оцінено зміну IAM під впливом розчинів пектину двох різних концентрацій (**рис. 1**).

Відзначимо, що досліджувані культури по-різному реагували на даний полісахарид. Після культивування в 1% розчині пектину достовірних змін IAM для обох культур не було, проте тенденція до зменшення адгезивності все ж спостерігалася.

Суттєве зменшення адгезивних властивостей *P. aeruginosa* (**рис. 3**) та *S. aureus* спостерігалася після культивування завесу мікроорганізму у 5% розчині пектину. Варто зазначити, що грампозитивні стафілококи залишалися середньоадгезивними, проте високоадгезивних не було.

На противагу стафілококам, псевдомонада показала такі результати: в присутності 5% розчину пектину її адгезивні властивості значно зменшилися (**рис. 3**), більшість була представлена середньоадгезивним, проте зустрічалися і ізоляти з низькою здатністю до адгезії (30%).

Виявлено зворотній сильний кореляційний зв'язок між застосуванням 5% розчину пектину та зменшенням IAM. Коефіцієнт кореляції становив -0,82 ($p=0,042$) для *S. aureus* і -0,70 ($p=0,036$) для *P. aeruginosa*.

Можна стверджувати, що в даному дослідженні наші не суперечать попереднім роботам з вивчення впливу пектину на умовно-патогенні та патогенні мікроорганізми.

Подібно до наших результатів, в роботі колег з Арменії показано, що використання різних концентрацій пектину достовірно впливало на здатність до виживання клінічних ізолятів *Escherichia coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* та ін. [10].

Дані вітчизняної літератури свідчать, що присутність в поживному середовищі 20 мг/мл і 10 мг/мл яблучного пектину достовірно пригнічує інтенсивність утворення біоплівки стафілококами та стрептококами, виділеними від пацієнтів з гнійно-запальними ускладненнями після екстракції зубів [12]. Здатність до адгезії до біотичної поверхні є першим етапом утворення біоплівки, тому вважаємо за необхідне продовжити наші дослідження.

Висновки. Здатність до адгезії у мікроорганізмів, виділених від пацієнтів з муковісцидозом, є високою та середньою.

Використання пектину впливає на здатність до адгезії у *S. aureus* та *P. aeruginosa*.

Використання 5%-розчину пектину достовірно знижує здатність до адгезії у *S. aureus* та *P. aeruginosa*, виділених від хворих на муковісцидоз.

Перспективи подальших досліджень. В даній статті ми вже згадували, що адгезія мікроорганізмів до біотичної чи абіотичної поверхні є першим етапом формування біоплівки. Тому вважаємо за доцільне, продовжити дані дослідження та оцінити вплив різних концентрацій пектину на біоплівкоутворення у стаціонарній моделі *in vitro*. Окрім того, цікаво було б дослідити чутливість до антибіотиків зазначених мікроорганізмів під дією пектину.

Література

- Gilligan PH. Infections in patients with Cystic Fibrosis: diagnostic microbiology update. Clin Lab Med. 2014;34(2):197-217.
- Ilchenko SI. Kliniko-mikrobiologichni osoblyvosti perebihu mukovistsydozu u ditey velykoho promyslovoho mista. Pathologia. 2014;3(32):73-7. [in Ukrainian].
- Huang YJ, Li Puma JJ. The Microbiome in Cystic Fibrosis. Clin Chest Med. 2016;37(1):59-67.
- Lezhenko GO, Abaturon OYe. Patohenetychne znachennya protymikrobnnykh peptydiv u realizatsiyi antybakterial'noho zakhystu u ditey khvorykh na mukovistsydoz. Zdorovya dityny. 2013;3(46):44-9. [in Ukrainian].
- Zhornjak OI, Stukan OK, Suchljak VV. Diya antyseptychnykh zasobiv na patohenni mekhanizmy bakteriy. Annaly Mechnikovskogo instituta. 2010;4:53-8. [in Ukrainian].
- Lazareva AV, Chebotar IV. Pseudomonas aeruginosa: patohennist', patohenez ta khvoroba. Klinichna mikrobiologiya ta antymikrobnna khimioterapiya. 2015;3(17):170-86. [in Ukrainian].
- Trofimenko YuYu. Biologichni osoblyvosti mikroflory shcho kolonizue endotrachealni trubky u viddilennykh intesyvnoi terapii. Dysertatsiya na zdobuttya naukovooho stupennya kandydata medychnykh nauk. Vinnyts'kyy natsional'nyy medychnyy universytet imeni Pyrohova MI. Vinnytsia: 2015. 127 s. [in Ukrainian].
- Balko AB, Balko OI, Avdeeva LV. Formuvannya bioplivky shtamamy pseudomonas aeruginosa ukrayins'koyi kolektsiyi mikroorhanizmv. Mikrobiologichni zhurnal. 2013;75(2):50-6. [in Ukrainian].
- Galkin MB, Ivanysia VO, Galkin BM, Filipova TO. Matryks bioplivky – khimichnyy sklad, struktura, funktsiyi. Mikrobiologiya ta biotekhnologiya. 2016;4:6-27. [in Ukrainian].
- Khatko ZN, Ashinova AA. Issledovaniye antibakterial'noy aktivnosti pektinovykh rastvorov po otnosheniyu k klinicheskim shtammam mikroorganizmov. Nauchno-teoreticheskiy zhurnal «Tekhnologii pishchevoy i pererabatyvayushchey promyshlennosti APK – produkty zdorovogo pitaniya». 2017;1:105-9. [in Russian].
- Ming-Chang Wu, Hui-chin Li, Po-Hua Wu, Ping-Hsiu Huang, Yuh-Tai Wang. Assessment of Oligogalacturonide from Citrus Pectin as a Potential Antibacterial Agent against Foodborne Pathogens. Journal of Food Science. 2014;8(79):1541-4.
- Haioshko EB. Mikrobiologichna aktyvnist' ridkoyi farmakopeynoyi formy yabluchnoho pektynu pry rozrobtsi opoliskuvachiv dlya porozhnnyy rota v doslidakh in vitro. Svit medytsyny ta biolohiyi. 2016;2(56):21-4. [in Ukrainian].
- Krasiy NI. Biologichni osoblyvosti ta dynamica formuvannya antybiotyco resyistentnosti mikroorganizmamy u patsientiv z shtuchnoyu ventylatsiyeyu legen [dysertatsiya]. Ternopil's'kyy natsional'nyy medychnyy universytet. Ternopil: 2016. 172 s. [in Ukrainian].

ВПЛИВ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ПЕКТИНУ НА АДГЕЗИВНІ ВЛАСТИВОСТІ КЛІНІЧНИХ ІЗОЛЯТІВ, ОТРИМАНИХ ВІД ХВОРИХ НА МУКОВІСЦИДОЗ

Ищенко О. В., Плотникова М. М., Столетова Ю. Ю., Шарун О. В., Степанський Д. О.

Резюме. Хронічна інфекція пов'язана з формуванням біоплівки мікроорганізмами, яке починається з їх адгезії до поверхонь. Метою роботи було вивчити вплив пектину на адгезивні властивості клінічних ізолятів *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus*, виділених від пацієнтів з муковісцидозом. Вивчення адгезивних властивостей за методикою Бриліса В. І. Встановили, що використання 5%-розчину пектину пригнічує здатність до адгезії у клінічних ізолятів, виділених від хворих на муковісцидоз.

Ключові слова: муковісцидоз, пектин, адгезія, *P. aeruginosa*, *S. aureus*.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ПЕКТИНА НА АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ

Ищенко О. В., Плотникова М. М., Столетова Ю. Ю., Шарун А. В., Степанский Д. А.

Резюме. Хроническая инфекция связана с формированием биопленки микроорганизмами, которое начинается с их адгезии к поверхностям. Целью работы было изучить влияние пектина на адгезивные свойства клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, полученных от пациентов с муковисцидозом. Изучение адгезивных свойств по методике Брилиса В. И. Установили, что использование 5%-раствора пектина снижает способность к адгезии у клинических изолятов, выделенных от больных муковисцидозом.

Ключевые слова: муковисцидоз, пектин, адгезия, *P. aeruginosa*, *S. aureus*.

THE EFFECT OF VARIOUS CONCENTRATIONS OF PECTIN ON ADHESIVE PROPERTIES OF CLINICAL ISOLATES OBTAINED FROM PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS

Ishchenko O. V., Plotnikova M. M., Stoletova Yu. Yu., Sharun O. V., Stepanskyi D. O.

Abstract. Cystic fibrosis is a genetic disorder with an autosomal recessive type of inheritance. Chronic bronchopulmonary infection is the main cause of morbidity and mortality among such patients. Chronic infection is associated with the formation of a biofilm by microorganisms, especially *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Biofilm-formation starts with adhesion of microorganisms to biotic or abiotic surfaces. The research objective was to study the effect of various concentrations of pectin on adhesive properties of clinical isolates of *P. aeruginosa* and *S. aureus* obtained from patients with Cystic Fibrosis.

Methods. We used bacteriological, biochemical, microscopic methods. We performed the study of adhesive properties by the method of Brilis V.I. and co-authors with using of commercially available ram erythrocytes. The following indices were determined: the average adhesion index when counting at least 25 erythrocytes, including no more than five of them in one field of view; the participation rate of erythrocytes; microbial adhesive index, taking into account only the erythrocytes involved in the adhesive process.

Results. Clinical isolates from patients with Cystic Fibrosis had high and medium ability to adhere. After incubation in 1% pectin solution, we observed a tendency to decrease in adhesiveness. The change in the average adhesion index under the influence of solutions with two different pectin's concentrations was evaluated After incubation in 5% pectin solution we noted a significant decrease in the adhesiveness index of *S. aureus* and *P. aeruginosa*. A strong correlation was found between 5% pectin solution and a decrease in the average adhesion index. The correlation coefficient was -0,82 ($p = 0,042$) for *S. aureus* and -0,70 ($p = 0,036$) for *P. aeruginosa*.

Conclusions. The use of a 5% pectin solution reduces the ability to adhere to clinical isolates isolated from patients with cystic fibrosis. We consider it is advisable to continue these experiments and to evaluate the effect of different concentrations of pectin on biofilm formation in a stationary model in vitro. In addition, it would be interesting to investigate the sensitivity to antibiotics of these microorganisms under the action of pectin.

Key words: Cystic Fibrosis, pectin, adhesiveness, *P. aeruginosa*, *S. aureus*.

Рецензент – проф. Небесна З. М.
Стаття надійшла 31.01.2020 року

DOI 10.29254/2077-4214-2020-1-155-140-145

УДК 616-001.4-036.12:579.61

¹Касрашвілі Г. Г., ²Ксьонз І. В., ¹Гюльмамедов П. Ф., ¹Андрєєв О. В., ¹Колеснік Г. І.

ОСОБЛИВОСТІ МІКРОБНОГО КОМПОНЕНТУ ПАЦІЄНТІВ З ХРОНІЧНИМИ РАНАМИ

¹Донецький національний медичний університет (м. Лиман)

²Українська медична стоматологічна академія (м. Полтава)

Giga03@i.ua
ivksonz@ukr.net

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дослідження проводилося в рамках науково-дослідної роботи кафедри хірургії, ендоскопії та реконструктивно-відновної хірургії та кафедри загальної та дитячої хірургії «Діагностика та комбіноване лікування запально-деструктивних та онкологічних захворювань органів і систем для обґрунтування використання схем клітинних і тканинних технологій», № державної реєстрації 0116U008235.

Вступ. Роль та значення мікроорганізмів у загоєнні ран обговорюються вже багато років. При цьому ряд експертів вважають, що вирішальне значення для прогнозування загоєння ран і інфекції має рівень бактеріальної контамінації [1], інші, навпроти, віддають перевагу типам мікроорганізмів. Однак ці та інші фактори, такі як мікробний синергізм, імунна відповідь пацієнта, стан м'яких тканин повинні враховуватися разом при оцінці ймовірності інфікування.

Рівень бактеріальної контамінації 10^6 або більше на грам тканини, як правило, розглядається як інфекція, тому що це негативно позначається на загоєнні ран. У наслідок розмноження бактерії затягується нормальна фаза ранового процесу, що веде до дегенеративних змін в рані [2]. Хронічні рани, які не загоюються більше 3 місяців, з меншою ймовірністю мають симптоми явного запалення. В цьому випадку, хронічна ранова інфекція визначається збільшен-

ням виразок, ексудату, наявністю нездорової грануляційної тканини [3].

Створена система, яка дозволяє проаналізувати причини невдачі в загоєнні ран. Дана система отримала назву Т.І.М.Е. та схвалена міжнародною групою фахівців з лікування ран: Т (Tissue) – загоєнню рани перешкоджають некротизовані, неповноцінні або сторонні тканини в рані; І (Infection or inflammation) – загоєнню рани перешкоджають інфекція або виражена запальна відповідь; М (Moisture imbalance) – загоєнню рани перешкоджає надлишкова ексудація або рана навпаки не має вологого середовища («суха» рана); Е (edge) – гиперкератоз, надлишкові грануляції або інші причини перешкоджають епітелізації з країв рани [4].

В оновленому керівництві міжнародного інституту ранової інфекції (2016 р.) прийнятий новий спосіб класифікації ранової інфекції як етапів в середовищі (табл. 1).

Оновленим керівництвом, також запропоновано при обговоренні ранової інфекції використовувати більш широкий термін «мікробний», а не «бактеріальний», оскільки він зачіпає інші мікроорганізми, які можна виявити в ранах, такі як гриби [5].

Мета роботи. Визначити і проаналізувати особливості мікробного компонента хронічних ран в залежності від етіологічного фактору.