

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ імені Д.К. ЗАБОЛОТНОГО
НАН УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ДУБОВИК ОЛЕНА СЕРГІЇВНА

УДК:579.61.085:616.5-002.3-085.281-085.831(043.3)

ДИСЕРТАЦІЯ

ЧУТЛИВІСТЬ ЗБУДНИКІВ ГНІЙНО-ЗАПАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ
ШКІРИ ДО КОМПЛЕКСНОЇ ДІЇ АНТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА
СВІТЛОДІОДНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ *IN VITRO* ТА *IN VIVO*

03.00.07 - мікробіологія

Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук.
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.



О.С. Дубовик

Науковий керівник: _____ Мішина Марина Митрофанівна
(професор, доктор медичних наук)

Харків – 2020

АНОТАЦІЯ

Дубовик О.С. Чутливість збудників гнійно-запальних захворювань шкіри до комплексної дії антимікробних препаратів та світлодіодного випромінювання *in vitro* та *in vivo*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 «Мікробіологія» – Харківський національний медичний університет МОЗ України, Харків, 2020. Інститут мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України, Київ, 2020.

Дисертація присвячена вивченню впливу світлодіодного випромінювання та протимікробних засобів на планктонні клітини та біоплівки мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних захворювань (ГЗЗ). В роботі обґрунтовано практичне вирішення актуального завдання – визначено дію синього та червоного спектрів світлодіодного випромінювання та протимікробних препаратів на планктонну та біоплівкову форму існування збудників ГЗЗ шкіри на підставі оцінки мікробіологічних, імунологічних та морфологічних ознак.

В результаті проведених досліджень було встановлено, що етіологічними чинниками ГЗЗ шкіри у дітей були як грамнегативні, так і грампозитивні умовно-патогенні мікроорганізми. В загальній структурі збудників цих інфекцій переважали *S. aureus*, доля яких складала 36,4%. Серед грамнегативних клінічних штамів переважали *E. coli*, *Proteus spp.*, що виділяли у 17,4 та 14,7 % випадків відповідно. Вказані види мікроорганізмів виділяли з біологічного матеріалу як у монокультури (*S. aureus* – 26,9 %), так і в асоціації з іншими мікроорганізмами. У складі мікст-культур переважали *S. aureus* + *E. coli* (16,4 %), *S. aureus* + *S. pyogenes* (25,4 %) та *S. aureus* + *P. mirabilis* у 14,9 % випадків.

При визначенні чутливості до протимікробних препаратів бактерій було встановлено, що найбільш активними по відношенню до грамнегативних клінічних штамів мікроорганізмів були амоксиклав, імipенем, гатіфлоксацин, ципрофлоксацин і цефепім, які пригнічували ріст від 65,6 до 91,7 % досліджуваних штамів. Інші протимікробні препарати виявились не активними. Слід відзначити, що до гентаміцину, стійкість до якого вважається маркером внутрішньолікарняних штамів були чутливими лише 28,5 – 46,8 % штамів.

Грампозитивні умовно-патогенні мікроорганізми у планктонній формі були високочутливими до цефепіму та імipенему. Пригнічення росту цими препаратами було зафіксовано у 95,5% штамів *S. aureus* та 91,3% *S. pyogenes*. Також достатньо високу активність проявляли: ампіцилін, амоксиклав, цефоперазон, гатіфлоксацин, імipенем та ванкоміцин, що пригнічували ріст від 62,7 до 91,3% досліджуваних штамів.

Оскільки ефективність протимікробної терапії залежить часто від форми існування мікроорганізмів, було вивчено здатність утворювати біоплівки дослідними клінічними штамами. Встановлено, що 100% досліджуваних штамів характеризувалися здатністю утворювати біоплівки, які є надійним захистом мікроорганізмів від несприятливих факторів зовнішнього середовища, зокрема протимікробних препаратів. Це опосередковано вказує на те, що ці штами, навіть за чутливості до певних антибактеріальних препаратів можуть бути до них стійкими *in vivo*. Інфекції, викликані такими штамами можуть не піддаватися лікуванню. Тому наступним етапом дослідження було визначення активності антибактеріальних препаратів на біоплівки *in vitro*. При визначенні чутливості до антибактеріальних препаратів ізолятів грамнегативних мікроорганізмів у біоплівковій формі, встановлено, що майже всі штами були резистентними до них. Чутливість досліджуваних штамів складала від 0 до 33,3%. Отримані дані підтверджують той факт, що чутливість до протимікробних препаратів мікроорганізмів, які асоційовані у біоплівки, не

відповідає такій, що визначена для мікроорганізмів у планктонній формі існування і буде створюватиме значні труднощі при терапії ГЗЗ.

Оскільки *E. coli*, *P. mirabilis* та *S. aureus* були домінуючими збудниками ГЗЗ шкіри та мали високий рівень антибіотикорезистентності, доцільно було проаналізувати профілі антибіотикорезистентності цих збудників. Встановлено, що найбільша кількість полірезистентних штамів, а саме 83,6%, стійких до 4 і більше антибіотиків, виявлялась серед *S.aureus*. Однак 76,2% і 50% штамів *P.mirabilis* і *E.coli*, відповідно, також відносились до полірезистентних.

В даний час у клінічній практиці і біомедичних дослідженнях широко використовується оптичне випромінювання різного спектрального складу для лікування ГЗЗ бактеріальної природи, а також при фізіотерапевтичних процедурах. Проте, дані про вплив синього та червоного спектрів випромінювання на збудники ГЗЗ майже відсутні.

Для проведення експериментальних досліджень було розроблено пристрій для впливу оптичного випромінювання на патогенні бактерії та спосіб визначення впливу світлодіодного випромінювання на мікроорганізми *in vitro*. Встановлено, що світлодіодне випромінювання синього спектра пригнічує здатність планктонних клітин формувати біоплівки, а червоний спектр – активує утворення планктонних клітин з подальшим формуванням щільної біоплівки мікроорганізмів, що можна пояснити активацією метаболічних процесів в бактеріальній клітині. При комплексній дії червоного світлодіодного випромінювання та цефепіму підвищувалася чутливість бактерій до протимікробного препарату, що можна пояснити тим, що червоне світлодіодне випромінювання сприяє прискоренню експоненціального росту клітин, а бактерицидний ефект цефалоспоринів, зокрема цефепіму, реалізується тільки у процесі росту й розмноження бактерій. За дії синього світлодіодного випромінювання та цефепіму спостерігається пригнічення росту бактерій, що можна пояснити синергізмом, який проявляється на тлі послаблення бар'єрної функції

клітинних мембран, що викликано впливом на них атомарних форм кисню за дії світлодіодного випромінювання синього спектра з одного боку та з другого – безпосередньої дії цефепіму на клітинну стінку бактерій, що й викликає біоінгібіцію.

При визначенні оптимальної комбінації для максимального пригнічення утворення добових біоплівок, продукції планктонних клітин і формування вторинних біоплівок із застосуванням світлодіодного випромінювання синього і червоного спектрів та антисептичних засобів було встановлено, що використання хлоргексидину з подальшим опроміненням синім світлом та пероксиду водню з подальшим опроміненням червоним світлом є найбільш доцільним.

Встановлено, що світлодіодне випромінювання синього та червоного спектрів комплексно з антимікробним препаратом цефалоспоринового ряду цефепімом пригнічує утворення планктонних клітин з наступним блокуванням формування щільних біоплівок.

Ефективність комбінованої терапії із застосуванням синього та червоного світлодіодів при експериментальній локалізованій гнійно-запальній протейній інфекції оцінювали за ступенем загоювання осередку запалення. Було виявлено, що загоювання гнійно-запального вогнища при лікуванні тільки цефепімом було зафіксовано на 12 добу. Комплексне застосування світлодіодного випромінювання з цефалоспориновим хіміотерапевтичним препаратом виявило тенденцію до більш швидкого загоювання осередку запалення – цефепім з червоним світлодіодним випромінюванням – на 9 добу; цефепім з синім світлодіодним випромінюванням – на 6 добу; цефепім з червоним та синім випромінюванням – на 5 добу. Реєструючи динаміку загоєння осередку запалення при локалізованій гнійно-запальній інфекції, можна зробити висновок про те, що найбільш оптимальною та раціональною, з точки зору швидкості загоєння вогнища запалення і витрати на лікування, є комбінація

антимікробного препарату цефепіму та синього і червоного світлодіодного випромінювання протягом 5 хвилин на осередок запалення.

При експериментальному дослідженні локалізованого гнійно-запального процесу за впливу світлодіодного випромінювання синього й червоного спектрів на активність фагоцитозу було встановлено, що інтегральні показники фагоцитозу у тварин інфікованої групи (2 групи – позитивний контроль) дорівнювали: фагоцитарне число (ФЧ) – $1,5 \pm 0,2$ та фагоцитарний індекс (ФІ) – $41,4 \pm 1,4\%$ були нижче контрольних значень ($3,8 \pm 0,2$ й $80,1 \pm 1,3\%$ відповідно). Аналізуючи динаміку цих показників під впливом світлодіодного випромінювання синього й червоного спектрів *per se* й комплексно з цефепімом встановлено, що в групах піддослідних тварин, яким вогнище запалення піддавали опроміненню синім світлодіодом інтегральні показники фагоцитозу практично не відрізнялися від групи тварин позитивного контролю. За впливу червоного спектра світлодіодного випромінювання ФІ мав тенденцію до підвищення в порівнянні з показником контрольної групи інфікованих тварин, але не досягав значень ФІ інтактних тварин. При визначенні комплексного впливу цефепіму та червоного випромінювання (7 група), та цефепіму, червоного та синього спектрів (8 група) на вогнище запалення було встановлено, що показники ФІ дорівнювали таким групи інтактних тварин.

При визначенні кількості антигенів в нейтрофілі та в NETs *in vivo*, було встановлено, що у інтактних тварин інтенсивність фагоцитозу складала $3,8 \pm 0,2$ ум.од., формування NETs не було зафіксовано. У групі інфікованих тварин виявлено зниження інтенсивності фагоцитарного процесу з різким підвищенням вмісту антигенів в NETs. У групі інфікованих тварин, осередок запалення яких був опромінений синім спектром світлодіодного випромінювання (3 група) встановлено, що показник інтенсивності фагоцитозу та кількості антигенів в NETs майже не відрізнялися від аналогічних групи інфікованих тварин (2 група). У групі інфікованих тварин, осередок запалення яких був опромінений червоним спектром

світлодіодного випромінювання (4 група) встановлено, що показник інтенсивності фагоцитозу мав тенденцію до підвищення, а кількість антигенів в NETs підвищилась майже у 2 рази порівняно з групою інфікованих тварин. Аналізуючи інтенсивність фагоцитарного процесу та вмісту антигенів в NETs у інфікованих тварин за впливу тільки антибактеріального препарату цефепім (5 група) встановлено, що показник ФЧ був підвищений у 1,5 рази, а кількість антигенів в NETs знижено у 1,4 рази порівняно з контрольною групою інфікованих тварин.

Аналізуючи вплив світлодіодного випромінювання синього спектра комплексно з протимікробним препаратом цефепімом у групі інфікованих тварин (6 група) встановлено, що показник інтенсивності фагоцитозу був підвищений у 4,3 рази, а вміст антигенів в NETs достовірно не відрізнявся від аналогічної групи контролю інфікованих тварин. У групі інфікованих тварин, лікування яких проводилося цефепімом, а осередок запалення яких був опромінений червоним спектром світлодіодного випромінювання (7 група) встановлено, що показник інтенсивності фагоцитозу був підвищений у 4,1 рази, а кількість антигенів в NETs – підвищено у 1,6 рази, що свідчить про активацію фагоцитарної ланки імунного захисту.

У групі інфікованих тварин лікування яких проводилося цефепімом, а осередок запалення яких був опромінений синім та червоним спектрами світлодіодного випромінювання у комбінації (8 група) встановлено, що показник інтенсивності фагоцитозу був підвищений у 3,9 рази, порівняно з групою контролю інфікованих тварин (2 група) та у 1,5 рази порівняно з групою контролю інтактних тварин (1 група), а кількість антигенів в NETs – у 1,3 рази порівняно з групою контролю інфікованих тварин, що є самим оптимальним співвідношенням інтенсивності фагоцитарного процесу з подальшим утворенням NETs.

В результаті вивчення загального стану імунітету організму піддослідних груп тварин встановлено, що в групі інфікованих тварин характерно достовірне зниження кількості лейкоцитів і лімфоцитів у

периферичній крові. Субпопуляційний аналіз лімфоцитів показав, що лімфопенія супроводжувалась вираженим зниженням вмісту окремих субпопуляцій цих клітин. Так, спостерігалось достовірно знижена кількість всіх вивчених субпопуляцій Т-лімфоцитів з маркерами диференціації CD3⁺, CD4⁺, CD11⁺, CD18⁺. Співвідношення CD4⁺/CD8⁺ також було достовірно нижче, ніж у інтактних тварин. Отже, проведені імунологічні дослідження дозволили встановити, порівняно з групою контролю (інтактні), наступні показники: змінюються параметри клітинного імунітету: статистично значимі зміни відмічаються за кількістю CD3⁺ – 33,8±1,0%; CD4⁺ – 15,2±1,2%; CD11⁺ – 16,7±0,8% й CD18⁺ – 12,8±0,4 %. Поряд з пригніченням Т-системи відмічається підвищення кількості В-лімфоцитів CD22⁺, що є ключовими рецепторами, які модулюють проходження сигналу під час антигенної стимуляції. Аналізуючи субпопуляційний склад лімфоцитів можна відмітити стан кілерної ланки: зниження кількості CD8⁺. Аналізуючи вплив комплексної терапії із застосуванням світлодіодного випромінювання слід зазначити, що в усіх групах зареєстровано відновлення клітинної ланки імунітету, найкращі показники фіксувалися у групах з опроміненням осередку запалення червоним світлодіодом.

Провідна роль у патогенезі гнійно-запального процесу належить медіаторам запалення, які утворюються в організмі у відповідь на фактори агресії, що продукують мікроорганізми. При визначенні цитокінового статусу встановлено, що у інфікованих тварин зафіксовано достовірне підвищення концентрацій IL-1 β , як в сироватці, так й у тканинах, і TNF- α порівняно з контрольною групою інтактних тварин, а рівень протизапального інтерлейкіну (IL-4) був достовірно знижений тобто спостерігався дисбаланс цитокінового статусу. Активність TNF- α і IL-1 β у сироватці крові дослідних груп лабораторних тварин із застосуванням тільки світлодіодного випромінювання (3 та 4 групи) та з монотерапією (5 група) значно відрізнялася від аналогічних показників як інтактних тварин, так і тварин дослідних груп з комбінованою терапією (6,7,8 групи). Так найбільш високий

рівень IL-1 β був виявлений у тварин 3-ї та 4-ї дослідних груп, вогнище запалення яких опромінювали синім та червоним спектром (*per se*) світлодіодного випромінювання. Показники IL-1 β в групах, де проводилася комплексна терапія дорівнювала таким показникам групи інтактних тварин.

При морфологічному дослідженні було встановлено, що при лікуванні тварин з експериментальною локалізованою гнійно-запальною інфекцією антимікробним препаратом цефепімом з використанням синього та червоного світлодіодного випромінювання морфологічні зміни у внутрішніх органах характеризуються, в порівнянні з групою тварин без лікування, зниженням ступеню виразності запально-проліферативних процесів і дисциркуляторних розладів у стромі і судинах, зменшенням виразності альтеративних змін в паренхіматозних структурах, із збереженням гіперпластичних процесів в імунокомпетентних тканинах.

Таким чином, комплексне застосування протимікробних препаратів в поєднанні з синім і червоним світлодіодним випромінюванням при локалізованій гнійно-запальній інфекції сприяє посиленню репаративних можливостей організму, про що свідчить мінімалізація морфологічних ознак запальних, дисциркуляторних і альтеративних змін в паренхіматозних органах.

Ключові слова: локалізовані гнійно-запальні захворювання шкіри, світлодіодне випромінювання синього та червоного спектрів, біоплівки, планктонні клітини, протимікробні препарати, мікроорганізми, імунні клітини, цитокіни, морфологічні особливості, імуноморфологічний стан.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

(* - особистий внесок здобувача)

Монографія

1. Вплив світлодіодного випромінювання та протимікробних препаратів на мікроорганізми, збудники гнійно-запальних локалізованих процесів, і на стан фагоцитарної активності нейтрофілів: колективна монографія /М. М. Мішина, В. В. М'ясоєдов, Н. І. Філімонова, А. М. Коробов, М. М. Попов, О. С. Дубовик, С. Г. Маланчук, М. О. Ляпунов, О. В. Наумова. Харків: ХНМУ, 2014. 152 с. (* проведено дослідження щодо створення експериментальних моделей біоплівки мікроорганізмів; проведено дослідження щодо визначення впливу світлодіодного випромінювання та протимікробних препаратів на планктонні форми та біоплівки мікроорганізмів, збудників ГЗЗ; проведено дослідження з визначення інтегральних показників фагоцитозу у тварин; визначено утворення позаклітинних пасток під впливом оптичного випромінювання синього та червоного спектрів).

Статті у фахових виданнях

2. Дубовик О. С., Наумова О. В., Коробов А. М., М'ясоєдов В. В., Мішина М. М. Вплив світлодіодного випромінювання та протимікробних засобів на морфологічний стан тканин при локалізованому гнійно-запальному процесі. *Вісник проблем біології і медицини*. 2014. В.1 (106). С. 246-251. (*досліджено морфологічний стан тканин експериментальних тварин при локалізованому гнійно-запальному процесі під дією світлодіодного випромінювання та антимікробних препаратів).

3. Дубовик О. С., Мішина М. М. Вплив світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів на імуноцитокіновий стан при гнійно-

запальних процесах (експериментальне дослідження). *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2017. №4 (6). С. 13-19. (*досліджено особливості імунного та цитокінового стану під дією світлодіодного випромінювання та комплексного застосування із антимікробними препаратами при локалізованому гнійно-запальному процесі.)

4. Dubovyk O. S., Mishyna M. M., Malanchuk S. G., Kuzmenko A. M., Kozlov O. P. Definition of etiological antibiotic sensitivity factors in purulent-inflammatory processes. *Georgian Medical News*. 2017. №10 (271). P.133-137 (*визначено антибіотикочутливість збудників у планктонній формі та формі біоплівки).

5. Дубовик О. С., Мішина М. М., Коробов А. М. Комбінована дія оптичного випромінювання синього й червоного спектрів та антисептичних препаратів на здатність до формування біоплівки ізолятами *Proteus mirabilis*. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2018. Т.3, №1 (10). С.253-257. (*визначено вплив оптичного випромінювання та антисептичних препаратів на ізоляти *Proteus mirabilis*).

6. Дубовик О. С., Мішина М. М., Коробов А. М. Оцінка впливу світлодіодного випромінювання на чутливість збудників гнійно-запальних процесів до протимікробних препаратів. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2018. Т.3, №2 (11). С.232-236. (*визначено антибіотикочутливість збудників гнійно-запальних процесів).

Тези доповідей

7. Циганенко А. Я., Мішина М. М., Дубовик О. С., Мішин Ю. М. Вивчення ефективності дії фторхінолонів та цефалоспоринів на експериментально відтворені моделі змішаних біоплівок мікроорганізмів, чинників гнійно-запальних інфекцій. *Актуальні проблеми сучасної медицини: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Медична наука – 2009»*. Полтава, 2009. №4.1 (36). С. 234.

8. Циганенко А. Я., Мішина М. М., Дубовик О. С., Мішин Ю. М. Вплив світлодіодного випромінювання на біоплівки ізолятів *Streptococcus pyogenes*. *Проблеми та еволюція епідеміологічного процесу і паразитарних систем провідних інфекцій сучасності*: матеріали XV з'їзду Українського науково-медичного товариства мікробіологів, епідеміологів та паразитологів ім. Д.К. Заболотного. Харків, 2011. С. 114.

9. Дубовик О. С., Мішин Ю. М., Аус.з.Абд.Аль. Здатність до плівкоутворення ізолятів *Proteus spp.* під впливом електромагнітного випромінювання оптичного діапазону. *Медицина третього тисячоліття*: матеріали міжвузівської конференції молодих вчених та студентів (м. Харків, 17-18 січ. 2012 р.). Харків, 2012. С. 7-8.

10. Циганенко А. Я., Мішина М. М., Дубовик О. С., Мішин Ю. М. Застосування оптичного випромінювання при відтворенні біоплівок *S.aureus in vitro*. *Довкілля і здоров'я*: матеріали науково-практичної конференції (м.Тернопіль, 27-28 квіт. 2012 р.). Тернопіль, 2012. С. 83-84.

11. Циганенко А.Я., Коробов А.М., Мішина М.М., Дубовик О.С., Глазунов А.В., Мішин Ю.М. Імуноморфологічний стан при експериментальному локалізованому гнійно-некротичному процесі та комбінованій терапії із застосуванням світлодіодного випромінювання. *Стратегія і тактика боротьби з інфекційними захворюваннями*: матеріали науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів (м. Харків, 17-18 жов. 2012 р.). Харків, 2012. С.70.

12. Циганенко А. Я., Коробов А. М., Мішина М. М., Дубовик О. С., Глазунов А. В., Мішин Ю. М. Експериментальне обґрунтування комплексного застосування хіміотерапевтичних препаратів та світлодіодного випромінювання. *Стратегія і тактика боротьби з інфекційними захворюваннями*: матеріали науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів (м. Харків, 17-18 жов. 2012 р.). Харків, 2012. С. 69-70.

13. Mishina M., Myasoedov V., Davydenko V., Korobov A., Dubovik E., Mozgova Y., Mishin Y. LED effects on *E.coli*'s ability to form biofilms and on

phagocytic activity of neutrophils with NETs production in experimental localized pyoinflammatory processes [Electronic resource] 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona (Spain), 10 May 2014.

14. Дубовик О. С., Сорокіна І. В., Мішина М. М., Наумова О. В. Імуноморфологічні особливості при експериментальному гнійно-запальному процесі, спричиненому *P.mirabilis*. XV з'їзд Товариства мікробіологів України ім.С.М.Виноградського (м. Одеса, 11-15 вер. 2017 р.). Одеса, 2017. С. 190.

15. Дубовик О. С., Мішина М. М., Маланчук С. Г., Кузьменко А. М. Чутливість до антибактеріальних препаратів мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних процесів. *Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю* (м. Чернівці, 29 січ. 2018 р.). Чернівці, 2018. С.43-45.

Патенти України на корисну модель

16. Пат. UA № 80293 U, МПК' G09B 23/28, C12N 13/00, A61N 5/06. Спосіб визначення впливу випромінювання фотонної матриці Коробова на формування біоплівки мікроорганізмів *in vitro* /А. М. Коробов, А. Я. Циганенко, М. М. Мішина, О. С. Дубовик; заявник та патентовласник ХНУ ім.В.Н.Каразіна. № u201212578; заявл.05.11.2012; опубл. 27.05.2013, Бюл. №10.

17. Пат. UA № 80355 U, МПК' C12N 13/00, A61N 5/06. Пристрій для впливу оптичного випромінювання *in vitro* на патогенні бактерії/ А. М. Коробов, А. Я. Циганенко, М. М. Мішина, О. С. Дубовик; заявник та патентовласник ХНУ ім.В.Н.Каразіна. № u201213663; заявл.29.11.2012; опубл. 27.05.2013, Бюл. №10.

Інформаційний лист

18. Циганенко А. Я., Мішина М. М., Курбанов Р. А., Дубовик О. С. Удосконалення способу відтворення біоплівки мікроорганізмів *in vitro*. Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи. В.1 з проблеми «Вірусологія та мікробіологія». № 241. 2010. 4 с.

ANNOTATION

Dubovyk O.S. Sensitivity of skin purulent-inflammatory pathogens to complex action of antimicrobial preparations and LED radiation *in vitro* and *in vivo*. – Qualifying scientific work as manuscript copyright.

PhD thesis on candidate of biological sciences on a specialty 03.00.07 «Microbiology» - Kharkiv National Medical University of the Ukrainian Ministry of Health care, Kharkiv, 2020. Zabolotny institute of microbiology and virology of NAS of Ukraine, Kyiv, 2020.

The thesis is dedicated to the study of the impact of LED radiation and antimicrobial medications on planktonic cells and biofilms of microorganisms, purulent-inflammatory diseases (PID) pathogens. Practical solution of the actual problem is justified – action of blue and red spectrum of LED radiation and antimicrobial preparations on planktonic and biofilm forms of skin PID pathogens is determined on the assessment of microbiological, immunological and morphological signs.

As a result of the study both gram-negative and gram-positive opportunistic microorganisms were stated to be etiological agents of skin PID in children. *S. aureus* prevailed in pathogens general structure, their share was 36.4%. Among gram-negative strains *E.coli*, *Proteus spp.* prevailed, which were isolated in 17.4 and 14.7 % cases, consequently. The mentioned types of microorganisms were isolated from biological material both in monoculture (*S. aureus* – 26.9 %) and in association with other microorganisms. In the composition of mixed-cultures strains of *S. aureus* + *E. coli* (16.4 %), *S. aureus* + *S. pyogenes* (25.4 %) and *S. aureus* + *P.mirabilis* prevailed in 14.9 % cases.

In determining sensitivity of bacteria to antimicrobial preparations amoxiclav, imipenem, gatifloxacin, cyprofloxacin and cefepime were stated to be most active to gram-negative cellular strains of microorganisms and oppressed growth from 65.6 to 91.7 % of test strains. Other antimicrobial preparations were

found to be inactive. It should be mentioned that as for gentamicin, resistance to which is considered marker of nosocomial strains, only 28.5 – 46.8 % of strains were sensitive.

Gram-positive opportunistic microorganisms in planktonic form were highly sensitive to cefepime and imipenem. Growth oppression with these preparations was found in 95.5% of *S. aureus* and 91.3% of *S. Pyogenes* strains. Ampicillin, amoxiclav, cefoperazone, gatifloxacin, imipenem and vancomycin also manifested rather high activity oppressing growth from 62.7 to 91.3% of test strains.

As efficiency of antimicrobial therapy often depends on the form of microorganisms existence, the ability to form biofilms by clinical test strains was studied. 100% of test strains were stated to be characterized by the ability to form biofilms being the reliable protection of microorganisms from adverse environmental factors, in particular antimicrobial preparations. This indirectly indicates that these strains, even with sensitivity to certain antibacterial preparations, can be resistant *in vivo*. Infections caused by these strains probably not to succumb to treatment. Thus the next stage of the study was the determination of antibacterial preparations activity on biofilms *in vitro*. In determining of sensitivity of gram-negative microorganisms isolates in biofilm form to antibacterial preparations nearly all strains were stated to be resistant to them. Sensitivity of test strains was from 0 to 33.3%. The received data confirm the fact that sensitivity to microorganisms antimicrobial preparations associated into biofilms does not correspond to the one, determined for microorganisms in planktonic form and can create difficulties in PID therapy.

As *E. coli*, *P. mirabilis* and *S. aureus* were dominating pathogens of skin PID and had high level of antibiotic resistance it was useful to analyze these pathogens antibiotic resistance profiles. The greatest amount of multi-resistant strains, namely 83.6%, were stated to be resistant to 4 and more antibiotics, were found among *S.aureus*. Though 76.2% and 50% of *P.mirabilis* and *E.coli* strains, consequently, were also referred to multi-resistant.

At present optic radiation of various spectral composition is widely used in clinical practice and biomedical studies for PID of bacterial nature treatment as well as for physiotherapeutic procedures. Though data of blue and red spectral radiation influence of PID pathogens are practically absent.

A device for optical radiation influence on pathogenic bacteria and the way of LED radiation on microorganisms *in vitro* was worked out for experimental studies. LED radiation of blue spectrum was stated to oppress the ability of planktonic cells to form biofilms, but red spectrum activated planktonic cells formation with further formation of dense microorganisms biofilm, this can be explained by metabolic processes activation in bacterial cell. With integrated action of red LED radiation and cepefime the bacterial sensitivity to antimicrobial preparation increased which can be explained by the fact that red LED radiation contributes the acceleration of the exponential cell growth, but bactericidal effect of cephalosporines, particularly cefepime, is realized only during the growth and reproduction of bacteria. Under the influence of LED radiation and cefepime oppression of bacteria growth is observed which can be explained by synergism which appears on the background of weakening of barrier function of cellular membranes which is caused by the influence of atomic form of oxygen under LED radiation of blue spectrum on one side and direct action of cefepime on cellular wall of bacteria on the other side, which causes bioinhibition.

In determining optimal combination for maximal oppression of daily biofilms formation, planktonic cells production and secondary biofilms isolates formation with the use of LED radiation of blue and red spectrum and aseptic means it was stated that the use of chlorhexidine with further radiation with blue light and hydrogen peroxide with further radiation with red light was most appropriate.

LED radiation with blue and red spectrum together with antimicrobial preparation cefepine of cephalosporin series was stated to oppress planktonic cells formation with further dense biofilms formation.

Efficiency of combined therapy with the use of blue and red light-emitting diodes with experimental localized purulent-inflammatory contagiu protealis was assessed according to the degree of inflammation focus healing. It was found out that purulent-inflammatory focus healing with only cefepime therapy took place on the 12th day. Complex use of LED radiation with cephalosporine chemotherapeutic preparation detected tendency to more quick wound healing tendency – cefepime with red LED radiation – on the 9th day; cefepime with blue LED radiation – on the 6th day; cefepime with red and blue radiation – on the 5th day. Registering the dynamics of inflammation focus healing with localized purulent-inflammatory infection we can come to a conclusion that most optimal and rational form, from the point of view of healing speed of the inflammatory focus and treatment coasts, is a combination of cefepime antimicrobial preparation and blue and red LED radiation on the inflammation focus for 5 minutes.

In experimental study of localized purulent-inflammatory process when LED radiation of blue and red spectrum exposed on the activity of phagocytosis it was stated that integral indices of phagocytosis in animals of the infected group (2 group – positive control) were: phagocytic number (PhN) – 1.5 ± 0.2 and phagocytic index (PhI) – $41.4 \pm 1.4\%$ were lower than control meanings (3.8 ± 0.2 and $80.1 \pm 1.3\%$, consequently). Analyzing the dynamics of these indices under the influence of LED radiation of blue and rad spectrum *per se* and together with cefepime it was stated that in groups of test animals in which inflammatory focus was affected by radiation with blue LED integral indices of phagocytosis did not practically differ from groups of animals of positive control. Under influence of red spectrum of LED radiation PhI had the tendency to increase in comparison with control group of infected animals indices, but did not reach the PhI meanings of intact animals. In determining complex influence of cefepime and red radiation (7 group) and cefepime with red and blue spectrum (8 group) on the inflammatory focus it was found out that PhI indices corresponded such groups of intact animals.

In determining the number of antigens in neutrophil and in NETs *in vivo*, phagocytosis intensity in intact animals was stated to be 3.8 ± 0.2 conv.un, no

NETs formation was found. In group of infected animals decrease of phagocytic process intensity was found with sharp increase in content of antigens in NETs. In group of infected animals the inflammatory focus radiated by LED blue spectrum (3 group) PhI index and number of antigens in NETs were stated to have nearly no difference from alike groups of infected animals (2 group). In group of infected animals the inflammatory focus was radiated by LED of red spectrum (4 group), PhI index was stated to have a tendency to increase and the number of antigens in NETs increased nearly 2 times in comparison with the group of infected animals. Analyzing the intensity of phagocytic process and content of antigens in NETs in infected animals with only cefepime antibacterial preparation influence (5 group) PhN index was stated to increase 1.5 times, but the number of antigens in NETs decreased 1.4 times in comparison with control group of infected animals.

Analyzing LED radiation of blue spectrum together with cefepime antimicrobial preparation in group of infected animals (6 group) it was stated that Phagocytic intensity index increased 4.3 times, content of antigens in NETs did not reliably differed from the alike control group of infected animals. In group of infected animals the treatment of which was carried out with cefepime and the inflammatory focus of which was radiated by LED of red spectrum (7 group) it was stated that phagocytic intensity index was increased 4.1 times and the number of antigens in NETs was increased 1.6 times which proves about phagocytic link of immune protection activation.

In group of infected animals the treatment of which was carried out with cefepime and the inflammatory focus of which was radiated by LED of blue and red spectrum in combination (8 group) it was stated that phagocytosis intensity index was increased 3.9 times in comparison with the control group of infected animals (2 group) and in 1.5 times in comparison with control group of intact animals (1 group), and the number of antigens in NETs – 1.3 times in comparison with control group of infected animals which is the most optimal ratio of phagocytic intensity process with further formation of NETs.

As a result of the study of immune system of animals test group general state of infected animals was stated to have distinctive leukocytes and lymphocytes number decrease in periphery blood. Sub-population analysis of lymphocytes demonstrated that lymphopenia was accompanied by expressed decrease of separate sub-populations content of these cells. Thus, reliably decreased number of all T-lymphocytes sub-populations under study with differentiation markers $CD3^+$, $CD4^+$, $CD11^+$, $CD18^+$ was observed. Ratio $CD4^+/CD8^+$ was also reliably lower, than in intact animals. Thus, the carried out immunological studied allowed the determination of the following indices in comparison with the control group (intact): cellular immunity parameters change: statistically significant changes are determined according to the number of $CD3^+$ – $33.8\pm 1.0\%$; $CD4^+$ – $15.2\pm 1.2\%$; $CD11^+$ – $16.7\pm 0.8\%$ and $CD18^+$ – $12.8\pm 0.4\%$. Together with T-system oppression increase of the number of B-lymphocytes $CD22^+$ is marked which is the key receptors modeling signal passing during antigen stimulation. Analyzing sub-population content of lymphocytes killer link state can be marked: decrease of $CD8^+$ number. Analyzing the influence of complex therapy with the use of LED radiation it should be mentioned that in all groups the recovery of the immunity cellular link is registered, the best indices were fixed in groups with the inflammatory focus radiation with red LED.

The prominent role in purulent-inflammatory process pathogenesis belongs to inflammatory mediators which are formed in the organism in response to aggression factors producing microorganisms. In determining of cytokine status it was stated that in infected animals reliable increase if $IL-1\beta$ concentration was fixed both in serum and in tissues and $TNF-\alpha$ in comparison with control group of intact animals, the level of anti-inflammatory interleukin ($IL-4$) was reliably decreased, i.e. misbalance of cytokine status was marked. Activity of $TNF-\alpha$ and $IL-1\beta$ in blood serum of laboratory animals test groups with the use of only LED radiation (3 and 4 groups) and with monotherapy (5 group) significantly differed from the alike indices of both intact animals and animals of test groups with combined therapy (6,7,8 groups). Thus the highest level of $IL-1\beta$ was found in

animals of the 3rd and 4th test groups, inflammatory focus of which was radiated by LED of blue and red spectrum (*per se*). Indices of IL-1 β in groups where complex therapy was carried out corresponded the indices of the group of intact animals.

In morphological study it was stated that in treatment of animals with experimental localized purulent-inflammatory infection with cefepime antimicrobial preparation with the use of blue and red LED radiation morphological changes in internal organs are characterized in comparison with the group of animals without treatment by the decrease of the level of inflammatory-proliferative processes expression and discirculatory disorders in stroma and vessels, decrease of alternative changes expression in parenchymal structures with preservation of hyperplastic processes in immune-competent tissues.

Complex use of antimicrobial preparations together with blue and red LED radiation in localized purulent-inflammatory infection serves to strengthen reparative abilities of the organism as evidenced by minimization of morphological signs of inflammatory, discirculatory and alternative changes in parenchymal organs.

Key words: localized skin purulent-inflammatory diseases, LED light of blue and red spectrum, biofilms, planktonic cells, antimicrobial preparations, microorganisms, immune cells, cytokines, morphologic peculiarities, immunomorphological state.

З М І С Т

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	25
ВСТУП.....	26
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ АСПЕКТИ ЗАСТОСУВАННЯ СВІТЛОДІОДНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ТА ПРОТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ ПРИ ТЕРАПІЇ ГНІЙНО-ЗАПАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	35
1.1 Збудники гнійно-запальних захворювань.....	36
1.2 Стан проблеми формування біоплівки мікроорганізмами, збудниками гнійно-запальних захворювань.....	39
1.3 Проблеми лікування гнійно-запальних захворювань...	52
1.4 Застосування оптичного випромінювання в медицині	55
Висновки до розділу 1.....	68
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	69
2.1 Об'єкти і матеріал дослідження.....	69
2.2 Методи дослідження.....	70
РОЗДІЛ 3 ВИДОВИЙ СКЛАД, АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ ТА БІОПЛІВКОУТВОРЕННЯ ЗБУДНИКІВ ГНІЙНО- ЗАПАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ШКІРИ У ДІТЕЙ	82
Висновки до розділу 3.....	99
РОЗДІЛ 4 ВПЛИВ ОПТИЧНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ СИНЬОГО ТА ЧЕРВОНОГО СПЕКТРІВ НА ЧУТЛИВІСТЬ ЗБУДНИКІВ ГЗЗ ШКІРИ ДО ПРОТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ.....	101
4.1 Вплив світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів на чутливість штамів <i>P.mirabilis</i> ,	

	<i>E.coli</i> та <i>S.aureus</i> до антибактеріальних препаратів.....	102
4.2	Здатність ізолятів <i>P.mirabilis</i> , <i>E.coli</i> та <i>S.aureus</i> утворювати біоплівки за дії світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів і цефепіму.....	109
4.3	Комбінована дія оптичного випромінювання синього й червоного спектрів та антисептичних препаратів на здатність до формування біоплівок ізолятами <i>Proteus mirabilis</i> , <i>E.coli</i> та <i>S.aureus</i>	114
	Висновки до розділу 4.....	127
РОЗДІЛ 5	ЕФЕКТИВНІСТЬ КОМБІНОВАНОЇ ДІЇ ПРОТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА СВІТЛОДІОДНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ СИНЬОГО ТА ЧЕРВОНОГО СПЕКТРІВ В ДОСЛІДАХ IN VIVO.....	129
5.1	Ефективність синього та червоного світлодіодного випромінювання й цефепіму при локалізованій гнійно-запальній інфекції.....	129
5.2	Вплив світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів на імуноцитокіновий стан та активність фагоцитарного процесу з утворенням нейтрофільних позаклітинних пасток при локалізованій гнійно-запальній інфекції.....	131
5.3	Морфологічні зміни тканин експериментальних тварин за дії світлодіодного випромінювання синього і червоного спектрів та цефепіму при локалізованій протейній інфекції.....	144
	Висновки до розділу 5.....	161

	24
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	162
ВИСНОВКИ.....	177
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	179
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	180
ДОДАТКИ.....	203

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ГЗЗ - гнійно-запальні захворювання

МПК – мінімальна концентрація, що пригнічує ріст мікробу

МКАТ – моноклональні антитіла

ФІТЦ – флуоресцеїн ізотіоцинат

ЦІК – циркулюючий імунний комплекс

ЧСВ – червоне світлодіодне випромінювання

ССВ – синє світлодіодне випромінювання

CD3⁺ - кластер диференціації Т-клітин

CD4⁺ - Т-хелпери

CD8⁺ - цитотоксичні Т-клітини,

CD11⁺ - антигенпрезентуючі клітини

CD18⁺ – нейтрофіли

CD22⁺ - натуральні В-клітини

CD45RA – популяція лейкоцитів

СН 50 – активність комплементу

IgG – імуноглобулін G

IgM – імуноглобулін M

IL-1 β - інтерлейкін 1 β

IL-4 - інтерлейкін 4

IL-6 - інтерлейкін 6

ED1 - макрофаги

TNF α - фактор некрозу пухлини

NETs – нейтрофільні позаклітинні пастки

XГ - хлоргексидин

ПВ – пероксид водню

ВСТУП

Проблема ГЗЗ шкіри залишається однією з провідних в сучасній мікробіології та медицині [28, 50, 142, 184]. На сьогодні відомо, що ефективність антибіотикотерапії цих інфекцій досить низька, що пов'язано з багатьма факторами, зокрема зі зміною етіологічної структури цих захворювань, а також зростанням стійкості збудників до антимікробних засобів [6, 61, 115, 158]. Крім того, неефективність антимікробної терапії ГЗЗ шкіри може бути пов'язана з тим, що при призначенні антибіотиків для лікування, як правило, не враховується можливість збудників утворювати біоплівки [98, 117, 144, 154]. Слід відзначити, що у складі біоплівки мікроорганізми набувають надзвичайної стійкості до дії дезінфікуючих речовин, максимальних терапевтичних концентрацій антибактеріальних препаратів, бактеріофагів, антитіл і фагоцитів. Тому багатьма науковцями в усьому світі проводяться дослідження щодо вивчення механізму формування біоплівок та пошуку засобів, які зможуть їх руйнувати або блокувати їх утворення [16, 21, 128, 159, 165, 175, 180, 181].

З розробкою та впровадженням в клінічну практику сучасних високоефективних методів терапії з використанням новітніх технологій спостерігається значний прогрес у лікуванні ГЗЗ. В той же час, можливості для вдосконалення методів лікування ГЗЗ ще не повністю реалізовані, що обумовлює доцільність продовження та поглиблення досліджень в даному напрямку. Аналіз даних літератури показує, що ще недостатньо вивчені ефекти комбінованого використання оптичного випромінювання з традиційними методами лікування ГЗЗ [66, 163, 169, 172, 185]. Досі немає чіткого наукового обґрунтування вибору спектрального складу оптичного випромінювання при його застосуванні у комплексній терапії хворих на ГЗЗ, в тому числі й шкіри, тому досить часто, при використанні фізіотерапії із

застосуванням різного спектра світлодіодного випромінювання з місцевими протимікробними засобами виникають суперечливі результати.

Протимікробний ефект світлодіодного випромінювання може бути використаний для посилення дії антимікробних препаратів, оскільки застосування тільки хіміотерапевтичних засобів на бактерії у формі біоплівки не є ефективним. Проте дані про реакції збудників ГЗЗ у двох фізіологічних формах існування на дію різних спектрів оптичного випромінювання, практично відсутні, а розв'язання цього завдання становить значний науковий інтерес і може мати як фундаментальне, так і прикладне значення.

Викладене дає підставу вважати, що вивчення впливу світлодіодного випромінювання на бактеріальні біоплівки в комбінації з протимікробними препаратами з урахуванням даних про етіологічну структуру та антибіотикорезистентність збудників ГЗЗ шкіри, що циркулюють в певному стаціонарі або, навіть, у відділенні одного стаціонару, нині є вельми актуальним.

Гіпотеза дослідження полягає в тому, що підвищення ефективності комплексної терапії хворих на локалізовані ГЗЗ різної етіології може бути забезпечено шляхом удосконалення підходів до лікування із застосуванням світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів й протимікробних препаратів, з урахуванням здатності збудників ГЗЗ шкіри до формування біоплівки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконувалась в рамках науково-дослідних робіт Харківського національного медичного університету МОЗ України, кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім.проф. Д.П. Гриньова: «Оптимізація діагностики й протимікробної терапії гнійно-запальних процесів з урахуванням комунікативних властивостей мікроорганізмів» (№ держреєстрації: 0111U001402, 2011-2013 рр.), «Експериментальне мікробіологічне обґрунтування протимікробної терапії гнійно-запальних захворювань» (№ держреєстрації: 0114U003390, 2014-2016 рр.), теми з

фінансуванням за рахунок Держбюджету МОЗ України: «Вплив фізико-біологічних факторів на комунікативні властивості мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних процесів» (№ держреєстрації: 0112U001822 2012-2014 рр.).

Мета і завдання дослідження

Метою роботи було оцінити *in vitro* та *in vivo* чутливість збудників гнійно-запальних захворювань шкіри у планктонній і біоплівковій формі існування до комплексної дії антимікробних препаратів та світлодіодного випромінювання синього і червоного спектрів.

Для досягнення мети було поставлено такі основні завдання:

1. Встановити видовий склад збудників локалізованих гнійно-запальних захворювань шкіри у дітей.
2. Визначити чутливість до протимікробних препаратів збудників гнійно-запальних захворювань, в планктонній та біоплівковій формі існування.
3. Оцінити вплив світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів і протимікробних препаратів на здатність формувати біоплівки клінічними штамами мікроорганізмів.
4. Дослідити вплив світлодіодного випромінювання синього й червоного спектрів на стан імунітету і цитокіновий баланс при експериментальній локалізованій гнійно-запальній інфекції.
5. Виявити морфологічні зміни тканин органів піддослідних тварин з локалізованою гнійно-запальною інфекцією за комплексної дії світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів і протимікробних препаратів.

Об'єкт дослідження – антибіотикорезистентність мікробіоти гнійно-запальних захворювань шкіри.

Предмет дослідження – комплексна дія протимікробних препаратів і світлодіодного випромінювання на планктонну та біоплівкову форму існування мікроорганізмів; комплекс мікробіологічних, імунологічних показників та морфологічних ознак.

Методи дослідження. Для досягнення поставленої мети були використані мікробіологічні методи: ідентифікація мікроорганізмів за допомогою ідентифікаційних наборів МІКРО-ЛА-ТЕСТ®; визначення чутливості штамів мікроорганізмів до антимікробних препаратів за допомогою «ТПКтестГр+» та «ТПКтестГр-».. Тестування ізолятів на здатність утворювати біоплівки – у плоскодонних полістиролових планшетах. Вимірювання оптичної щільності вихідної бактеріальної суспензії проводилось на приборі «Densi-La-Meter»; інокульованих бактеріальних клітин - на фотометрі «Multiskan EX» при довжині хвилі 540 нм та визначалося в одиницях оптичної щільності (од.ощ.)

Вивчення імунного статусу оцінювали за рівнями Т-, В- та фагоцитарного ланцюгів імунітету. Рівні цитокінів (IL-1 β , IL-4, TNF- α) і IgM та IgG визначено за допомогою ІФА.

Опромінення *in vitro* проводили світлодіодними джерелами синього (440-480 нм) й червоного (620-740 нм) випромінювання фотонної матриці апарата Коробова «Барва-Флекс». Інтенсивність фагоцитозу вивчали за здатністю нейтрофілів поглинати частинки латексу. Для визначення нейтрофільних пасток ставили реакцію з використанням клітинної суспензії нейтрофілів периферичної крові, виділених на градієнтних розчинах фіколла-верографіна за методом Долгушина І.І. та Андрєєвої Ю.С. [29]. Для фарбування препаратів нейтрофілів використовували робочий розчин акридинового помаранчевого. Облік проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопу. При обробці результатів використані методи параметричної статистики із застосуванням програм Microsoft Excel 2010, «Statisica 10» StatSoft Inc. (free trial) та BioStat 2009 Professional, version 5.8 (AnalystSoft Inc.).

Експериментальна частина досліджень проведена на мишах інбредних ліній BALB/cJLacSto з відтворенням локалізованої гнійно-запальної моделі, та наступним лікуванням протимікробними препаратами (цефепім, хлоргексидин, перексид водню) й світлодіодним випромінюванням синього й

червоного спектрів. Для оцінки ступеня морфологічних порушень у тканинах інфікованих тварин і відновлення імунокомпетентних тканин під впливом світлодіодного випромінювання синього й червоного спектрів *per se* та з протимікробними препаратами, взятих в експеримент, вивчено імуноморфологічну картину тканин внутрішніх органів експериментальних тварин.

Наукова новизна отриманих результатів

Вперше доведено, що для максимального пригнічення формування добових біоплівки, продукції планктонних клітин і утворення вторинних біоплівки ізолятів є доцільним використання хлоргексидину з опроміненням синім світлом та пероксиду водню з опроміненням червоним світлом.

В роботі уточнено наукові дані щодо синергічного впливу світлодіодного випромінювання та антимікробних препаратів на біоплівки мікроорганізмів: вперше на моделях біоплівки антибіотикорезистентних клінічних штамів (*P. mirabilis*, *E. coli* та *S. aureus*) встановлено підвищення бактерицидного ефекту цефепіму за дії синього та червоного спектрів світлодіодного випромінювання.

Вперше, на моделі локалізованої гнійно-запальної протейної інфекції доведено, що найбільш оптимальним за швидкістю загоєння вогнища запалення, відновлення імунного та цитокінового статусу й нормалізації морфофункціонального стану паренхіматозних органів та органів імунної системи є комбінація антимікробного препарату цефепіму та синього і червоного світлодіодного випромінювання на осередок запалення. Доведено, що світлодіодне випромінювання червоного спектра активує фагоцитоз та здатність формувати позаклітинні пастки нейтрофілами.

Розширено наукові дані щодо механізмів формування позаклітинних нейтрофільних пасток *in vivo*, вперше показано, що за дії на осередок запалення синім спектром світлодіодного випромінювання інтенсивність фагоцитозу й вмісту антигенів в NETs достовірно не відрізнялося від групи інфікованих тварин, а при опроміненні червоним спектром світлодіодного

випромінювання кількість антигенів в NETs підвищується вдвічі, що запобігає дисемінації антигену.

Доповнено наукові положення про комплексну оцінку імунних і морфологічних ознак при локалізованих ГЗЗ. На експериментальній моделі показано, що в основі розвитку імунних розладів при локалізованій гнійно-запальній інфекції бактеріальної етіології є дисбаланс прозапальних цитокінів у сироватці крові та в ушкоджених тканинах і пригнічення фагоцитозу (у 2,5 разів) з наступною активацією нейтрофільних позаклітинних пасток (у 16,9 разів).

На основі поглибленого вивчення мікробіологічних, імунологічних та морфологічних показників розроблено алгоритм діагностичної тактики при ГЗЗ шкіри.

Практичне значення отриманих результатів

На підставі експериментального матеріалу запропоновано спосіб визначення впливу випромінювання фотонної матриці Коробова на формування біоплівки мікроорганізмів *in vitro*, який базується на вимірюванні оптичної щільності плівки, утвореної мікроорганізмами, збудниками гнійно-запальних процесів, на поверхні полістиролової панелі після опромінення дослідних ізолятів та інкубації. (Пат. UA № 80293 U, МПК' G09B 23/28, C12N 13/00, A61N 5/06. Спосіб визначення впливу випромінювання фотонної матриці Коробова на формування біоплівки мікроорганізмів *in vitro*).

Створено пристрій для впливу оптичного випромінювання на мікроорганізми (Пат. UA № 80293 U, МПК' G09B 23/28, C12N 13/00, A61N 5/06. Спосіб визначення впливу випромінювання фотонної матриці Коробова на формування біоплівки мікроорганізмів *in vitro*).

За результатами дисертаційної роботи розроблено інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я «Удосконалення способу відтворення біоплівки мікроорганізмів *in vitro*». Удосконалена методика моделювання біоплівки мікроорганізмів запропонована для впровадження в

мікробіологічних лабораторіях лікувально-профілактичних установ практичної охорони здоров'я України.

Результати дисертації впроваджено в наукову роботу кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д.П. Гриньова Харківського національного медичного університету; кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» та кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету.

Особистий внесок здобувача

Автором самостійно проведено аналіз наукової літератури за темою дисертації та патентно-інформаційний пошук з даної проблеми. Разом із науковим керівником д.мед.н., проф. М.М. Мішиною сформульовано мету і завдання роботи, сплановано мікробіологічні, експериментальні, імунологічні та морфологічні методи дослідження. Дисертантом самостійно виділено та охарактеризовано ізоляти бактерій й проведено дослідження з вивчення біоплівкоутворення та антибіотикочутливості ізолятів; проведено експерименти щодо відтворення локалізованої гнійно-запальної моделі; експерименти з визначенням дії протимікробних препаратів і світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів. Здобувачем особисто виконано дослідження щодо оцінки дії світлодіодного випромінювання синього й червоного спектрів на імунітет при експериментальній локалізованій гнійно-запальній інфекції. Автором узагальнено всі отримані лабораторні результати. Аналіз, узагальнення даних, обговорення отриманих результатів, і підготовка публікацій за результатами досліджень проведено разом із д.мед.н., проф. М.М. Мішиною, науковим керівником дисертаційної роботи. У співавторстві з акад., д. мед. н., проф. А.Я. Циганенком, проф. М.М. Мішиною і к.ф.-м.н., завідувачем науково-дослідної лабораторії квантової біології та квантової медицини Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна А.М. Коробовим було розроблено пристрій для впливу оптичного випромінювання *in vitro* на патогенні бактерії та спосіб

визначення впливу випромінювання фотонної матриці Коробова на здатність до формування біоплівок мікроорганізмами *in vitro*. Усі положення, висновки, статистична обробка отриманих результатів належать автору.

Апробація результатів дисертації

Матеріали дисертації оприлюднені на Всеукраїнській науково-практичній конференції «Медична наука – 2009» (Полтава, 2009); на XV з'їзді Українського науково-медичного товариства мікробіологів, епідеміологів та паразитологів ім. Д.К.Заболотного «Проблеми та еволюція епідеміологічного процесу і паразитарних систем провідних інфекцій сучасності» (Харків, 2011); на підсумковій науково-практичній конференції молодих вчених ХНМУ «Медицина третього тисячоліття» (Харків, 2012); на науково-практичній конференції «Довкілля і здоров'я» (Тернопіль, 2012); на науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів «Стратегія і тактика боротьби з інфекційними захворюваннями» (Харків, 2012); на міжнародному конгресі з клінічної мікробіології «24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases», (Barcelona, 2014); на XV з'їзді Товариства мікробіологів України ім.С.М.Виноградського (Одеса, 2017); на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності» (Чернівці, 2018).

Публікації

За результатами дисертації опубліковано 18 наукових праць, з них 5 – у наукових фахових журналах (1 публікація у виданні, що включено до міжнародної наукометричної бази Scopus), 9 – у збірниках конференцій, конгресів, з'їздів, 1 інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я, 2 патенти України на корисну модель, 1 монографія.

Обсяг і структура дисертації

Дисертаційна робота викладена на 234 сторінках друкованого тексту, складається зі вступу, 5 розділів, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 153 сторінки друкованого тексту. Робота ілюстрована 18 таблицями та 58 рисунками. Список використаних джерел містить 188 найменувань.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ АСПЕКТИ ЗАСТОСУВАННЯ СВІТЛОДІОДНОГО

ВИПРОМІНЮВАННЯ ТА ПРОТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ ПРИ

ТЕРАПІЇ ГНІЙНО-ЗАПАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

(Огляд літератури)

ГЗЗ відносяться до числа найбільш розповсюдженої патології людини та часто зустрічаються як в амбулаторній практиці, так і в стаціонарі. Збудники цих захворювань включають велику кількість різноманітних, неспоріднених аеробних та анаеробних мікробів, схильних виступати в співтоваристві один з одним [125].

Незважаючи на досягнення останніх років в галузі мікробіології, імунології, фармакології, розробку новітніх технологій та вдосконалення терапевтичних і хірургічних методик, проблема лікування ГЗЗ залишається надзвичайно актуальною. Інфекції шкіри і м'яких тканин входять в число найбільш частих інфекцій у всьому світі [158, 184].

Провідне місце в лікуванні ГЗЗ різної етіології займає антибактеріальна терапія. Але незважаючи на те, що на сьогодні існує багато препаратів із широким спектром антимікробної дії, проблема лікування ГЗЗ, зокрема у нашій країні, залишається досить актуальною. Це пов'язано зі збільшенням рівня резистентності мікроорганізмів до антибіотиків внаслідок нераціонального їхнього використання: широкого застосування в профілактичних цілях, емпіричного застосування без моніторингу антибіотикорезистентності, безконтрольного самолікування та інш. Також, вагомим фактором у неефективності антибактеріальної терапії є те, що при призначенні лікарських препаратів не враховується дія протимікробних препаратів на біоплівкову форму існування збудників ГЗЗ. З огляду на це є необхідність вдосконалення відомих і пошуку нових методів лікування ГЗЗ.

1.1 Збудники гнійно-запальних захворювань

Вивчення етіологічної структури ГЗЗ та ускладнень, резистентності виділеної мікробіоти до антимікробних препаратів необхідно для розробки схем раціональної антибіотикотерапії, використання яких дає можливість оптимізувати результати лікування хворих та затримати зростання резистентності до антимікробних препаратів.

Антибіотикорезистентність на сьогоднішній день виходить за рамки суто медико-біологічної проблеми, має величезне соціально-економічне значення й у розвинених країнах розглядається загроза національної безпеки [115].

Всесвітня організація охорони здоров'я публікує список стійких до дії антибіотиків "пріоритетних патогенів" - 12 видів бактерій, які становлять найбільшу загрозу для здоров'я людини. Зокрема, в цьому списку підкреслюється загроза, яку представляють грамнегативні бактерії, стійкі до дії відразу декількох антибіотиків. Перша група пріоритетності *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* стійкі до карбапенемів. Друга група - *Enterococcus faecium* стійкі до ванкоміцину; *Staphylococcus aureus* стійкі до метициліну, помірно чутливі або стійкі до ванкоміцину; *Helicobacter pylori* стійкі до кларитроміцину; *Campylobacter* spp. стійкі до фторхінолонів; *Salmonellae* стійкі до фторхінолонів; *Neisseria gonorrhoeae* стійкі до цефалоспоринів та фторхінолонів. Третя група – середній рівень пріоритетності: *Streptococcus pneumoniae* не чутливі до пеніциліну; *Haemophilus influenzae* стійкі до ампіциліну; *Shigella* spp. стійкі до фторхінолонів [18].

Стійкість до антибіотиків спостерігається у всіх країнах. Пацієнти з інфекціями, викликаними резистентними бактеріями, мають підвищений ризик негативних клінічних результатів і летального результату, а також споживають більше медичних ресурсів, ніж пацієнти, інфіковані не резистентними штамми тієї ж бактерії. Стійкість *Klebsiella pneumoniae* -

поширеної кишкової бактерії, яка може викликати небезпечні для життя інфекції - до препарату останньої надії (антибіотики-карбапенеми) поширилася на всі регіони світу. *K.pneumoniae* часто стає причиною внутрішньолікарняних інфекцій, таких як запалення легенів, інфекції кровотоку, а також інфекції новонароджених та пацієнтів відділень інтенсивної терапії. Широке розповсюдження отримала стійкість *E.coli* до фторхінолонів, антибіотиків, які найбільш часто застосовуються при лікуванні інфекцій сечовивідних шляхів. Зараз у багатьох країнах на різних континентах терапія фторхінолонами неефективна більш, ніж в половині випадків. Також широко розповсюдилась стійкість до *Staphylococcus aureus* - частого винуватця важких інфекцій в установах охорони здоров'я та за їх межами. За оцінками, ймовірність смерті хворого, інфікованого метицилін-резистентним золотистим стафілококом на 64% вище, ніж пацієнта з нерезистентним штамом *Staphylococcus aureus* [131].

Збудниками післяопераційних ускладнень ранових поверхонь виступають різні мікроорганізми, циркулювання яких завжди має місце у лікувально-профілактичних закладах, а також ті мікроорганізми, що є представниками флори самого пацієнта. При цьому спектр мікроорганізмів у кожному окремому стаціонарі різних лікувальних закладів варіює залежно від профілю стаціонару, певних циркулюючих внутрішньолікарняних штамів та їх властивостей [61].

Київськими фахівцями Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика досліджено видовий склад збудників гнійно-запальних процесів м'яких тканин, виділених із ранового матеріалу 37 хворих, у тому числі з синдромом діабетичної стопи. Домінуючим збудником був *Staphylococcus aureus* (50,0%), причому його резистентність до пеніциліну виявлено у 100%, до цефтріаксону – у 14,3%, до фторхінолонів (левофлоксацину та ципрофлоксацину) – у 7,1% штамів. При вивченні штамів *Staphylococcus haemolyticus* визначено резистентність до пеніциліну у 100%, до цефтріаксону – у 50%, до фторхінолонів (левофлоксацину,

ципрофлоксацину та офлоксацину) - у 16,7% випадків. Резистентності до амікацину, тобраміцину, нетилміцину, лінезоліду, ванкоміцину і тейкопланіну у жодного з наведених збудників не було виявлено [6].

Останнім часом спостерігається зростаюча роль родини *Enterobacteriaceae*, як етіологічного чинника у виникненні гнійно-септичних післяопераційних ускладнень з високим ступенем летальності при змішаних інфекціях, що пов'язано з їх взаємним індукуванням факторів патогенності і переважанням полірезистентних до антибіотиків штамів [70].

Циркулювання у лікувальних закладах різних умовно-патогенних мікроорганізмів зумовлює певний відсоток післяопераційних уражень ранових поверхонь, що потребує пошуку шляхів вирішення проблеми профілактики та лікування. Для цього слід здійснювати моніторингові дослідження. Групою вчених Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара було визначено частоту виявлення та стійкість до антибіотиків умовно-патогенних ентеробактерій та псевдомонад, що викликають ускладнення ранових поверхонь. Встановлено, що переважаючими збудниками уражень ранових поверхонь були грамнегативні бактерії у відділеннях ендо-відео хірургії (ентеробактерії становлять понад 70%) та гнійної хірургії (псевдомонади – понад 50%). Високий рівень стійкості, а саме цих мікроорганізмів до антибіотиків визначено щодо β -лактамів (понад 60%). Найбільш ефективним був меропенем (87,5% ізолятів чутливі) [61].

Незважаючи на розробку сучасних препаратів та впровадження новітніх технологій для боротьби з патогенними мікроорганізмами, питання терапії гнійно-запальних процесів залишається відкритим. Труднощі в лікуванні хворих на ГЗЗ виникають у зв'язку з надзвичайним зростанням антибіотикорезистентності мікроорганізмів, яку пов'язують з можливістю бактерій утворювати навколо себе захисну плівку.

Протягом останніх десятирічь накопичилася достатня кількість експериментальних даних, які свідчать про складну організацію мікробних

спільнот у природних умовах проживання. На зміну концепції єдиного мікробного збудника інфекційних захворювань прийшли теорії асоціації мікробних спільнот – біоплівок [111, 176].

1.2 Стан проблеми формування біоплівок мікроорганізмами, збудниками гнійно-запальних захворювань

Дослідження механізмів розвитку інфекційного процесу повинні враховувати наявність особливого біологічного явища – формування бактеріальних біоплівок [41, 116, 159].

Вивчення біоплівок викликає величезний інтерес дослідників, головним чином, у зв'язку з тим, що цей спосіб існування бактерій створює великі проблеми в медичній практиці, такі як: значно вища стійкість до антибіотиків й інших лікарських препаратів, збільшення тривалості перебігу захворювань та формування хронізацій і рецидивів інфекційних процесів [144, 97, 98, 73, 187]. Також утворення біоплівок на поверхні виробів медичного призначення (катетерах, ендопротезах та інш.) призводить до несприятливого перебігу післяопераційного періоду [84].

Біоплівка – це не хаотичний конгломерат мікробів, не пов'язаних між собою, а самодостатня, регульована система, яку можна назвати самостійною формою біоти і найважливішою біотичної складової біосфери [72].

Численні дослідження останніх сорока років показали, що процес формування біоплівки є складним і багатостадійним. У життєвому циклі біоплівок виділяють п'ять основних стадій: адгезії, моношару, мікроколоній, дозрівання та розпаду. Усі п'ять із наведених стадій можна спостерігати при формуванні біоплівки будь-яким мікроорганізмом, і кожна з них може бути мішенню для впливу нових антимікробних препаратів [19, 20, 152].

Клітини-резиденти біоплівки занурені в гідратований екзополімерний матрикс, компоненти якого синтезуються самими мікроорганізмами. Матрикс зазвичай містить поліцукриди, білки, нуклеїнові кислоти і ліпіди; він забезпечує механічну стабільність біоплівок, опосередковує їх адгезію до

поверхонь і утворює компактну тривимірну полімерну структуру, яка забезпечує контакт між клітинами і їх транзиторне утримання в біоплівці. Матрикс виконує різні функції для спільноти: від забезпечення структурної жорсткості і захисту від зовнішнього середовища до контролю генної регуляції і адсорбції поживних речовин [21].

У складі біоплівки умовно-патогенні бактерії набувають ознак підвищеної стійкості до антибіотиків та інших факторів довкілля. Сьогодні відомо, що серед усіх інфекційних захворювань близько 65-80 % викликаються бактеріями, що формують біоплівки [120].

Плівкоутворення можна вважати одним із додаткових факторів патогенності мікроорганізмів. Здатність до утворення плівок штамми патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, наприклад, лежить у основі збільшення антибіотикорезистентності [117].

Доведено, що здатність мікроорганізмів до утворення біоплівки дуже підвищує їх резистентність і до дії дезінфікуючих засобів [63, 64, 51].

Встановлено, що збудники флегмон м'яких тканин здатні утворювати біоплівки у післяопераційний період. Виявлено пряму кореляційну залежність між здатністю мікроорганізмів утворювати бактеріальні плівки і тривалістю захворювання [98].

Однією з причин тривалого загоєння ран є наявність персистуючої інфекції та біоплівок мікроорганізмів. Доведено, що у 68% випадків у пацієнтів із діабетичними ранами має місце формування біоплівки мікроорганізмів на поверхні ран. Застосування місцевих лікарських засобів не завжди приводить до повного очищення гнійних діабетичних ран від біоплівки та їх загоєння [97].

Здатність формувати мікробні спільноти була виявлена у ізолятів, виділених з субперіостального абсцесу [188]. В області інфекційно-запального вогнища у пацієнтів з глибокими абсцесами шиї також було виділено мікробні біоплівки [168].

Проблема мікробних біоплівки в останні десятиріччя стає дедалі актуальнішою. Стандартна терапія здатна впоратися тільки з окремо існуючими планктонними клітинами, в той час як бактерії всередині біоплівки здатні розмножуватися і знову дисемінувати після завершення курсу лікування, що призводить до формування хронічних процесів і рецидивів захворювання [73]. Терапевтичний вплив на біоплівки може бути спрямований на механізми первинної адгезії бактерій до поверхні, блокування синтезу або руйнування полімерного матриксу, порушення міжклітинного обміну інформацією, а також він може поєднуватися з власне бактерицидними агентами. Подібне лікування, що діє на структуру або функції біоплівки, може виявитися більш ефективним, ніж стандартна антибактеріальна терапія [132]. Сучасний рівень наукових знань дозволяє підвищувати ефективність терапії хвороб мікробної етіології. На сьогодні не тільки накопичені значні теоретичні знання в цій галузі, але й існує ряд практичних досліджень, але ця проблема залишається досі не вирішеною.

Вивчення впливу антибіотиків на розвиток біоплівки патогенними і умовно-патогенними мікроорганізмами є необхідною умовою розуміння як біологічних основ формування біоплівки, так і пошуку препаратів, що ефективно пригнічують плівкоутворюючі бактерії, які викликають інфекційні ускладнення. Дніпропетровськими вченими було вивчено вплив цефтріаксону та тетрацикліну на формування біоплівки *Staphylococcus epidermidis*, та встановлено, що мінімальна пригнічувальна концентрація антибіотиків для планктонних культур досліджених штамів в 2 рази менша ніж для біоплівкових культур [116].

Київськими фахівцями ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського» НАН України визначено здатність до формування біоплівки штамами стафілококів, ентерококів, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, виділених з різного біологічного матеріалу. Встановлено, що мікроорганізми різних видів, виділені з різного біологічного

матеріалу, відрізняються за здатністю утворювати біоплівку і цей показник є штамоспецифічним [100].

Проводилися дослідження щодо здатності до формування біоплівок у штамів *Pseudomonas aeruginosa* різного походження та досліджено вплив лазерного опромінення на структуру біоплівки. Було визначено, що здатність до формування біоплівки *in vitro* для бактерій виду *P.aeruginosa* є штамоспецифічним явищем. Результати досліджень свідчать про те, що застосоване в експерименті лазерне опромінення вказаного діапазону володіє вираженим бактерицидним ефектом дії на штами бактерій *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.coli*. При електронномікроскопічному дослідженні простежується зміна структури сформованої протягом 24 год. штамами *P.aeruginosa* біоплівки після застосованого лазерного опромінення, що проявляється у порушенні багатоповерхової конструкції біоплівки, зменшенні щільності бактеріальних клітин та розривах у плівкоподібній матриці [101].

Також було вивчено активність формування біоплівки штамми сальмонел, виділених в ЛПЗ України та визначено зміни ступеня чутливості сальмонел в біоплівках до окремих груп найбільш вживаних дезінфектантів в порівнянні з суспензійним станом сальмонел. Встановлено, що штами різних видів сальмонел, як музейні, так і свіжовиділені від хворих в ЛПЗ, в експериментальних умовах здатні формувати бактеріальні біоплівки, але активність формування біоплівок відрізняється і показник одиниць оптичної густини варіює у межах від $0,14 \pm 0,01$ до $1,09 \pm 0,04$, що свідчить про зміну можливості формування біоплівки в процесі збереження. Дезінфекційні засоби, основною діючою речовиною яких є четвертинноамонієва сполука та полігексаметиленгуанідин гідрохлорид, здатні знезаражувати сформовані планшетні біоплівки сальмонел при разовому збільшенні найменшої бактерицидної концентрації, визначеної для суспензійних клітин досліджених штамів сальмонел від 4 до 8,85 разів. Біоплівки сальмонел сформовані на полівінілових та гумових носіях потребують до 16 разового збільшення НБКДЗ №1 для знезараження [65].

Досліджено вплив наночастинок срібла на біоплівкоутворення *Enterococcus faecalis* на поверхні силіконового катетера. Визначено, що біоплівкоутворення на катетерах започатковується адгезією *E. faecalis* наприкінці першої доби росту в бульйонній культурі. Характерною ознакою біоплівкового росту є щільне розташування мікробних клітин на поверхні катетера, яке виникає через клітинний поділ. Виразні форми біоплівок – агломерати – виникають на місці мікроколоній на другу добу і в найбільш розвиненій багатосаровій формі спостерігаються на третю добу. Встановлено, що інкубування фрагментів силіконового катетера протягом 24 годин у суміші бактеріальної суспензії *E. faecalis* з наночастинками срібла у субінгібуючій концентрації 0,01 мг/мл запобігає розмноженню та утворенню мікроколоній *E. faecalis* [121].

Разом з науковцями Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України м.Києва було досліджено вплив наноаквахелату селену на біоплівкоутворення *E. faecalis* і *C. albicans* в асоціації на силіконовому катетері. Було доведено, що препарат наноаквахелату селену у концентрації 0,01 мг/мл призводить до зменшення кількості прикріплених клітин досліджуваних штамів, впливає на зміну морфологічних ознак (зморшкування) клітин *C. albicans*, що можна трактувати як дію селену на клітинну стінку досліджуваного штаму. Наноселен у концентрації 0,0025 мг/мл за 24 години призводив до формування біоплівки досліджуваних штамів мікроорганізмів, тому цей препарат не варто використовувати у низьких концентраціях [122].

Провідними дослідниками Інституту мікробіології й вірусології НАН України було проведено багато експериментів з приводу вивчення формування біоплівок мікроорганізмів. Так, групою фахівців було вивчено динаміку сукцесійних змін у мікробній асоціації за умов формування біоплівки на поверхні сталі. Було доведено, що у процесі формування на поверхні сталі біоплівки в мікробному угрупованні відбуваються сукцесійні зміни. Домінування певної фізіологічної групи мікроорганізмів створює

оптимальні умови для функціонування наступного виду мікроорганізму, який змінює попередній: першими поверхню колонізують гетеротрофні бактерії, що синтезують екзополімери, які сприяють формуванню структури біоплівки [111].

Фахівцями Вінницької національної медичної академії імені М.І.Пирогова та військово-медичного клінічного центру Центрального Регіону Вінниця було оцінено здатність до біоплівкоутворення мікроорганізмів, що виділялись з бойових поранень кінцівок, отриманих військовослужбовцями під час проведення АТО у 2014 році. Було встановлено, що серед мікроорганізмів, які виділяються з мінно-вибухових та вогнепальних бойових ран, переважна більшість володіла здатністю до плівкоутворення. Проте, вираженість цієї ознаки мала суттєві міжвидові та міжштамові відмінності. Домінування плівкоутворюючих штамів бактерій у загальному спектрі ранових ізолятів обумовлене вищою здатністю до виживання мікроорганізмів у складі біоплівок в умовах рани, у порівнянні з планктонними формами мікроорганізмів. Пошкодження, що містили твердий субстрат (фрагменти кісток), у більшій мірі схильні до контамінації плівкоутворюючими штамми мікроорганізмів, у порівнянні з пошкодженнями виключно м'яких тканин [52].

Іншими науковцями Вінницької національної медичної академії імені М.І.Пирогова було досліджено швидкість утворення біоплівок на поверхні ендотрахеальних інтубаційних трубок грамнегативними неферментуючими бактеріями. Встановлено, що динаміка формування біоплівок неферментуючими грамнегативними бактеріями на поверхні полімерних ендотрахеальних трубок нагадує криві росту планктонних форм мікробних популяцій з наявністю фаз розвитку подібних фазам розвитку періодичної культури бактерій: лаг-фази, експоненціальної, стаціонарної, відмирання. Однак, часові масштаби реалізації цих фаз є значно більшими, ніж у планктонній культурі. Процес плівкоутворення *P.aeruginosa* за швидкістю випереджає аналогічний процес *A. baumannii*. У псевдомонад найбільше

зростання кількості клітин у біоплівці спостерігається протягом другої доби перебування зразка ендотрахеальної інтубаційної трубки у культурі бактерій. У акінетобактерій період найбільшої інтенсивності накопичення клітин у біоплівці приходить на третю добу. Завершувався процес бактеріального плівкоутворення неферментуючими грамнегативними мікроорганізмами у кінці четвертої доби перебування зразка у культурі мікроорганізмів. Чутливість мікроорганізмів, що вкарбовані у структуру біоплівки, до антибіотиків і антисептиків може істотно відрізнятись від чутливості планктонних форм [128].

Фахівці Національного медичного університету імені О.О.Богомольця та Київської міської клінічної лікарні №4 дослідили здатність збудників флегмон м'яких тканин утворювати біоплівки в післяопераційний період. Встановлено, що мікроорганізмами, які спричиняли гнійні процеси, були грамнегативні бактерії. Під час загоєння, починаючи з 3-ї доби післяопераційного періоду, на поверхні рани утворюються елементи біоплівок. Виявлено пряму кореляційну залежність між здатністю мікроорганізмів утворювати бактеріальну плівку і тривалістю захворювання. У разі зменшення ознак системного запалення та формування грануляцій біоплівки в рані не спостерігали. Встановлено, що мікроорганізми мають властивість утворювати бактеріальні плівки *in vitro* протягом 18-24 годин, що свідчить про здатність штамів мікроорганізмів формувати агресивне співтовариство. Селекція найбільш життєздатних штамів відбувається на 3-тю добу після оперативного втручання. Її виявлено у 5% спостережень. Наявність біоплівки є критерієм хронізації ранового процесу, що слід ураховувати під час лікування [98].

Вивчено здатність до формування біоплівок у мікроорганізмів, що є чинниками інфекційних процесів та встановлено, що концепція біоплівок торкається інфекційних уражень більшості органів й практично усіх штучних імплантів [69].

Отже, багатьма дослідниками доведено, що 80 % ізолятів здатні формувати біоплівку й колонізувати поверхні органів й тканин, насамперед легень й ран та викликати хронічну шпитальну інфекцію. Біоплівка утворюється і на медичних приладах, обладнанні та формує вогнища інфекції, боротьба з яким ускладнюється.

Процеси формування біоплівок бактерій на слизовій оболонці порожнин організму людини та у зовнішньому середовищі є одним з актуальних питань екології мікроорганізмів й має велике медико – біологічне значення. Ці процеси є не менш цінними для розвитку нанобіології й розробки нових біотехнологій.

Багато питань механізмів формоутворення міжклітинних контактів залишилися невирішеними й тільки застосування сучасної електронної мікроскопії відкрило можливості більш детального вивчення молекулярної організації структурних компонентів бактеріальної клітини й колоній, при цьому на достатньо великих поверхнях близько розташованих клітин, що формують біоплівки певних структур.

В інституті молекулярної біології Єреванського державного університету протягом багатьох років проводяться дослідження з метою вивчення ультраструктурної архітекtonіки міжклітинних контактів у біоплівках *in vitro* й *in vivo*. При дослідженні впливу бактерій на еукаріотичні клітини було встановлено різновид міжклітинних контактів у системі прокаріот – еукаріот, який проявляється адгезією й формоутворенням біоплівок бактерій на глікокаліксі поверхні епітелія слизової оболонки. Таким чином, виявлені ультраструктурні особливості міжклітинних контактів дозволяють вважати, що процес формування біоплівок у мікроорганізмів залежить як від структурної цитоархітекtonіки поверхні мікроорганізмів, так і від функціонально-морфологічних показників субстрату [79].

Проведено багаточисленні дослідження фахівцями різних країн щодо вивчення формування біоплівок мікроорганізмів та впливу на них фізико-

біологічних факторів, які зможуть блокувати здатність до формування біоплівки. Тец В.В. зі співавторами вивчено роль позаклітинної ДНК й ліпідів матриксу у взаємодії бактерій біоплівок з антибіотиками. Було встановлено, що оболонка й зовнішній матрикс біоплівок вивчених штамів містить велику кількість ліпідів аналогічних таким, що знаходяться у мембранах мікроорганізмів спільнот, причому максимально стабільним є кардіоліпін. У роботі доведено, що дія ДНКази на етапі формування й на вже сформовані біоплівки призводить до порушення їх утворення, зменшення біомаси й зниження кількості КУО [123, 126].

Другим напрямом цих дослідників було вивчення впливу екзогенних протеолітичних ферментів на бактерії [124]. Були отримані результати, що характеризувалися особливостями, а саме: зареєстровано зниження виживання бактерій у біоплівках у присутності антибіотиків й ферментів, узятих у концентраціях, при яких вони окремо не змінювали КУО в угрупованні. У присутності папаїну кількість мікробних клітин у складі біоплівок при дії різних антибіотиків знижувалось у 2 - 4 рази, а за присутності вобензиму – у 2 - 10 разів. Було вивчено й здатність формування біоплівок збудників урологічних інфекцій й доведено, що біомаса бактерій – збудників урологічних інфекцій знижується при введенні у комірочки фторхінолонів (левофлоксацину) й показано, що вони є антибіотиками, які здатні долати стабільні ліпіди біоматриксу й впливати на біомасу вже існуючої біоплівки.

У результаті проведених досліджень Харківських вчених доведено, що використання світлодіодного випромінювання фіолетового спектра з антимікробним препаратом левофлоксацином сприяє руйнуванню вже сформованих добових біоплівок ізолятів *S.aureus* та *E.coli* і запобігає формуванню нових [107].

Також було вивчено дію хлорвмісних антисептиків (катіонів), що широко використовуються у практичній медицині у поєднанні з стабілізатором-аніоном динатрієм едетатом на суспензійну культуру *S.aureus*

та на сформовані біоплівки й на здатність планктонних клітин мікроорганізмів до вторинного формування біоплівок [108].

Ученими Дніропетровського національного університету імені Олеся Гончара вивчено вплив офлоксацину та левофлоксацину на сформовані біоплівки бактерій клінічних штамів *Staphylococcus epidermidis*. Показано, що офлоксацин у концентрації, яка перевищує у 100 разів МПК для формування біоплівки у 4,5 та 4,2 рази більш ефективний відносно 24 - годинної та 48 - годинної біоплівки відповідно порівняно з аналогічною концентрацією левофлоксацину [118]. Також було вивчено вплив різних значень кислотності (рН 4,0-8,0) та концентрацій (0,5-3,0%) моно- та дицукрів на формування біоплівки *S.epidermidis* у 6-лункових пластикових планшетах. Встановлено, що формування біоплівки *S.epidermidis* відбувається за кислих значень рН 5,0-6,0 і слабколужних рН – 8,0. Найвищий приріст кількості клітин у біоплівці спостерігали за рН 7,0 - $2,1 \times 10^9$ КУО/мл. Найкраще на формування біоплівки *S.epidermidis* впливав вміст у поживному середовищі 2,0% глюкози – кількість клітин після 3 діб культивування становила $2,3 \times 10^{11}$ КУО/мл [119].

Ученими Кореї було вивчено вплив присутності живих та інактивованих бактерій на утворення біоплівки у дріжджеподібних грибів *C.albicans* та зроблено такі висновки, що бактерії чинять негативний вплив на утворення біоплівок *C.albicans*. Спільне культивування з одним із шести мікроорганізмів (*E.coli*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*) з *C.albicans* призводить до зменшення щільності біоплівки в порівнянні тільки з *C.albicans*. Цей процес пов'язують з пригніченням гіф-залежних генів *C.albicans* та з фізичним впливом бактерій на склад біоплівки та її утворення [183].

Також ці вчені вивчали мікробні біоплівки, що утворювалися на різних урологічних катетерах. Крім того була розрахована відносна гідрофобність поверхні клітин для вимірювання гідрофобності мікроорганізмів. Було зроблено такі висновки, що на поверхні гладких силіконових катетерів

утворення біоплівки зменшувалося в порівнянні з грубими латексними катетерами. Було встановлено, що силікон з покриттям з сріблястого сплаву є найбільш ефективним в зниженні утворення мікробної біоплівки [175].

Фахівцями Одеського національного університету імені І.І. Мечникова встановлено особливості утворення біоплівки та переміщення шляхом роїння клітин штаму *P. aeruginosa* PA01 pJN2133, що характеризується низьким рівнем синтезу цикло-ди-ГМФ. Встановлено, що *P.aeruginosa* PA01 pJN2133 у порівнянні з *P.aeruginosa* PA01 утворює біоплівку з порушеною структурою, маса якої знижена у 3,7 рази. Вже на ранньому етапі формування біоплівки мутантний штам поступається батьківському за кількістю адгезованих клітин. У той же час, на всіх етапах утворення біоплівки *P.aeruginosa PA01pJN2133* кількість планктонних клітин достовірно перевищує рівень, характерний для штаму дикого типу. Морфологія зон роїння досліджуваних штамів суттєво різниться за рядом ознак. Показано, що клітини обох штамів при переході з логарифмічної до стаціонарної фази росту змінюють гідрофобність, але спрямованість змін носить протилежний характер: підвищення у разі мутантного штаму, і зниження у разі штаму дикого типу. Клітини обох штамів мають однаковий дзета потенціал. На тлі низького вмісту у цитоплазмі цикло-ди-ГМФ гальмується адгезія клітин до твердої поверхні і утворення повноцінної біоплівки, що сприяє планктонному способу існування *P.aeruginosa* PA01 pJN2133. Дослідники припускають, що ці явища обумовлені низькою гідрофобністю клітин мутантного штаму та їх високою здатністю до переміщення по поверхні шляхом роїння [180].

Науковці Одеського національного медичного університету імені І.І.Мечникова вивчали взаємодії клітин *Lactobacillus plantarum* P17630 та *Candida albicans* ATCC 18804 при утворенні полівидової біоплівки та встановлення основних етапів її формування. Визначено, що найбільш інтенсивне утворення монобіоплівки окремими штамми *L.plantarum* P17630 та *C.albicans* ATCC 18804 відбувалося впродовж перших двох діб

культивування у рідкому живильному середовищі Сабуро. Під час утворення полівидової біоплівки між *L.plantarum* P17630 та *C.albicans* ATCC 18804 розвивалася антагоністична взаємодія, найбільший прояв якої спостерігався впродовж перших 48 год культивування, визначаючи порушення структурних компонентів біоплівки. В процесі формування моновидових біоплівок було визначено три основних етапи: адгезія клітин до щільної поверхні (перші 24 год), утворення окремих мікроколоній (впродовж другої доби) та формування зрілого суцільного клітинного шару (за 96 год інкубації). Антагоністична взаємодія *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804 у складі полівидової біоплівки, зокрема уповільнення розвитку дріжджоподібних грибів та утворення ними суцільного міцелію, була більш вираженою при утворенні еукаріотним учасником угруповання гіфів, ніж окремих дріжджоподібних клітин [113].

Європейські вчені вважають, що гідрофобні клітини відіграють ключову роль в утворенні біоплівок, але деякі результати показують, що гідрофільні мікроорганізми також мають важливе значення в цих процесах. Незважаючи на численні дослідження екологічних і метаболічних факторів, що впливають на гідрофобність поверхні клітин, знання цього предмета як і раніше мізерні і в більшості випадків обмежені наглядом за впливом гідрофобності на адгезію, агрегацію або флокуляцію. З іншого боку, в запобіганні мікробної адгезії до імплантатів або тканини слід звернути увагу на гідрофільні клітини, що переміщуються на поверхні для їх розселення, і контролювати їх кількість в організмі з використанням відповідних препаратів [153, 174, 181].

На думку багатьох авторів, використання бактеріофагів може стати альтернативою застосування антибіотиків в боротьбі з біоплівками [16, 49, 149, 156, 166].

Але доцільність сумісного прийому хворим бактеріофагів та антибіотиків складно оцінити однозначно. Адже після контакту бактерії з антибіотиком змінюється її здатність до розмноження, формується перехід

планктонних клітин у стан біоплівки, що суттєво впливає на ефективність адсорбції та літичної дії фагів [28].

Новим напрямком є дослідження імунної відповіді макроорганізму на інфекції, асоційовані з біоплівками. У сучасній спеціальній літературі зустрічається інформація про зниження ефективності неспецифічних механізмів захисту організму у відповідь на формування мікробних спільнот [47, 155].

Науковцями із Іспанії було проаналізовано потенціал позаклітинних білків, які були виявлені в матриці біоплівки, щоб викликати імунну відповідь проти *S.aureus*. Виявлено, що екстракт, який містить екзопротеїни матриці біоплівки, індукує захисну імунну відповідь на інфекцію, пов'язану з біоплівками *S.aureus*, і тим самим зменшує колонізацію та персистенцію. Ймовірно, це пов'язано з тим, що ця багатокomпонентна вакцина, яка містила очищені екзопротеїни з біоплівкового матриксу *S.aureus*, пов'язує клітинно-опосередкований імунітет і гуморальну реакцію, де опсоніни відіграють сприятливу роль для викорінення біоплівкової інфекції [164].

Проблема утворення біоплівки протягом багатьох років залишається актуальною. І на сьогодні це питання є не вирішеним. Багатьма науковцями в усьому світі проводяться дослідження щодо вивчення механізму формування біоплівок та пошуку засобів які зможуть блокувати формування біоплівки.

Здатність проникати в біоплівки та діяти на бактерії, що знаходяться всередині, є дуже важливими властивостями антибіотиків, доки, на жаль недостатньо дослідженими і впровадженими у лікарняну практику. У літературних джерелах знайдено не багато даних про особливості дії хіміопрепаратів на біоплівки.

До антибактеріальних препаратів, що діють на ліпиди клітин, відносять цефалоспорини. Ця група антимікробних препаратів діє на основні збудники гнійно-запальних захворювань та має найменш негативний вплив на макроорганізм. Але ж здатність цієї групи антимікробних препаратів проникати в біоплівки збудників гнійно-запальних інфекцій та діяти на

бактерії, що знаходяться та розмножується в них фактично не вивчена. Також необхідно визначити найменшу концентрацію антибіотика, яка буде ефективно діяти на оболонку та матрикс біоплівки, що дуже важливо, особливо, при терапії дітей та підлітків.

1.3 Проблеми лікування гнійно-запальних захворювань

Питання вибору адекватної високоефективної антибактерійної терапії ГЗЗ залишається надзвичайно актуальним. Особливо важливою є проблема зростання антибіотикорезистентності, розповсюдження в позалікарняних умовах MRS штамів, фагостійких і здатних до персистенції у складі біоплівки [28].

Резистентність до антибіотиків піднімається до небезпечно високих рівнів у всіх частинах світу, ускладнюючи здатність лікування інфекційних хвороб [150]. Боротьба з антибіотикостійкими мікроорганізмами в даний час розпалюється з новою силою, тому що кількість резистентних штамів мікробів з року в рік збільшується [23]. Багато наукових розробок присвячено цій проблемі [46, 81, 145]. Тому виникає необхідність пошуку нових ефективних препаратів з вираженою антимікробною активністю для лікування ранових процесів [140]. Антибіотики повинні володіти спектром ефективності, який є настільки широким, наскільки це необхідно, але настільки вузьким, наскільки це можливо [184].

Основним у лікуванні ран залишається хірургічний метод в поєднанні з місцевим лікуванням. Тенденція останніх десятиліть є лікування ран у вологому середовищі, що сприяє зниженню запальної реакції та вираженості рубцювання [167]. Існує методика та результати лікування гнійних ран новим способом – аеродисперсною сумішшю в умовах локального керованого підвищеного тиску. Сутність методу полягає у використанні переваг аерозольної доставки лікарських речовин та підвищеного тиску в порожнині рани з одночасним її дрениванням [142].

Група Вінницьких фахівців провела цитологічне дослідження ранового вмісту у хворих з гнійними ранами на тлі місцевого використання комбінації імуномодулятора ліастену з антимікробною маззю на гідрофільній основі левомеколь. Отримані результати цитологічного дослідження ранового вмісту хворих, комплексне лікування яких передбачало місцеве використання комбінації препаратів ліастену та левомеколю, в динаміці відрізнялись активнішим зменшенням кількості нейтрофільних гранулоцитів та їх деструктивних форм, більш ранньою появою макрофагів та молодих клітин грануляційної тканини, швидшим зміщенням цитограми в бік регенеративно-запального типу у порівнянні з результатами, отриманими у пацієнтів контрольної групи. Цитологічна картина вказує на позитивний вплив запропонованої комбінації препаратів на процеси очищення та загоєння рани [12]. Антисептичні препарати декасан та антимікробна композиція декаметоксину володіють високими антимікробними властивостями до збудників гнійно-запальних процесів (*S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *C.albicans*). Досить висока антимікробна активність спостерігалась у мірамістину. Доведені переваги антимікробної дії на *S.aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *C.albicans* у сучасних перев'язувальних матеріалів, імпрегнованих декаметоксином [76].

Харківськими науковцями Національного фармацевтичного університету було проведено дослідження щодо співставлення хіміотерапевтичної ефективності моно- та комбінованих антимікробних препаратів при лікуванні локалізованої гнійної інфекції в умовах експерименту. Лікування тварин з локалізованою стафілококовою інфекцією, виявилось найбільш ефективним при застосуванні в комбінації ципрофлоксацину та декаметоксину та комбінації антисептиків. Дослідники довели, що на рівні доклінічного моделювання локалізованої гнійної інфекції запропоновані комбінації виявляють задовільні лікувально-профілактичні властивості [140].

Науковці вивчили ранозагоювальної активності нового гелю з наночастками срібла та глюкозаміном за умов лінійної різаної та площинної асептичної рани. Вони встановили, що експериментальний гель сприяє підвищенню міцності рубцевої тканини, ліквідації процесів запалення, скороченню площі ранового дефекту. Автори вважають, що властивості наночасток срібла відкривають перспективу створення місцевого засобу нового покоління для лікування ран, опіків, запальних інфекційних захворювань шкіри [8].

У США проведені дослідження щодо антибактеріальної ефективності *in vitro* біоелектричної пов'язки, що містить срібло і цинк, проти різних ранових патогенів. Результати продемонстрували ефективну бактерицидну активність біоелектричної пов'язки проти антибіотикочутливих бактерій і штамів із множинною лікарською стійкістю й метицилін-резистентного *S.aureus*, та бактеріостатичну дію до видів *Enterococcus*. [173].

Отримані результати Львівських фахівців дають підставу стверджувати, що композиційна суміш похідних γ -кетонолактону та Zn-карнозину володіє виразними антисептичними та ранозагоювальними властивостями при застосуванні її за умов *in vivo* і має перспективу для успішного лікування інфікованих ран м'яких тканин [78].

В літературі є повідомлення використання озонованих розчинів та інфрачервоного випромінювання, що також володіє бактерицидною і регенеративною дією, для комплексного лікування гнійних ран [50].

Є дані про використання низькочастотної ультразвукової кавітації для прискорення обміну речовин на субклітинних і тканинних рівнях, бактерицидного та бактеріостатичного впливу на мікроорганізми, потенціювання антибактеріальних та антисептичних засобів, зміцнення регіонального кровообігу, посилення процесів регенерації в рані [141].

Серед методів фізичного впливу на рану є закрита вакуум-асистована терапія (*vacuum-assisted closure therapy*) – VAC. В основі лежить принцип безперервного або дискретного вакуумного розрідження в ділянці рани, що

може поєднуватись із переміжним промиванням рани антисептиками чи без нього. Однак деякі дослідження показують не значну перевагу VAC відносно традиційних методів лікування. Також залишається дискусійним питання щодо зменшення кількості мікроорганізмів у рані після курсу VAC [143, 178].

Незважаючи на прогрес у розробці та удосконаленні існуючих методів лікування гнійно-запальних процесів, ця проблема залишається пріоритетною в сучасній медицині. Спроба зробити акцент виключно на антимікробний компонент у комплексній програмі лікування цієї патології виявилась недостатньо ефективною [12, 13].

Актуальним залишається пошук нових, ефективних та водночас простих, ергономічних методів місцевого лікування ран [143].

З розробкою та впровадженням в клінічну практику сучасних високоефективних методів терапії з використанням новітніх технологій спостерігається значний прогрес в лікуванні гнійно-запальних процесів. В той же час, можливості для вдосконалення методів лікування ран ще не повністю реалізовані, що обумовлює доцільність продовження та поглиблення досліджень в даному напрямку.

1.4 Застосування оптичного випромінювання в медицині

Однією з серйозних медичних, економічних і соціальних проблем, що не втрачає своєї актуальності, продовжує залишатися пошук та розробка найбільш ефективних та найменш коштовних схем терапії ГЗЗ, зумовлених антибіотикорезистентними мікроорганізмами.

В даний час в комплексному лікуванні ГЗЗ шкіри поряд з класичними методами лікування із застосуванням протимікробних препаратів, широко використовуються різні фізичні фактори такі, як магнітотерапія, лазерне, іонізуюче та ультрафіолетове випромінювання [26]. Однак в останнє десятиліття великий інтерес викликає некогерентного вузькосмугове випромінювання. За даними літератури світлодіодне випромінювання синього кольору має анальгетичну і протизапальну дію [56]. У той же час

чітких даних про бактеріостатичний та бактеріолітичний ефекти світлодіодного випромінювання різних довжин хвиль і потужності в літературі немає, що визначає необхідність експериментального дослідження.

Відомо, що при пропущенні променя світла через призму він розкладається на окремі ділянки, що мають різне забарвлення, тобто спектр. В межах видимого світла в залежності від довжини хвилі забарвлення променів різна. Володіючи хвильовими характеристиками, світло проявляє і корпускулярні властивості. Промениста енергія випромінюється і поширюється у вигляді дискретних одиниць – квантів або фотонів. Квант світла володіє енергією, яка прямо пропорційна частоті коливань і обернено пропорційна довжині хвилі. Тож, величина енергії квантів для різних ділянок спектра буде різна: чим коротше довжина хвилі, тим більше енергія кванта. З урахуванням першого закону фотохімії, тільки поглинені промені можуть бути використані в хімічних реакціях. [42].

В даний час клінічне застосування фотодинамічної терапії добре відомо в медицині. Застосовується в дерматології, урології, стоматології, гастроентерології та нейрохірургії, також є значний прогрес в області фундаментальних наук і клінічної фотодинаміки в останні роки. Сьогодні використання фотодинамічної терапії тільки починається, і необхідно провести більше досліджень, щоб довести її терапевтичну ефективність. Однак нетоксичні з'єднання, що беруть участь у фотодинамічній терапії, дають певну надію на те, що вона стане ефективним механізмом боротьби з хронічними захворюваннями [163].

Терапевтичні переваги світлодіодного випромінювання при лікуванні ран були зареєстровані ще з 1990-х років. Однак багато з описаних результатів показують неузгодженість, в основному через помилковість методології або відсутність стандартизації в дослідженнях. Крім того, використання світлодіодів в якості терапевтичного ресурсу залишається суперечливим [157].

Важливо відзначити, що біологічні ефекти фотодинамічного впливу залежать від багатьох параметрів, зокрема, довжини хвилі і дози, що впливає на якість лікування.

До переваг фототерапії можна віднести: природність та безпечність фізичного фактору, можливість одночасного поєднання фототерапії з лікарськими препаратами та іншими фізичними факторами, вибірковість та цілеспрямованість, фотобіологічну дію на клітини і тканини організму, відсутність безпосереднього контакту випромінювача з поверхнею та додаткового нагріву тканин, що дає можливість застосовувати цей фактор в гостру фазу запалення [5].

З джерел літератури відомо, що світловий потік може здійснювати вплив на організм двома шляхами – через орган зору або через шкіру. При дії світла на шкіру спостерігаються, як звичайні оптичні ефекти, що виникають при проходженні світла через неоднорідне середовище, так і біологічна реакція людського організму. Видиме світло є регулятором біоритмів людини, впливає на шкіру, підшкірний комплекс клітин, на складові елементи крові та на нервову систему (на психіку і емоційний стан). Шкіра людини по-різному пропускає електромагнітні хвилі видимого діапазону. В області діапазону довжин хвиль більше 400-700 нм спостерігається зміна поглинання світла зі збільшенням довжини хвилі. При цьому більшою проникаючою здатністю володіє випромінювання червоного діапазону (630-700 нм); глибина проникнення може сягати 15-20 мм [148].

На сьогодні вивчена дія оптичного випромінювання з різною довжиною хвилі на фізіологічні й патологічні процеси в макроорганізмі. Терапевтичний ефект світлового впливу пов'язаний, насамперед, з його біостимулюючою (фотоактивууючою) дією на активність обмінних процесів в тканинах, у результаті чого прискорюється відновлення уражених хворобою клітин, підвищується активність ферментних систем, поліпшується кисневе забезпечення тканин та процесів тканинного дихання. Внаслідок цього посилюються обмінні процеси, нормалізується периферичний кровообіг,

розсмоктуються інфільтрати, зменшуються або зникають спазми, стимулюються репаративні процеси нервів, кісткової тканини, слизових оболонок, знижуються больові відчуття [54, 55, 56, 127].

В сучасній літературі є дані про застосування світлодіодного та низькоінтенсивного лазерного випромінювання для лікування захворювань у різних галузях медицини [27, 38, 39, 40, 48, 59, 77, 102, 103, 139]. Світлодіодне випромінювання широко застосовують для лікування екзем, псоріазу, фототерапії пухлин, опромінення крові (фотофорез) тощо. Лікувальна дія залежить від довжини хвилі, інтенсивності, тривалості та рівномірності опромінення [147]. Також відомо про додаткові клінічні, мікробіологічні та імунологічні переваги антимікробної фотодинамічної терапії при захворюваннях пародонту [151, 162, 169, 185, 186].

В клінічній та експериментальній практиці встановлена перспективність використання світлодіодного випромінювання для попередження та лікування ГЗЗ [9, 23, 105]. Дані літератури свідчать, що слабкоінтенсивна фотодинамічна терапія, лазерна або світлодіодна, є ефективним терапевтичним способом, що сприяє загоєнню ран шкіри. Біологічні ефекти, що стимулюються цими терапевтичними ресурсами схожі і пов'язані зі зменшенням запальних клітин, підвищенням проліферації фібробластів, стимуляцією ангиогенеза, утворенням грануляційної тканини та посиленням синтезу колагену [157, 182].

На сьогодні головною метою багатьох досліджень є боротьба з інфекційними чинниками захворювань, руйнування біоплівки мікроорганізмів та здатність впливати на формування їх в організмі. У практичному відношенні це потребує використання новітніх методів діагностики й лікування.

Особливу зацікавленість представляє визначення впливу оптичного випромінювання на суспензійну культуру мікроорганізмів – збудників гнійно-запальних процесів з метою визначення здатності формувати біоплівки *in vitro*.

В клінічній та експериментальній практиці встановлена перспективність використання фотонної матриці для попередження та лікування багатьох захворювань, зокрема гнійно-запальних.

Для підвищення ефективності та пролонгації дії протимікробних препаратів фахівцями запропоновані різні способи впливу фізико-біологічних факторів, в тому числі й електромагнітне випромінювання оптичного діапазону [63] при лікуванні пацієнтів з гнійною патологією.

Раціональне використання фізичних факторів у вигляді моно- або комплексної терапії допомагає вирішувати перераховані вище проблеми. Так, у дисертаційній роботі Батраков А.В. обґрунтовує застосування некогерентного світлодіодного випромінювання довжиною хвилі 470нм (синій колір) в комплексному лікуванні хворих фурункулами обличчя та показує в умовах експерименту *in vitro*, що світлодіодне випромінювання довжиною хвилі 470нм (синій колір) не впливає на зростання культур мікроорганізмів, виділених з гнійної рани хворих фурункулами обличчя, однак впливає на скорочення термінів гнійної ексудації, прискорення процесів некролізу, появу грануляційної тканини і крайової епітелізації рани. Автором встановлено, що у хворих, в комплексній терапії яких використовувалося світлодіодне випромінювання довжиною хвилі 470 нм, ознаки продуктивного запалення, що характеризують швидке і повне відновлення тканин, в порівнянні з хворими, які отримували тільки медикаментозне лікування, виражені в більшій мірі. Однак дисертантом не було вивчено дію світлодіодного випромінювання на біоплівкову форму існування мікроорганізмів та вплив червоного спектра світлодіодного випромінювання на планктонну та біоплівкові форми мікроорганізмів, а також комплексне застосування з протимікробними препаратами *in vivo* [5].

Відомий спосіб оцінки ефективності антимікробного впливу антибіотиків та ультразвукового випромінювання на умовно-патогенні бактерії, що існують у формі біоплівки [89], що полягає у створенні моделі бактеріальної біоплівки, вирощеної з біоломінесцентних бактерій *Vibrio*

fischeri, підборі доз впливу антибіотиків та ультразвукового випромінювання на бактеріальну біоплівку, реєстрації та оцінюванні антимікробного ефекту. Причому реєстрацію антимікробного ефекту проводять шляхом визначення інтенсивності світіння біолоюмінесцентних бактерій *Vibrio fischeri*, а антимікробний ефект оцінюють за ступенем пригнічення інтенсивності світіння у порівнянні з контролем. Недоліками способу є визначення дії фізико-біологічних факторів на сформовану біоплівку, планктонні клітини не підлягали випромінюванню. Ступінь оцінки впливу фізико-біологічних факторів за біолоюмінесценцією є обмеженим й потребує спеціального обладнання.

На сьогодні для фототерапії використовуються різні пристрої. Зокрема фізіотерапевтичний апарат [93], що в одному корпусі поєднує блок живлення, без трансформаторного виконання, зі світлодіодною матрицею. Ця матриця представляє собою послідовно з'єднані 21 червоний і 16 інфрачервоних світлодіодів з технічними характеристиками: світлодіоди генерують випромінювання: червоне довжиною хвилі – 650 нм (щільність випромінювання – 0,8 мВт/см²) та інфрачервоне – 920 нм (щільність випромінювання – 1,5 мВт/см²). Зазначений пристрій має технічні властивості, що передбачають його використання для широкого спектра фізіотерапевтичної дії в клінічних та домашніх умовах, але не забезпечують умов для проведення досліджень впливу оптичного випромінювання на мікроорганізми – збудники гнійно-запальних процесів *in vitro*. Ще один пристрій, який використовується для лікування ушкоджень гомілковостопних суглобів [92], містить шину для фіксації в місті ушкодження гомілковостопного суглоба, в якій у спеціально сформованих отворах вмонтовані світлодіоди потужністю не менш 1 мВт в інфрачервоному діапазоні і яскравістю не менш 500 мКд у видимому діапазоні спектра. Світлодіоди видимого та інфрачервоного діапазонів спектра розташовані в отворах шини по чергово еквідистантно з кроком не більш 3 см. Засоби для світлотерапії також можуть бути виконані в вигляді

світлодіодних лінійок, які сформовані з світлодіодів видимого і інфрачервоного діапазонів спектра. Світлодіодні лінійки розташовані в отворах шини по чергово і еквідистантно з кроком не більш 3 см, а отвори для світлодіодних лінійок в шинах розташовані один від одного на відстані не більш 3 см. Засоби для світлотерапії виконані у вигляді світлодіодів, які випромінюють в видимому діапазоні спектра 620 – 660 нм та в інфрачервоному діапазоні спектра 840 – 940 нм. Зазначений пристрій також не забезпечує можливості використання його в експериментах *in vitro* для визначення впливу світла на мікроорганізми.

Відомо спосіб визначення динаміки мінливості мікроорганізмів *in vitro* [91], який базується на впливі низькоенергетичного лазерного випромінювання при енергетичних експозиціях від 0,05 до 0,5 Дж/см², магнітною індукцією поля 60 мТл в продовж 60 с на мікробну клітину в біологічному середовищі з наступною фіксацією бактеріальних клітин тушшю або азур-еозином. Спосіб дозволяє більш якісно оцінити динаміку мінливості мікроорганізмів, тому що після впливу лазера мікробні клітини набувають більш виражене забарвлення.

Існує спосіб фотодинамічної дії червоного (625 нм) й інфрачервоного (805 нм) випромінювання на штами *P.acnes*, які оброблені фотосенсибілізаторами [130], що включає вивчення впливу оптичного випромінювання на адаптацію бактерій за життєздатністю, чисельність популяції бактерій, морфологію колоній і особливості росту на живильних середовищах. Для аналізу морфології бактеріальних клітин через 24-72 години після опромінення готують мікропрепарати і забарвлюють за методом Грама; переглядають препарати шляхом світлової мікроскопії з об'єктивом × 90 під масляною імерсією, а також за допомогою цифрової мікрофотокамери ScoreTek. Але цей спосіб не передбачає вивчення впливу фотодинамічної дії червоного (625 нм) й інфрачервоного (805 нм) випромінювання на здатність до формування біоплівок бактеріями.

Відомий спосіб діагностики ефективності фототерапії *in vitro* [88], що дозволяє обирати режими фотонного впливу залежно від індивідуальних особливостей реактивності хворого при соматичних захворюваннях. Для цього перед сеансом фототерапії у хворого беруть кров, ділять її на дві серії, одну з яких опромінюють дозою $10^2 - 10^4$ Дж/м², після чого проби інкубують впродовж 1 години у темряві, центрифугують, плазму відділяють від кліткових елементів, розбавляють фізіологічним розчином до об'ємного співвідношення 1:40, фотометрують на довжинах хвиль 370 і 410 нм, розраховують величину K_3 , при $K_3=1$, роблять висновок про відсутність реакції крові на випромінювання та можливості припинення фототерапії, при $K_3 < 1$ продовжують лікування з очікуванням позитивного ефекту, при $K_3 > 1$ очікують загострення процесу після опромінювання хворого.

Також завданням антимікробної фотодинамічної терапії є інактивація мікроорганізмів [11]. Багато патогенних та умовно-патогенних бактерій чутливі до слабких лазерів у присутності барвників, таких як метиленовий синій, толуїдин синій, малахітовий зелений та індоціаніновий зелений. Додаткова антимікробна фотодинамічна терапія використовує цей світлоактивний фотосенсибілізатор і слабоінтенсивне лазерне або світлодіодне випромінювання з відповідною довжиною хвилі для індукування синглетного кисню та вільних радикалів, які є токсичними для бактерій [172].

Білоруськими вченими було вивчено дію неполяризованого світлодіодного випромінювання з різними фізичними параметрами на патогенні мікроорганізми в присутності деяких фотосенсибілізаторів в експерименті *in vitro*. В результаті проведених досліджень було встановлено, що локальний антимікробний фотодинамічний вплив з використанням неполяризованого світлодіодного випромінювання і обраних фотосенсибілізаторів (фотолон і метиленовий синій) має виражену бактеріостатичну і бактерицидну дію як на грампозитивні, так і на грамнегативні бактерії, а також фунгіцидну дію на гриби *Candida albicans*

[9]. Також вивчено вплив антимікробної фотодинамічної терапії 1% спиртовим розчином хлорофіліпту в поєднанні з комбінованим магнітосвітлолазерним випромінюванням. Аналіз лікування 42 пацієнтів з гнійними ранами м'яких тканин посттравматичного генезу показав, що в рановій поверхні значно зменшилася лейкоцитарна реакція. Термін перебування пацієнтів в стаціонарі скоротився в 1,5-2 рази. Фотодинамічне лікування 1% спиртовим розчином хлорофіліпту в поєднанні з комбінованим магнітосвітлолазерним випромінюванням мало виражений антибактеріальний ефект [66].

Вінницькими фахівцями оцінено характер впливу низькоінтенсивного лазерного випромінювання на умовно-патогенні мікроорганізми. Встановлено, що поєднання антибактеріальних хіміотерапевтичних препаратів з низькоінтенсивним лазерним випромінюванням дозволяє знизити ефективні концентрації хімічних чинників. Доведено, що механізм мікробоцидної дії низькоінтенсивного лазерного випромінювання синього спектра за даними ультрамікроскопічного дослідження полягав у руйнуванні та відшаруванні клітинної стінки за рахунок потовщення та фрагментації цитоплазматичної мембрани [82].

Метою науковців Ужгородського національного університету було дослідити вплив низькоінтенсивного лазерного випромінювання на антибіотикочутливість мікроорганізмів – збудників гнійно-запальних захворювань. Встановлено, що опромінення низькоінтенсивним лазерним випромінюванням з довжинами хвиль 635 та 870 нм призводить до значного підвищення антибіотикочутливості як клінічних ізолятів, так і колекційних тест-штамів *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*. Найбільш виражена фотомодифікуюча дія спостерігалася при експозиції 180 секунд, що відповідає щільності дози 2,7 Дж/см. Автори дослідження вважають, що опромінення антибіотиків низькоінтенсивним лазерним випромінюванням повністю, або частково їх інактивує, тому опромінення вогнища гнійно-запального процесу рекомендується проводити, згідно фармакокінетики

антибактеріальних препаратів, переважно перед черговим введенням антибіотика [83].

Нашими колегами було вивчено вплив світлодіодного випромінювання та антисептичних препаратів, що містять динатрію едетат, на добові біоплівки *P.aeruginosa*. Встановлено, що під впливом світлодіодного випромінювання червоного, помаранчевого та зеленого спектрів на добові біоплівки ізолятів *P.aeruginosa* спостерігається тенденція до підвищення їх щільності та активація продукції планктонних клітин. Під впливом синього та фіолетового спектрів світлодіодного випромінювання пригнічується як біоплівкоутворення, так і продукція планктонних клітин *P.aeruginosa*. Світлодіодне випромінювання усіх спектрів, що були досліджені, сприяло посиленню чутливості полірезистентних клінічних штамів *P.aeruginosa* до катіонних антисептиків [104].

Під впливом світлодіодного випромінювання помаранчевого спектра на *E.coli* спостерігається тенденція до активації стадії проліферації планктонних клітин біоплівками, зелений спектр світлодіодного випромінювання суттєво не впливає на продукцію планктонних клітин *E.coli*. Під впливом фіолетового спектра світлодіодного випромінювання пригнічується здатність до біоплівкоутворення та продукції планктонних клітин. Всі спектри світлодіодного випромінювання, що вивчалися, сприяли посиленню чутливості ізолятів *E.coli* до дії катіонних антисептиків, що містять динатрію едетат, шляхом активації фотофізичних та фотохімічних реакцій [105]. Також світлодіодне випромінювання синього та фіолетового спектрів надає біодеструктивний вплив на щільні біоплівки полірезистентних штамів *P.aeruginosa*. На підставі проведеного дослідження запропоновано застосування світлодіодного випромінювання синього й фіолетового спектрів у складі комплексної протимікробної терапії гнійно-запальних процесів з метою попередження колонізації *P.aeruginosa* та розповсюдження нозокоміальних інфекцій. Перспективою подальших досліджень в даному напрямку є експериментальне визначення впливу світлодіодного

випромінювання та протимікробних препаратів на добові біоплівки мікроорганізмів з розробкою схем комплексної терапії гнійно-запальних інфекцій [71].

Фахівцями проведено мікробіологічну оцінку впливу світлодіодного випромінювання фіолетового, зеленого й помаранчевого спектрів та антибактеріальних препаратів на суспензійну культуру *S.aureus* й *E.coli* та на здатність бактеріями до формування щільних біоплівок. Проведені дослідження показали, що комплексне застосування низькоінтенсивного некогерентного оптичного випромінювання фіолетового спектра з антимікробними препаратами фторхінолонового ряду (левофлораксацином), сприяє пригніченню проліферативної активності й здатності до формування біоплівок полірезистентних ізолятів *S.aureus* та *E.coli* [106].

Також науковцями оцінено результати антимікробних засобів та світлодіодного випромінювання на біоплівки *S.aureus* та *E.coli*. При використанні оптичного випромінювання помаранчевого спектра і β -лактамних антимікробних препаратів щільність біоплівки була в 1,5 рази вище контрольних значень. Під дією препарату групи фторхінолонів левофлораксацину та помаранчевого спектра випромінювання світлодіодів щільність щоденної біоплівки *S. aureus* зменшувалася в 42,8 рази, а *E. coli* - в 18,9 рази, порівняно з контролем. При визначенні впливу зеленого спектра випромінювання разом з антибактеріальними препаратами β -лактамів на добових біоплівках мультирезистентних штамів спостерігалось пригнічення густини біоплівки ізолятів як *S.aureus*, так і *E.coli* порівняно з контролем. У комплексному застосуванні левофлораксацину та зеленого спектра світлодіодного випромінювання було визначено знищення щоденних біоплівок мультирезистентних ізолятів *S.aureus* у 2,4 рази та 3,1 разу у *E.coli* порівняно з контролем. Подібні результати були отримані при визначенні здатності опромінюваних планктонних клітин утворювати вторинні біоплівки: найменша густина вторинної біоплівки реєструвалася за допомогою оптичного випромінювання фіолетового спектра у поєднанні з

левофлоксацином: щільність вторинної біоплівки *S.aureus* зменшувалася у 52,4 рази, а щільність біоплівки *E.coli* – у 39,3 рази порівняно з контролем [179].

В результаті аналізу даних літератури нами було узагальнено основні біохімічні та біофізичні механізми дії світлодіодного випромінювання: після дії червоного світлодіодного випромінювання оптична щільність бактеріальної культури збільшувалася, що можна пояснити активацією метаболічних процесів в бактеріальній клітині (рис.1).



Рис. 1 Основні біохімічні та біофізичні механізми дії світлодіодного випромінювання на бактеріальну клітину [2, 129]

Основні біохімічні та біофізичні механізми дії світлодіодного випромінювання, за літературними даними, полягають в тому, що внаслідок дії світлодіодного випромінювання синього спектра відбувається, утворення синглетного кисню, який є основним ініціатором фотодеструктивних реакцій,

що сприяє пероксидному фотоокисленню ліпідів з порушенням проникності цитоплазматичної мембрани бактерій за рахунок підвищення в'язкості, що призводить до порушення бар'єрної функції цитоплазматичних мембран та пригніченню метаболічних реакцій, тобто відбувається фотоінактивація - пригнічення розмноження бактеріальних клітин в логарифмічній фазі росту [2].

За дії світлодіодного випромінювання червоного спектра внаслідок фотозбудження електронних станів фотоакцепторів відбувається зміна активності дихального ланцюгу мікроорганізмів та зміна в мітохондріальній редокс-активності, що призводить до стимуляції росту клітин – зміна клітинного редокс-стану у бік окислення – синтез АТФ й ДНК [129].

Таким чином, за даними огляду літератури, було виявлено, що зараз не втрачає актуальності проблема антибіотикорезистентності мікроорганізмів, збудників ГЗЗ шкіри. Багато досліджень, що проведені провідними фахівцями світу, спрямовані на боротьбу з полірезистентними штамми та розробкою шляхів подолання стійкості мікроорганізмів до протимікробних препаратів.

Але ж, у джерелах літератури відсутні відомості про застосування світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів при ГЗЗ шкіри у складі комплексної протимікробної терапії. Невирішеними залишилися питання щодо впливу світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів на імунний та цитокіновий статус при ГЗЗ шкіри, а також поза увагою вчених залишилися питання щодо вивчення імуноморфологічного стану за комплексної дії протимікробних препаратів та світлодіодного випромінювання в експерименті. Це послужило підставою для проведення цього дослідження, спрямованого на розробку і наукове обґрунтування нового методу в комплексному лікуванні ГЗЗ шкіри, особливо у дітей. Тож, одним з перспективних напрямків вирішення проблеми полірезистентності мікроорганізмів є антимікробна терапія із застосуванням

некогерентного світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів.

Висновки до розділу 1:

1. Наведений аналіз даних літератури показує, що ще недостатньо вивчений вплив світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів на біоплівки мікроорганізмів, збудників ГЗЗ.
2. Практично не вивчені ефекти комбінованого використання світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів з традиційними методами лікуванням ГЗЗ шкіри.
3. Викладене дає підставу вважати, що вивчення впливу світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів на бактеріальні біоплівки збудників ГЗЗ шкіри в комбінації з протимікробними препаратами нині є вельми актуальним.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об'єкти і матеріал дослідження

Об'єктом дослідження була антибіотикорезистентність мікробіоти гнійно-запальних захворювань шкіри.

Матеріалом для дослідження було виділення з осередку запалення 98 дітей (від 3 до 12 років), що перебували на лікуванні у Харківській обласній дитячій лікарні №1 в період з 2009 по 2012 рр..

Розподіл за нозологічною формою (рис. 2.1) гнійно-запальних захворювань (n=98): з післяопераційними ускладненнями (n=9), абсцесами (n=25), флегмонами (n=12), карбункулами (n=15), фурункулами (n=14) та бульозним імпетиго (n=23).

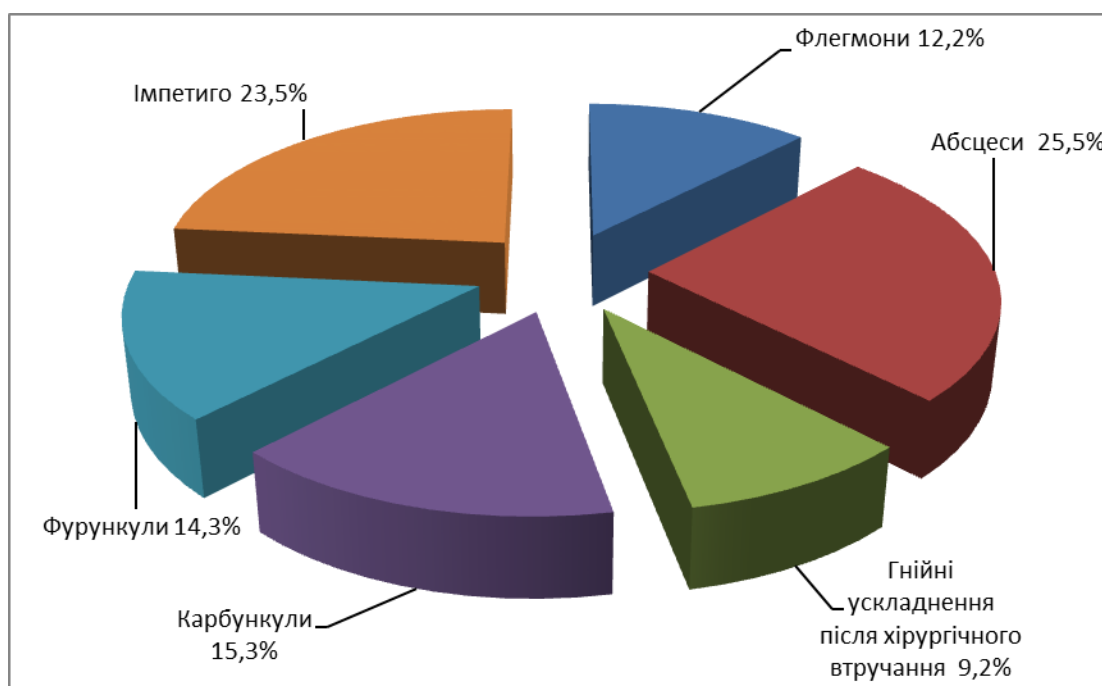


Рис. 2.1 Нозологічні форми гнійно-запальних захворювань у обстежених дітей

Предметом дослідження була комплексна дія протимікробних препаратів і світлодіодного випромінювання на планктонну та біоплівкову

форму існування мікроорганізмів, комплекс мікробіологічних, імунологічних показників та морфологічних ознак.

В роботі використовували антисептичні препарати: 0,05% розчин хлоргексидину, 3% розчин пероксиду водню; антибактеріальні препарати: ампіцилін (амп) – 32/8, цефепім (цфм) - 32/8, цефоперазон (цфп) – 64/16, цефазолін (цфз) - 32/8, цефотаксим (цфс) – 64/8, цефтазидим (цфд) - 32/8, цефтріаксон (цфр) – 64/8, гентаміцин (ген) – 8/4, амікацин (амк) – 32/16, ципрофлоксацин (цип) – 4/1, доксициклін (док) – 16/4, еритроміцин (ери) – 8/0,5, рифампіцин (риф) – 4/1, лінкоміцин (лін) – 8/2, ванкоміцин (ван) - 32/4 гатіфлоксацин (гат) – 4/1, амоксиклав (амо) – 32/8, кліндаміцин (кл) – 32/16, кларитроміцин (кла) – 32/16, іміпенем (ім) – 32/8. Концентрації антибактеріальних препаратів виражено в мкг/мл.

Світлодіодне випромінювання синього (440-480 нм) й червоного (620-740 нм) спектрів.

2.2 Методи дослідження

Забір та бактеріологічні дослідження матеріалу від дітей проводили загальноприйнятими методами [7, 68]. Для виділення чистої культури використовували рекомендовані поживні середовища: 5% кров'яний агар, сироватковий агар, сироватковий бульон, середовище Ендо, жовточно-сольовий агар, середовище Хью-Лейфсона (OF-тест), середовище Мюллера-Хінтона.

Виділені чисті культури клінічних штамів ідентифікували за допомогою ідентифікаційних наборів МІКРО-ЛА-ТЕСТ® які призначені для проведення стандартної ідентифікації з використанням мікрометодів і дозволяють проводити ідентифікацію більшості клінічно важливих мікроорганізмів у короткий термін.

Суспензії мікроорганізмів із певною концентрацією мікробних клітин готували за шкалою McFarland з використанням приладу Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema a.s., Чехія) згідно з інструкцією до приладу (для

ентеробактерій мутність суспензії відповідала – 1 ступеню за шкалою мутності McFarland, для стафілококів та неферментуючих бактерій – 2 ступеню, стрептококів – 3 ступеню).

Оптичну щільність біоплівки та планктонних клітин вимірювали за допомогою мікропланшетного рідера «Multiskan EX» (тип 355), що являє собою фотометр зі змінними фільтрами й здатен проводити стандартні фотометричні вимірювання.

Інтерпритацію результатів проводили за допомогою «ВАСТ – програми» АТ «Аналітика» (м. Москва) та «Ідентифікаційної таблиці» для візуального контролю.

Чутливість виділених мікроорганізмів до антимікробних препаратів вивчали за допомогою «ТПКтестГр+» та «ТПКтестГр-». Тест-система являє собою полістиролові планшети одноразового використання, у чарунках яких міститься 4 аналогічні набори ліофілізованих розчинів антибіотиків у поживному середовищі порогових концентрацій, що дозволяє диференціювати мікроорганізми за ступенем чутливості на три категорії: «чутливі», «помірно-чутливі» та «стійкі». Більша концентрація відповідає *min* значенню МПК для стійких штамів, мала концентрація – *max* значенню МПК для чутливих штамів. Для засіву планшету готували бактеріальну суспензію, розводили дистильованою водою до 100Д за стандартом мутності (ОСО 42-28-59-87), потім завсиль розводили у 10 000 разів. Здобутий інокулят (10^5 мікробних клітин в 1 мл), вносили по 0,05 мл у комірки планшету. Планшети закривали та інкубували при температурі 37⁰С протягом 18 год. Облік і оцінку результатів проводили за допомогою автоматичного аналізатора «Multiskan EX» (тип 355) й «ВАСТ - програми» [53, 74].

Вивчення кінетики росту мікроорганізмів. Культури мікроорганізмів, вирощені на твердому поживному середовищі, змивали суспензійними середовищами (для СТАФІтест, СТРЕПТОтест, ЕНТЕРОтест та НЕФЕРМтест) і доводили їх концентрацію до відповідних одиниць за шкалою McFarland, згідно з інструкцією, за допомогою приладу Densi-La-

Meter (PLIVA-Lachema a.s., Чехія). Мікроорганізми вирощувалися при $t=37$ °C. Кожні 3 години у всіх штамів, що вивчалися, визначалася концентрація мікробних клітин за допомогою приладу «Multiskan EX 355» (довжина хвилі 540 нм). Встановлювали режим періодичного культивування таким чином, щоб протягом експоненціального росту клітинна маса подвоювалася від двох до п'яти разів.

Синхронізація періодичної культури шляхом селекції (метод Мітчисона і Вінсента) [171]. Синхронізація періодичних культур досліджуваних штамів проводилася після встановлення кінетики росту асинхронної культури. Готували 500 мл стерильного поживного середовища (сироватковий агар) в кількох колбах. Інкубували клітини в системі періодичного культивування до середини експоненційної фази. Швидко охолоджували культуру до 0-4 °C, занурюючи колби в крижану баню. Клітини збирали 10-хвилинним центрифугуванням на холоді при 10 000 g. Осад клітин ресуспендували в 2 мл крижаного буфера (0,1 М калій-фосфатного буфера, рН 7,0), на гомогенізаторі типу Vortex. Наносили суспендовані клітини на стерильний охолоджений градієнт щільності фіколу. Закриті кришками епендорфи з клітинами акуратно поміщали в охолоджену центрифугу і центрифугували 15-20 хв при 2500 g на холоді). 0,5 мл найлегшою фракції клітин з епендорфу вносили в колбу з нагрітим поживним середовищем. Вимірювали оптичну щільність й визначали її поетапне збільшення, що свідчило про синхронне зростання культури.

Вивчення біоплівкоутворюючих властивостей бактерій проводили за допомогою визначення здатності штамів бактерій до адгезії на поверхні 96 коміркових полістиролових планшетів для імуноферментного аналізу [87, 177]. Штами вирощувалися за загальноприйнятими у мікробіології методами на рекомендованих для кожної родини бактерій середовищах та умовах культивування. Отримані культури змивали суспензійними середовищами, які індивідуальні для кожної родини бактерій. Вимірювання оптичної щільності початкової бактеріальної суспензії проводили на “Densi-La-Meter” і

доводили концентрації відповідно до ступенів за McFarland: для ентеробактерій – 1 ($3,0 \pm 0,15 \cdot 10^8$ КУО/мл), для стафілококів – 2 ($8,4 \pm 0,15 \cdot 10^8$ КУО/мл), *P.aeruginosa* – 2 ($6,0 \pm 0,2 \cdot 10^8$ КУО/мл) та стрептококів – 3 ($9,0 \pm 0,5 \cdot 10^9$ КУО/мл) за допомогою суспензійного середовища [4]. Для більш точного вимірювання оптичної щільності та отримання статистично достовірних результатів бактеріальну суспензію інокулювали у комірки панелі дозатором по 200 мкл у 4-х повтореннях. Кількість інокульованих планктонних клітин підраховували на фотометрі «Multiskan EX 355» при довжині хвилі 540 нм і виражали в умовних одиницях оптичної щільності. Здобута середня математична оптична щільність (з 4-х комірок) не відрізнялася від необхідної концентрації мікроорганізмів, більш ніж на 10%. При корекції оптичної щільності мікроорганізмів у початковій бактеріальній суспензії використовували суспензійне середовище. У якості контролю використовували стерильні суспензійні поживні середовища без бактеріальної культури.

Після одержання бактеріальної суспензії з необхідною концентрацією мікроорганізмів у комірки планшета інокулювали по 200 мкл даної суспензії з відповідним поживним середовищем у 4-х повтореннях з подальшою інкубацією згідно з умовами для кожної родини бактерій у вологому контейнері під закритою кришкою планшета. Через 24 години інкубації проводили підрахунок кількості клітин на рідері. З комірок панелі вилучали планктонні клітини й забарвлювали плівки. Для цього у комірку вносили 200 мкл фосфатного буферу й 15 мкл 1% спиртового розчину кристалвіолету та інкубували 45 хвилин при кімнатній температурі. Після триразового промивання фосфатним буфером у комірки для екстракції фарби з плівки додавали 250 мкл 96% етилового спирту та інкубували ще 45 хвилин при кімнатній температурі й вимірювали оптичну щільність цього розчину при довжині хвилі 540 нм. Інтенсивність забарвлення вмісту комірок відповідало ступеню плівкоутворення. Кількісним вираженням ступеня утворення

біоплівки було значення оптичної щільності, що виміряне на спектрофотометрі при 540 нм [133].

Опромінення *in vitro* проводили світлодіодними джерелами синього (440-480нм) й червоного (620-740 нм) випромінювання фотонної матриці апарата Коробова «Барва-Флекс», яка складається з двох елементів: світлодіодної матриці з суперлюмінісцентними світлодіодами й блоку живлення. Потужність випромінювання матриці дорівнювала 2мВт/см^2 . Опромінення проводили протягом 15 хвилини [54, 56]. Було розроблено спосіб визначення впливу світлодіодного випромінювання на здатність до формування біоплівок мікроорганізмами, збудниками ГЗЗ *in vitro* [94] та створено спеціальний пристрій для впливу оптичного випромінювання на мікроорганізми [95]. Технічним завданням при виготовленні пристрою були низька собівартість, надійний спосіб фіксації кронштейна на стійці, мінімум деталей та вузлів, з котрих складається штатив, та зручність при використанні. Пристрій складається з робочої платформи 1, на якій розміщений 96 комірковий полістироловий плоскодонний планшет або чашка Петрі з інокульованими мікроорганізмами 2, вертикального штатива 3, фотонної матриці Коробова 4, вузлів кріплення 5, відеокамери 6 та комп'ютера 7 (рис.2.2).

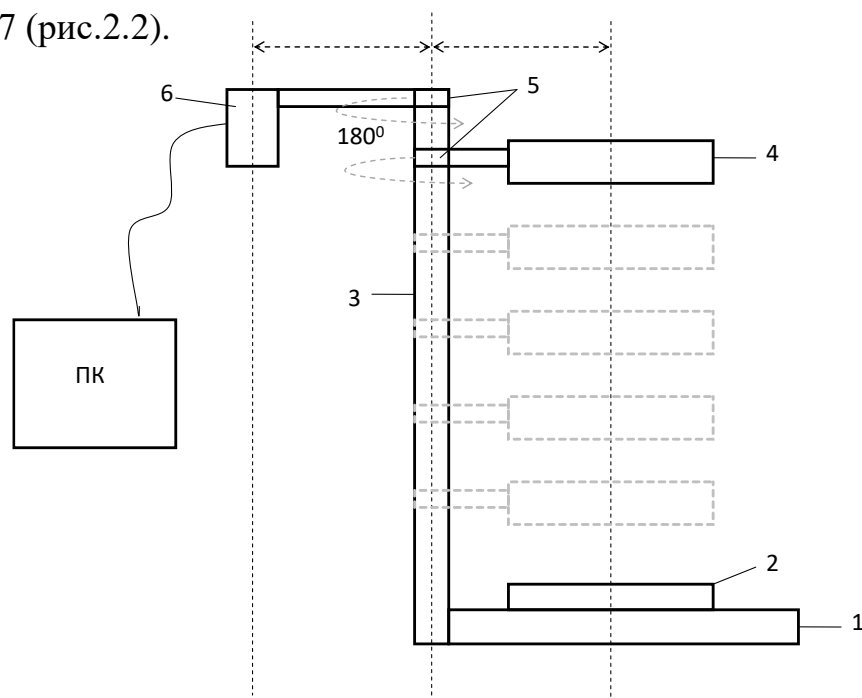


Рис. 2.2 Схема розробленого пристрою

Пристрій працює наступним чином: на робочу платформу встановлюють 96 коміркової полістиролової плоскодонної планшети або чашку Петрі з досліджуваними інокульованими мікроорганізмами та опромінюють з потрібною експозицією за допомогою фотонної матриці Коробова, складеної з 24 штук суперлюмінесцентних світлодіодів з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 470 нм або з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 627 нм.

З метою дослідження дії випромінювання різної щільності на мікроорганізми джерело випромінювання переміщується та фіксується на п'яти різних рівнях від робочої платформи (рис.2.3). Після опромінення проводиться добова інкубація й визначається здатність опромінених планктонних клітин формувати біоплівки та здатність сформованих біоплівок продукувати планктонні клітини за оптичною щільністю, яка реєструється на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм.

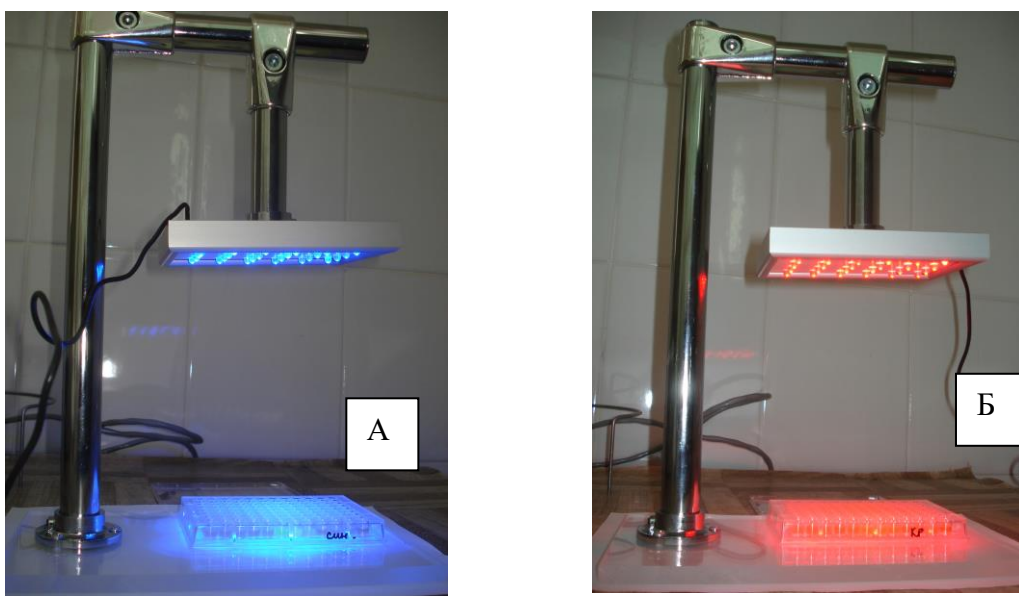


Рис. 2.3 Фотонна матриця Коробова «Барва-Флекс» з синіми світлодіодами (А) та червоними світлодіодами (Б)

Розроблений прилад може бути використаний для визначення оптимальних схем терапії гнійно-запальних захворювань фармацевтичними

протимікробними засобами та низько інтенсивним світлом видимого діапазону, в умовах доклінічного експерименту.

Визначення ефективності світлодіодного випромінювання і протимікробних засобів в дослідях in vivo [86, 96, 161]. Експериментальні дослідження були виконані на 64 мишах інбредних ліній BALB/cJLacSto. Піддослідних тварин витримували на звичайному харчовому раціоні з вільним доступом до води в стандартних клітках. Досліди здійснювали відповідно до національних «Загальних етичних принципів дослідів на тваринах» (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, використовуваних для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 18.03.1986 р.). Моделювання локалізованого гнійно-некротичного процесу проводили шляхом внутрішньошкіряного введення інфікуючої дози лабораторного штаму *P.mirabilis* (ГІСК 160208=SS F403) (рис.2.4).

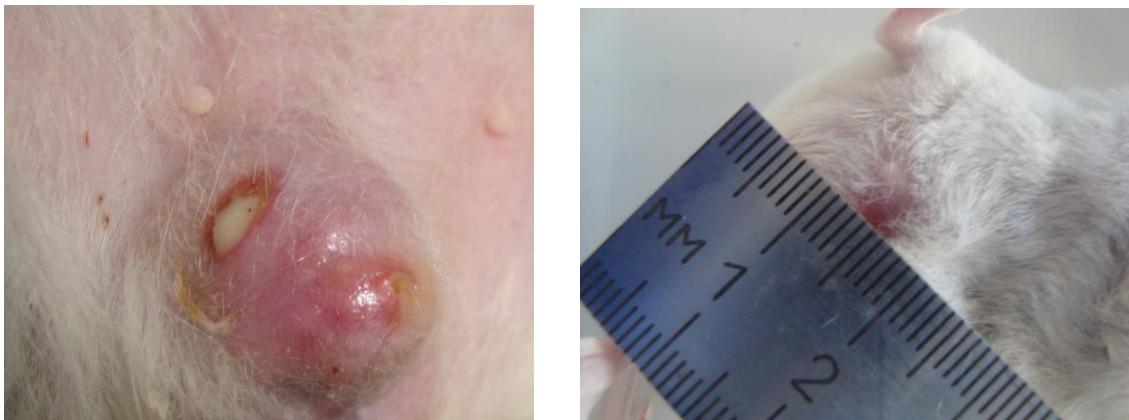


Рис. 2.4 Фіксація ступеня загоювання осередку запалення

Опромінення зони некрозу лабораторних тварин проводили протягом 5 хвилин спеціально розробленими апаратами на базі над'яскравих світлодіодів, що випромінюють у червоному ($\lambda=627$ нм) та синьому ($\lambda=470$ нм) діапазонах спектра. Потужність випромінювання світлодіодів становила 25 мВт, доза - 300 Дж/см, діаметр світлової плями – 10 мм (рис. 2.5).

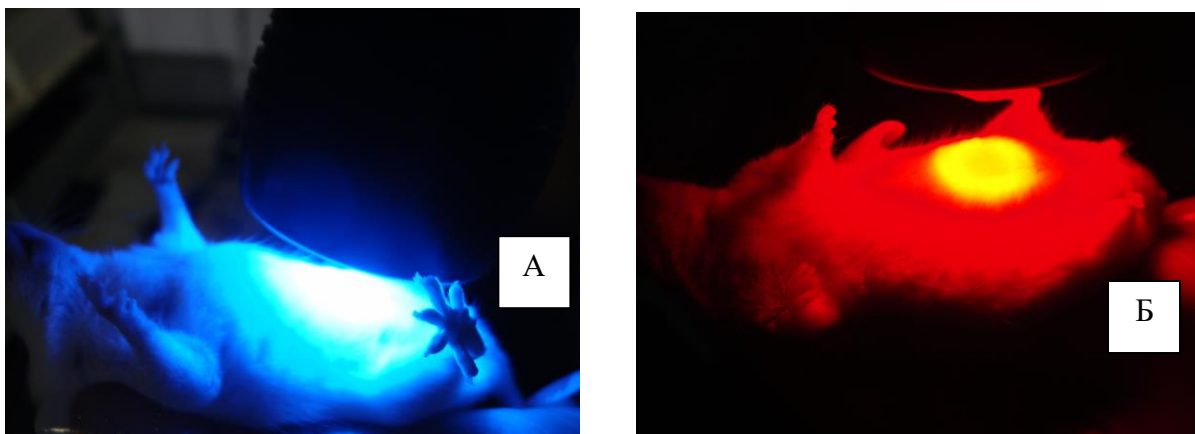


Рис. 2.5 Застосування синього (А) та червоного (Б) світлодіодів *in vivo* при локалізованому гнійно-запальному процесі з проявом некрозу

У роботі використовували мінімально допустиму для статистичної обробки і отримання достовірних результатів загальноприйняту кількість тварин – 8 мишей у групі, а також мінімально достатнє для досягнення мети й рішення задач дослідження кількість експериментальних груп: 1 - інтактні миші (негативний контроль); 2 - інфіковані миші без лікування (позитивний контроль); 3 група – інфіковані тварини та опромінення синім світлодіодом на осередок запалення, який був оброблений хлоргексидином; 4 група – інфіковані тварини та дія червоним світлодіодом на осередок запалення, який був оброблений пероксидом водню; 5 група - інфіковані миші та проведення терапії цефепімом; 6 - інфіковані миші та проведення терапії цефепімом з опроміненням інфільтрату, який був оброблений хлоргексидином, синім світлодіодом 5 хвилин; 7 - інфіковані миші та проведення терапії цефепімом з опроміненням інфільтрату, який був оброблений пероксидом водню, червоним світлодіодом 5 хвилин, 8 - інфіковані миші та проведення терапії цефепімом з опроміненням інфільтрату, який був оброблений антисептиками, синім і червоним світлодіодом 5 хвилин. Розрахунок доз препаратів проводили за формулою Риболовлєва [114]. Виведення тварин з експерименту проводили шляхом миттєвої дислокації. Як матеріал для

морфологічного дослідження використовували печінку, кров, нирки, селезінку, міокард.

Матеріал для морфологічного дослідження фіксували в 10% нейтральному формаліні, після чого двома довгастими розрізами вирізали пластину товщиною – 4 мм. Матеріал піддавали спиртовій проводці й парафіновій заливці, виготовляли зрізи товщиною 5-6 мкм. Оглядові препарати, забарвлені гематоксиліном і еозином, використовували для загальної оцінки стану досліджуваних тканин. Забарвлення препаратів фукселіном на еластичні волокна по Вейгерту з дофарбуванням пікрофусіном за методом Ван Гізон, використовували для виявлення і диференціювання сполучнотканинних структур. За допомогою ШИК-реакції за Мак Манус Хочкісом (контроль з амілазою) виявляли нейтральні глікозаміноглікани. Гістологічні та гістохімічні методики виконували за прописами, викладеним в посібниках з гістологічної техніки і гістохімії [62, 99].

Імуноморфологічне дослідження було проведено на парафінових зрізах непрямим методом Кунса за методикою Brosman [1]. Імунні клітини диференціювали за допомогою моноклональних антитіл фірми Serotec до різних типів клітин. Відносні об'єми загальних клонів імунних клітин були визначені за допомогою сітки Г.Г. Автанділова в люмінісцентному мікроскопі. Кількість клітин-продуцентів цитокінів підраховано у полі зору х400.

Визначення субпопуляцій Т- та В- лімфоцитів у периферійній крові дослідних тварин проводили шляхом постановки реакції імунофлюоресценції (РІФ) з використанням моноклональних антитіл (МКАТ). Центрифугуванням у градієнті фікол-верографіну отримували суспензію лімфоцитів із крові мишей. Розведену кров 1:2 із середовищем 199 (середовище для вирощування культур клітин), нашаровували на один об'єм градієнту, центрифугували при 400 g 25 хв, потім два рази відмивали клітини в середовищі 199. До 50 мкл клітинної суспензії додавали 50 мкл розведених МКАТ у фосфатному буфері з 0,1 % азотом натрію та 0,5 % сироваткового

альбуміну. У контрольну пробірку замість МКАТ вносили 50 мкл фосфатного буфера. Зразки струшували, проводили інкубацію в холодильнику протягом 30 хв при 4⁰С. Клітини один раз відмивали в 1 мл середовища 199 при 300 g 5 хв. Додавали 50 мкл люмінесцентної сироватки проти імуноглобулінів миші в експериментально підібраному розведенні (люмінесцентні сироватки розводили згідно титру в ампулі). Перед дослідом люмінесцентні сироватки центрифугували при 12000-15000 об/хв протягом 20 хв. Струшування зразків проводили на вортексі й витримували в холодильнику при 4⁰С 30 хв. Два рази відмивали в середовищі 199 (2 мл). Ресуспендували клітини у 0,1 мл середовища 199, осаджували на предметному склі 20 хв, відбирали середовище. Клітини висушували в холодному повітрі вентилятора, додавали краплю 50 %-вого гліцерину у фізіологічному розчині. Оцінювали відсоток клітин, що світяться, у люмінесцентному мікроскопі (об'єктив х90) при перегляді 200-300 клітин. Ідентифікацію лімфоцитів проводили методом "фазового контрасту" [43, 45].

Реактиви для визначення субпопуляцій Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів, С3-конвертази комплементу периферичної крові: МКАТ, помічені ФІТЦ, використовували при постановці реакції мембранної імуофлюоресценції у 96-чарункових імунологічних планшетах (обсяг чарунки 0,2 мл).

Фагоцитарну активність нейтрофілів досліджували за здатністю поглинати частинки полістирольного латексу [43].

Для визначення нейтрофільних пасток [29] ставили реакцію з використанням клітинної суспензії нейтрофілів периферичної крові (дослідних тварин), виділених на градієнтних розчинах фіколла-верографіна, потім суспензію наносили на скло, висушували і фіксували 96% етиловим спиртом з додатковою фіксацією клітин на склі за методом Лілі [62] в 10% забуференому формаліні: ядерна речовина забарвлювалася в червоно-помаранчевий колір. Визначення вмісту нейтрофільних пасток здійснювали таким чином: завись нейтрофілів отримували з гепаринізованої крові, яку з метою осадження еритроцитів відстоювали у стерильній пробірці при

температурі $+37^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хвилин. Нейтрофіли виділяли з лейкоцитарною суспензії на подвійному градієнті щільності стерильних розчинів фікола - верографіна. Щільність верхнього шару градієнта становила 1,075-1,077, а нижнього - 1,093-1,095. Обсяг кожного градієнта дорівнював 2 мл. Через 40 хвилин центрифугування при 1500 об/хв між градієнтами з'являлося кільце гранулоцитів з чистотою 98-100%. Кільце нейтрофілів акуратно збирали, переносили в стерильні центрифужні пробірки, тричі відмивали від градієнта стерильним фізіологічним розчином хлориду натрію центрифугуванням при 1500 об/хв протягом 10 хв і доводили до концентрації 5×10^6 клітин/мл. Отриману суспензію клітин інкубували при температурі $+37^{\circ}\text{C}$ протягом 30 хв у присутності 0,1 мл суспензії добової культури референтного штаму *P.mirabilis*. Для фарбування нейтрофільних пасток використовували 200 мкл робочого розчину акридинового помаранчевого (концентрація 2мкг/мл). Облік проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопа Люмам при збільшенні $100 \times 10 \times 1,5$, використовуючи фільтри, що забезпечують збудливе світло з довжиною хвилі не більше 490 нм і емісію з довжиною хвилі 520 нм. В результаті застосування даного способу нейтрофільні пастки були представлені у вигляді тонких яскравих ниток (Рис. 2.6), які обіймали простір і в 2-3 рази перевершували діаметр нейтрофіла, а бактерії-активатори мали яскраво-помаранчевий колір. Такий спосіб забарвлення дозволив провести кількісну оцінку вмісту пасток. Проводився підрахунок 100 структур різних груп, і визначався відсотковий вміст кожної морфологічної одиниці. Такий спосіб забарвлення дозволив оцінити ефективність фагоцитозу і нейтрофільної позаклітинної пастки. Для цього розраховували наступні показники: 1. ФІ - число нейтрофілів з сегментованим ядром, що містять бактеріальні клітини в цитоплазмі, на 100 підрахованих клітин. 2. ФЧ - число бактерій в 100 підрахованих клітинах з сегментованим ядром в перерахунку на 1 клітину. 3. Вміст антигенів в NETs - число антигенів в 100 підрахованих пастках в перерахунку на 1 клітину.

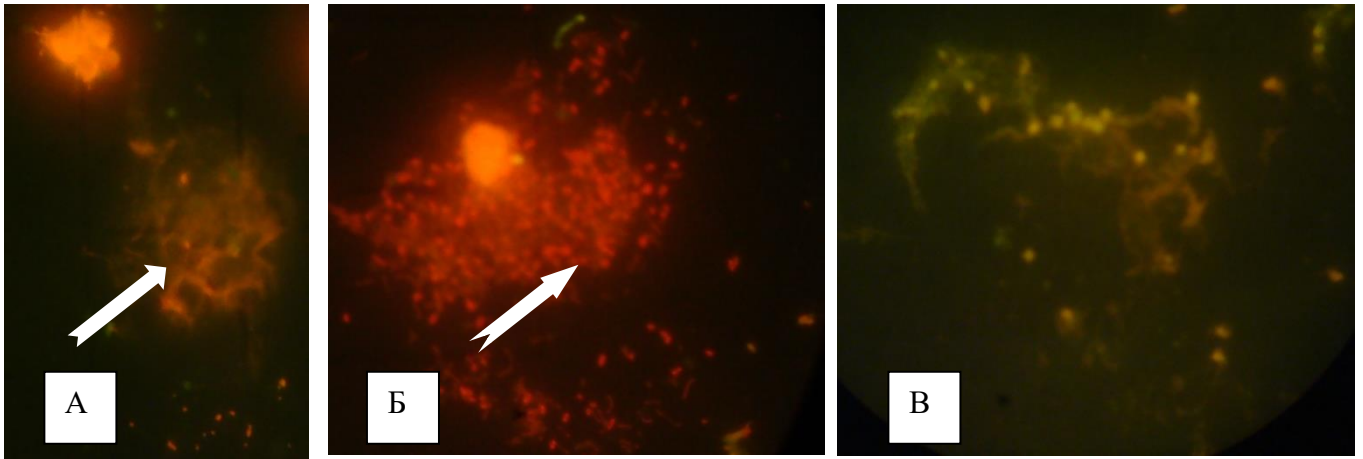


Рис. 2.6 Нейтрофільні позаклітинні пастки за впливу на вогнище протейної інфекції синього (А), червоного (Б) спектра світлодіодного випромінювання та комплексної (В) дії 2-х спектрів світлодіодного випромінювання та цефепіму.

Статистична обробка результатів досліджень [60, 67, 112].

Для статистичної обробки результатів використовували програми: Microsoft Excel 2010, «Statisica 10» StatSoft Inc. (free trial) та BioStat 2009 Professional, version 5.8 (AnalystSoft Inc.). Всі результати представлені у вигляді середнього значення \pm стандартна похибка від середнього значення ($M \pm SE$). Для порівняння декількох груп використовували дисперсійний аналіз. Для перевірки статистичних гіпотез застосовували F - критерій Фішера. Відмінності вважали достовірними при рівні значущості $p < 0,05$.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях: [94, 95, 133].

РОЗДІЛ 3

ВИДОВИЙ СКЛАД, АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ ТА БІОПЛІВКОУТВОРЕННЯ ЗБУДНИКІВ ГНІЙНО-ЗАПАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ШКІРИ У ДІТЕЙ

Визначення тактики застосування антимікробної терапії ГЗЗ шкіри має базуватись, перш за все, на даних про етіологічну структуру і антибіотикорезистентність збудників цих інфекцій. Враховуючи те, що зараз все більшої уваги набуває молекулярно-генетичний моніторинг за епідемічними клонами резистентних штамів мікроорганізмів в системі епідеміологічного нагляду за внутрішньо лікарняними інфекціями на регіональному рівні, актуальним і доцільним є вивчення складу етіологічних чинників ГЗЗ шкіри в даному відділенні з визначенням профілів антибіотикорезистентності, тому що множинна стійкість свідчить про появу штамів нозокоміального походження. Від цього залежать підходи до оптимального лікування [75].

Встановлено, що етіологічними чинниками ГЗЗ шкіри у дітей, що перебували на лікуванні у Харківській обласній дитячій лікарні №1, були як грамнегативні, так і грампозитивні умовно-патогенні мікроорганізми (УПМ). Всього було виділено 184 штами УПМ.

Для визначення етіологічної значущості штамів ентеробактерій досліджували їх біологічні властивості. За морфологічними, тинкторіальними, культуральними характеристиками виділені штами фактично не відрізнялися від притаманних властивостей. В результаті проведення ідентифікації ізолятів при ГЗЗ за допомогою біохімічних тестів MICROLATEST® було визначено їх ферментативну активність.

Слід зазначити, що штами протей за основними біохімічними властивостями властивим як *P. vulgaris*, так і *P. mirabilis* були ідентичні. Розрізнялися лише по здатності до індолоутворенню і дезамінуванню орнитину, на підставі яких вони диференціюються.

Причому 50% штамів *P. vulgaris* не були активними по відношенню до ферментації трегалози, а 23,8% штамів *P. mirabilis* не утилізували цитрат Симонса та тільки 14,3% ферментували цукрозу.

Що стосується ферментативної активності ізолятів *E. coli*, то встановлено, що у 50% випадків відбувалось розщеплення ескуліну та орнітину й у 56,3% проходила ферментатація цукрози.

І тільки 2 штами *K. pneumoniae* були толерантні по відношенню до адоніту (табл.3.1).

Таблиця 3.1

Ферментативна активність штамів родини *Enterobacteriaceae*, що були виділені при ГЗЗ шкіри

ТЕСТ	Кількість штамів з позитивною реакцією									
	<i>P. vulgaris</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>E. coli</i>		<i>K.pneumoniae</i>		<i>K.oxytoca</i>	
	Абс	%	Абс	%	Абс	%	Абс	%	Абс	%
Сірководень	6	100	21	100	-	-	-	-	-	-
Лізин	-	-	-	-	28	87,5	12	100	1	100
Індол	6	100	-	-	32	100	-	-	1	100
Орнітин	-	-	21	100	16	50	-	-	-	-
Уреаза	6	100	21	100	-	-	12	100	1	100
Фенілаланін	6	100	21	100	-	-	-	-	-	-
Ескулін	4	66,7	-	-	16	50	12	100	1	100
Цитрат Симонса	-	-	16	76,2	-	-	12	100	1	100
Малонат	-	-	-	-	-	-	12	100	1	100
Інозит	-	-	-	-	-	-	12	100	1	100
Адоніт	-	-	-	-	-	-	10	83,3	1	100
Целобіоза	-	-	-	-	-	-	12	100	1	100
Сахароза	6	100	3	14,3	18	56,3	12	100	1	100
Сорбітол	-	-	-	-	32	100	12	100	1	100
Трегалоза	3	50	21	100	32	100	12	100	1	100
Манітол	-	-	-	-	32	100	12	100	1	100

При визначенні ферментативної активності *S. aureus* було виявлено, що всі штами ферментували аргінін, відновлювали нітрати в нітрити, давали позитивну біохімічну реакцію з фосфатазою, галактозою, цукрозою,

трегалозою, манітолом, мальтозою, маннозою та лактозою і тільки 9 штамів *S. aureus* не володіли уреазою активністю. Ізоляти *S. epidermidis* ферментували галактозу, цукрозу, фосфатазу, мальтозу та лактозу; володіли уреазою активністю та відновлювали нітрати у нітрити і у 50% випадків – давали позитивну реакцію з аргініном та маннозою. Клінічні штами *S. saprophyticus* ферментували галактозу, цукрозу, трегалозу, манітол та мальтозу і володіли уреазою активністю та відновлювали нітрати у нітрити і тільки 1 штам володів β -галактозидазною активністю (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Ферментативна активність штамів стафілококів та споріднених бактерій, що були виділені при ГЗЗ шкіри

ТЕСТ	Кількість штамів з позитивною реакцією							
	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>S. saprophyticus</i>		<i>M. luteus</i>	
	Абс	%	Абс	%	Абс	%	Абс	%
Уреаза	58	86,6	4	100	2	100	1	50
Аргінін	67	100	2	50	-	-	-	-
Орнітин	-	-	-	-	-	-	-	-
β -галактозидаза	-	-	-	-	1	50	-	-
β -глюкуронідаза	-	-	-	-	-	-	-	-
Ескулін	-	-	-	-	-	-	-	-
Нітрати	67	100	4	100	2	100	-	-
Фосфатаза	67	100	4	100	-	-	-	-
Галактоза	67	100	4	100	2	100	-	-
Сахароза	67	100	4	100	2	100	-	-
Трегалоза	67	100	-	-	2	100	-	-
Манітол	67	100	-	-	2	100	-	-
Ксилоза	-	-	-	-	-	-	-	-
Мальтоза	67	100	4	100	2	100	-	-
Манноза	67	100	2	50	-	-	-	-
Лактоза	67	100	4	100	-	-	-	-

При ідентифікації стрептококів було виявлено, що усі вони ферментували лейцин амінопептидазу та аргінін й, відповідно, відрізнялися

за розкладанням гіпурату, ферментації фосфатази, трегалози та рибози (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Ферментативна активність штамів стрептококів, що були виділені при ГЗЗ шкіри

ТЕСТ	Кількість штамів з позитивною реакцією					
	<i>S. pyogenes</i>		<i>S. mitis</i>		<i>S. agalactiae</i>	
	Абс	%	Абс	%	Абс	%
Гіпурат	-	-	-	-	1	100
Фосфатаза	23	100	-	-	1	100
Лейцин амінопептидаза	23	100	1	100	1	100
β-глюкуронідаза	-	-	-	-	-	-
α-галактозидаза	-	-	-	-	-	-
Ескулін	-	-	-	-	-	-
Аргінін	23	100	1	100	1	100
Уреаза	-	-	-	-	-	-
Манітол	-	-	-	-	-	-
Сорбітол	-	-	-	-	-	-
Трегалоza	23	100	-	-	1	100
Лактоза	23	100	1	100	-	-
Рафіноза	-	-	-	-	-	-
Інулін	-	-	-	-	-	-
Мелібіоза	-	-	-	-	-	-
Рибоза	-	-	-	-	1	100

Аналіз наведених у таблиці 3.4 даних свідчить про те, що при ГЗЗ у переліку мікроорганізмів, які викликають їх, зустрічаються штами *P. aeruginosa*, які відносяться до неферментуючих грамнегативних бактерій (табл. 3.4).

Виявлено, що половина ізолятів давала позитивну реакцію з манітолом, трегалозою та розщеплювала сечовину. Тільки 5 штамів ферментували фосфатазу. Встановлено, що у 16,7% випадків ізоляти *P. aeruginosa* не ферментували ксилолу та галактозу і у 8,3% випадків – арабінозу та малонат, що говорить про біохімічну модифікаційну мінливість даних штамів.

Таблиця 3.4

Ферментативна активність штамів грамнегативних неферментуючих бактерій, що були виділені при ГЗЗ шкіри

ТЕСТ	Кількість штамів з позитивною реакцією	
	<i>P. aeruginosa</i>	
	Абс	%
Уреаза	6	50
Аргінін	12	100
Орнітин	-	-
Лізин	-	-
Ацетамід	12	100
β -глюкозидаза	-	-
Н-ацетил- β -D-глюкозамінідаза	-	-
Цитрат Сімонса	12	100
Лактоза	-	-
Манітол	6	50
Трегалоza	6	50
Ксилоза	10	83,3
Арабіноза	11	91,7
α -галактозидаза	-	-
β -галактозидаза	-	-
Малонат	11	91,7
Галактоза	10	83,3
Мальтоза	-	-
Целобіоза	-	-
Сахароза	-	-
Інозитол	-	-
γ -глутамілтрансфераза	12	100
Фосфатаза	5	41,7
Ескулін	-	-

Таким чином, результати тестування деяких штамів мікроорганізмів, що були виділені при ГЗЗ за допомогою тест-систем MICROLATEST® за певними показниками відрізнялись від типових ідентифікуючих тестів за таблицею, що додається, що свідчить про фенотипову мінливість бактерій. В таких випадках остаточно видова належність визначалась за результатом автоматичного аналізатора «Multiscan».

В результаті аналізу кількості мікроорганізмів, що були виділені при різних ГЗЗ шкіри, було встановлено, що *S. aureus* виділявся при всіх нозологічних формах ГЗЗ, однак переважна кількість зустрічалася при абсцесах 41,9% та флегмонах 41,7% випадків серед усіх ізолятів *S.aureus*. *E. coli* найчастіше виділялася при фурункульозах, флегмонах та карбункульозах у 23,1%, 20,8% та 20,7% відповідно. Також при всіх ГЗЗ висівалися *P. mirabilis* та *S. pyogenes* (табл.3.5).

Таблиця 3.5

Кількість штамів, що було виділено з біологічного матеріалу при різних нозологічних формах гнійно-запальних захворювань шкіри

Ізоляти			Нозологічні форми					
			ФУР (n=15)	КАР (n=14)	ІМП (n=23)	ФЛ (n=12)	АБС (n=25)	ПУ (n=9)
Стафілококи	<i>S. aureus</i> (n=67)	абс	10	8	15	10	18	6
		%	38,5	27,6	32,6	41,7	41,9	37,5
	<i>S. epidermidis</i> (n=4)	абс	-	-	1	-	3	-
		%	-	-	2,1	-	7	-
	<i>S. saprophyticus</i> (n=2)	абс	1	-	-	-	1	-
		%	3,85	-	-	-	2,3	-
<i>M. luteus</i> (n=2)	абс	-	-	-	-	-	2	
	%	-	-	-	-	-	12,5	
Стрептококи	<i>S. pyogenes</i> (n=23)	абс	3	5	4	3	5	3
		%	11,5	17,2	8,7	12,5	11,6	18,75
	<i>S. mitis</i> (n=1)	абс	1	-	-	-	-	-
		%	3,85	-	-	-	-	-
	<i>S. agalactiae</i> (n=1)	абс	-	-	-	-	1	-
		%	-	-	-	-	2,3	-
Ентеробактерії	<i>P. vulgaris</i> (n=6)	абс	1	-	3	-	1	1
		%	3,85	-	6,5	-	2,3	6,25
	<i>P. mirabilis</i> (n=21)	абс	3	4	5	3	4	2
		%	11,5	13,8	10,9	12,5	9,3	12,5
	<i>E. coli</i> (n=32)	абс	6	6	8	5	6	1
		%	23,1	20,7	17,4	20,8	14	6,25
	<i>K. pneumoniae</i> (n=12)	абс	-	4	5	2	-	1
		%	-	13,8	10,9	8,3	-	6,25

Продовж. табл.3.5

	<i>K. oxytoca</i> (n=1)	абс	-	-	-	1	-	-
		%	-	-	-	4,2	-	-
НФ	<i>P. aeruginosa</i> (n=12)	абс	1	2	5	-	4	-
		%	3,85	6,9	10,9	-	9,3	-
Всього (n=184)		абс	26	29	46	24	43	16

Примітка: ФУР – фурункули, КАР – карбункули, ІМП – імпетиго, ФЛ – флегмони, АБС – абсцеси, ПУ – післяопераційні ускладнення, НФ – неферментуючі бактерії.

В загальній структурі збудників цих інфекцій переважали *Staphylococcus aureus*, доля яких складала 36,4 % (рис.3.1). Серед грамнегативних клінічних штамів переважали *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, що виділяли у 17,4 і 14,7 % випадків відповідно.

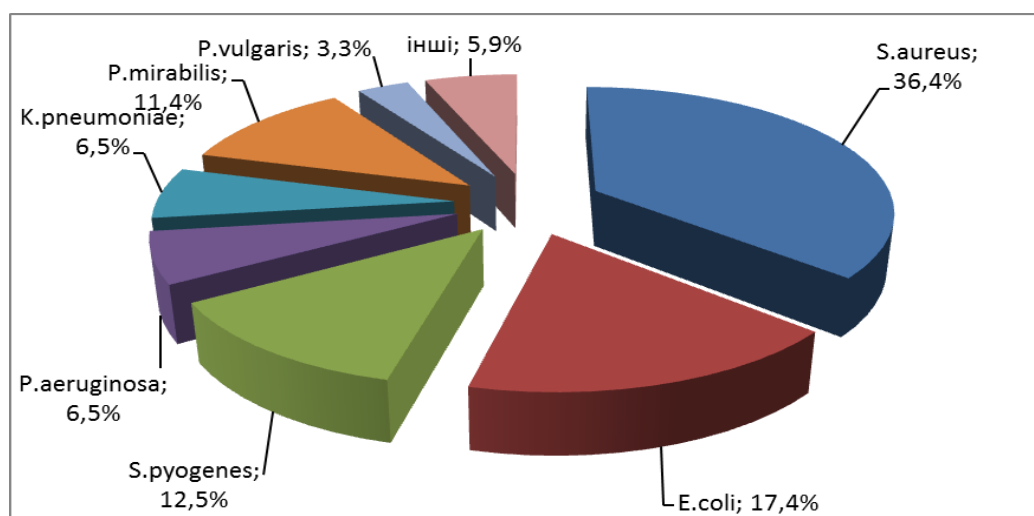


Рис. 3.1 Етіологічна структура збудників ГЗЗ шкіри

Вказані види мікроорганізмів виділяли з біологічного матеріалу як у монокультури (*S. aureus* – 26,9 %), так і в асоціації з іншими мікроорганізмами. У складі мікст-культур переважали *S. aureus* + *E. coli* у 16,4 %, *S. aureus* + *S. pyogenes* у 25,4 % та *S. aureus* + *P. mirabilis* у 14,9 % випадків (рис. 3.2).

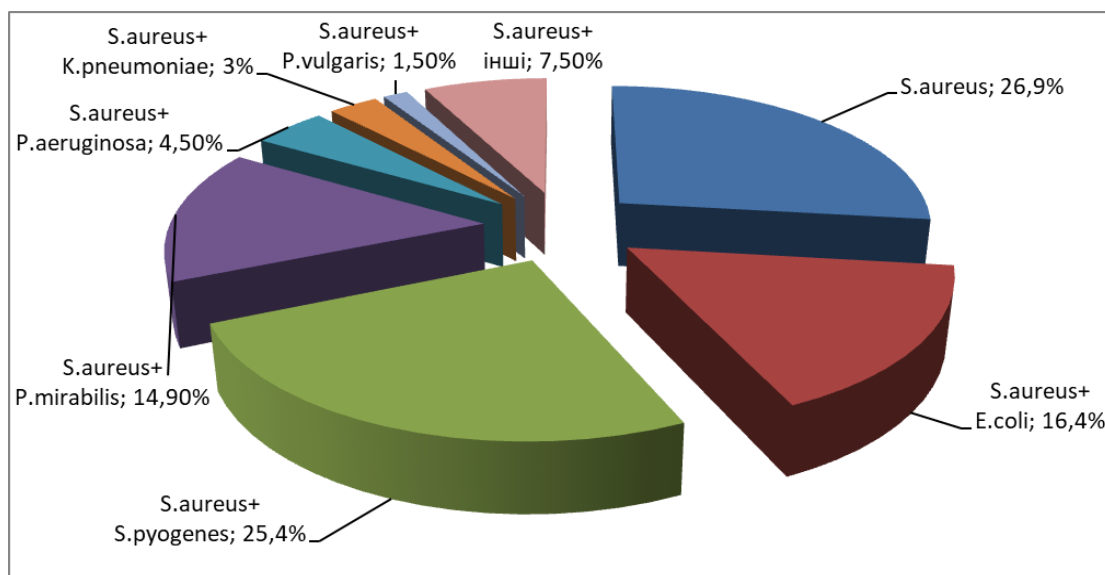


Рис. 3.2 Частота виділення та видовий склад мікст-культур умовно патогенних мікроорганізмів – збудників ГЗЗ шкіри

Слід відзначити також виділення з ран у 5,9 % випадків інших мікроорганізмів: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *M. luteus*, *S. mitis*, *S. agalactiae*, *K. oxytoca*. Оскільки вказані вище мікроорганізми склали незначну етіологічну значущість, тому вони не були в подальшому нами досліджені.

При визначенні чутливості до антимікробних препаратів бактерій було встановлено, що найбільш активними по відношенню до грамнегативних клінічних штамів мікроорганізмів були антибактеріальні препарати: амоксиклав, імipенем, гатіфлосацин, ципрофлоксацин і цефепім, які пригнічували ріст від 65,6 до 91,7 % досліджуваних штамів (табл. 3.6). Інші антибіотики виявились не активними. Слід відзначити, що до гентаміцину, стійкість до якого вважається маркером внутрішньолікарняних штамів були чутливими лише 28,5 – 46,8 % штамів. Цей факт опосередковано вказує на госпітальне походження 53,2 – 71,5 % штамів грамнегативних збудників ГЗЗ шкіри, а також на значні проблеми з етіотропною терапією інфекцій, збудником яких є вказані вище штами.

Таблиця 3.6

Чутливість грамнегативних збудників ГЗЗ шкіри до антимікробних препаратів у планктонній формі

Антибіотик	Кількість чутливих штамів, %				
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumo- niae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeru- ginosa</i>
Ампіцилін	37,5	75,0	4,8	0	0
Амоксиклав	65,6	66,7	23,8	16,7	0
Цефазолін	25,0	25,0	0	0	0
Цефепім	84,4	91,7	71,4	66,7	83,3
Цефотаксим	21,9	41,7	47,6	50,0	16,7
Цефтазидим	18,8	33,3	42,9	33,3	25,0
Цефтріаксон	12,5	16,7	23,8	33,3	8,3
Цефоперазон	18,8	33,3	42,9	33,3	25,0
Гентаміцин	46,8	33,3	28,5	33,3	33,3
Амікацин	46,8	33,3	28,5	33,3	33,3
Ципрофлокса- цин	81,3	66,7	71,4	66,7	66,7
Гатіфлоксацин	87,5	83,3	76,2	66,7	75,0
Доксициклін	28,1	25,0	19,0	16,7	0
Кларитроміцин	25,0	25,0	33,3	16,7	25,0
Іміпенем	90,6	91,7	66,7	66,7	83,3

Грампозитивні УПМ у планктонній формі були високочутливими до цефепіму та іміпенему (табл. 3.7).

Таблиця 3.7

Чутливість грампозитивних збудників ГЗЗ шкіри до антимікробних препаратів у планктонній формі

Антибіотики	Кількість чутливих штамів, %	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Ампіцилін	62,7	78,3
Амоксиклав	76,1	91,3
Цефазолін	71,6	52,2
Цефепім	95,5	91,3
Цефотаксим	76,1	47,8
Цефтазидим	73,1	43,5
Цефтріаксон	62,7	47,8
Цефоперазон	77,6	65,2
Гентаміцин	35,8	39,1
Амікацин	35,8	39,1
Ципрофлоксацин	65,7	52,2
Гатіфлоксацин	85,1	86,9
Доксициклін	26,9	26,1
Кларитроміцин	23,8	65,2
Еритроміцин	28,4	13,0
Імпінем	95,5	91,3
Кліндаміцин	29,9	34,8
Лінкоміцин	26,9	26,1
Ванкоміцин	80,6	78,3
Рифампіцин	23,9	17,4

Пригнічення росту цими препаратами було зафіксовано у 95,5 % штамів *S. aureus* та 91,3 % *S. pyogenes*. Також достатньо високу активність проявляли ампіцилін, амоксиклав, цефоперазон, гатіфлоксацин, імipенем та

ванкоміцин, що пригнічували ріст від 62,7 до 91,3 % досліджуваних штамів. Чутливість стафілококів до ципрофлоксацину була меншою, ніж у грамнегативних УПМ – від 52,2 до 65,7 %. Цефазолін, цефотаксим, цефтазидим та цефтріаксон були активними тільки щодо досліджуваних штамів стафілококів – від 62,7 до 76,1 %. Для пригнічення росту стрептококів ці препарати виявилися значно менш ефективними. До всіх інших протимікробних препаратів досліджувані штами стафілококів та стрептококів були стійкими.

Оскільки ефективність протимікробної терапії залежить часто від форми існування мікроорганізмів, ми дослідили здатність утворювати біоплівки досліджуваними клінічними штамми. Встановлено, що 100 % досліджуваних штамів характеризувалися здатністю утворювати біоплівки (рис.3.3), які є надійним захистом мікроорганізмів від несприятливих факторів зовнішнього середовища, зокрема протимікробних препаратів.

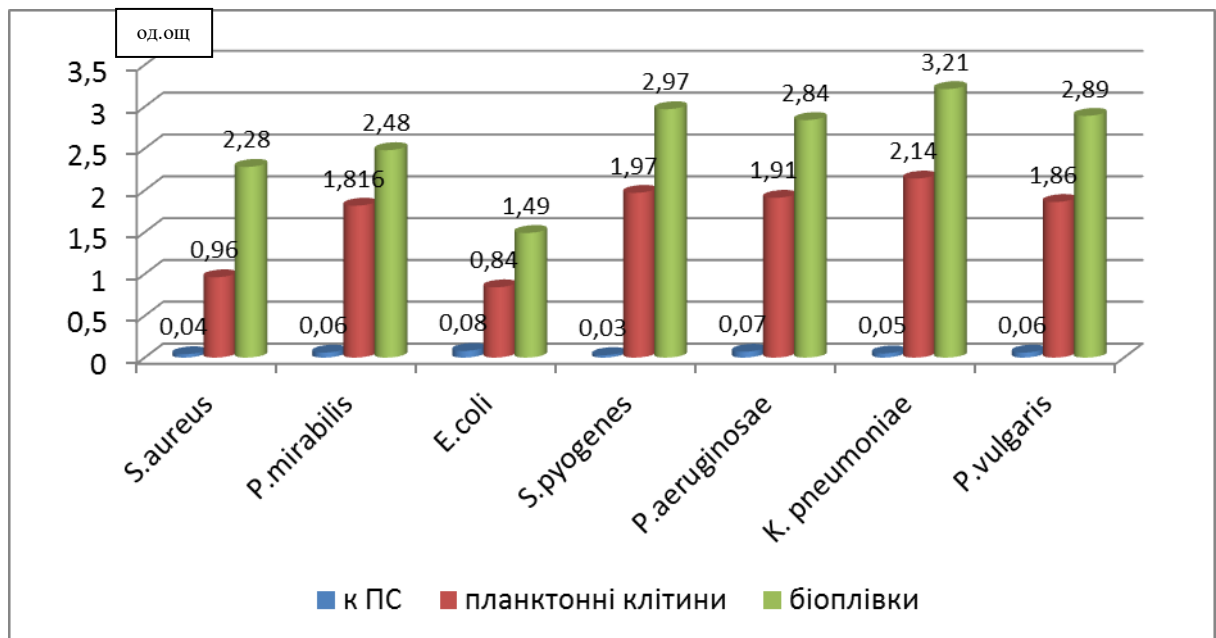


Рис. 3.3 Оптична щільність біоплівок та планктонних клітин клінічних штамів мікроорганізмів, виділених при ГЗЗ (к ПС – оптична щільність поживного середовища без бактеріальної суспензії)

Це опосередковано вказує на те, що ці штами, навіть за чутливості до певних антибактеріальних препаратів можуть бути до них стійкими *in vivo*. Інфекції, викликані такими штамми можуть не піддаватися лікуванню.

Тому наступним етапом дослідження було вивчення впливу активності антибактеріальних препаратів на біоплівки *in vitro*. При визначенні чутливості до антибактеріальних препаратів ізолятів грамнегативних УПМ у біоплівковій формі, встановлено, що майже всі штами були резистентними до них. Чутливість досліджуваних штамів складала від 0 до 33,3 % (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

**Чутливість до антимікробних препаратів біоплівкових форм
грамнегативних збудників ГЗЗ шкіри**

Антибіотик	Кількість чутливих штамів, %				
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ампіцилін	6,2	16,7	0	0	0
Амоксиклав	6,2	0	4,8	16,7	0
Цефазолін	9,4	16,7	0	0	0
Цефепім	21,9	33,3	19,0	16,7	16,7
Цефотаксим	9,4	25,0	4,8	0	0
Цефтазидим	12,5	25,0	4,8	0	0
Цефтріаксон	12,5	16,7	4,8	0	0
Цефоперазон	12,5	16,7	19,0	0	0
Гентаміцин	3,1	8,3	9,5	0	8,3
Амікацин	3,1	8,3	4,8	16,7	8,3
Ципрофлоксацин	9,4	8,3	4,8	16,7	16,7
Гатіфлоксацин	12,5	16,7	14,3	16,7	8,3
Доксициклін	3,1	8,3	4,8	0	0
Кларитроміцин	3,1	8,3	4,8	0	8,3
Іміпенем	12,5	8,3	9,5	16,7	16,7

Що стосується антибіотикорезистентності грампозитивних УПМ, активним був лише амоксиклав, який пригнічував ріст 65,2 % штамів стрептококів (табл. 3.9). Усі інші препарати виявилися не активними.

Таблиця 3.9

**Чутливість до антимікробних препаратів біоплівкових форм
грампозитивних збудників ГЗЗ шкіри**

Антибіотик	Кількість чутливих штамів, %	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>
Ампіцилін	13,4	47,8
Амоксиклав	17,9	65,2
Цефазолін	8,9	8,7
Цефепім	22,4	30,4
Цефотаксим	7,5	4,3
Цефтазидим	5,9	4,3
Цефтріаксон	8,9	8,7
Цефоперазон	5,9	4,3
Гентаміцин	3,0	4,3
Амікацин	5,9	4,3
Ципрофлоксацин	13,4	8,7
Гатіфлоксацин	17,9	4,3
Доксициклін	1,5	8,7
Кларитроміцин	1,5	4,3
Еритроміцин	10,4	4,3
Іміпенем	13,4	13,1
Кліндаміцин	1,5	4,3
Лінкоміцин	1,5	4,3
Ванкоміцин	23,9	13,1
Рифампіцин	11,9	0

Таким чином, отримані дані підтверджують той факт, що чутливість до протимікробних препаратів мікроорганізмів, які асоційовані у біоплівки, не відповідає такій, що визначена для мікроорганізмів у планктонній формі існування і буде створювати значні труднощі при терапії ГЗЗ.

Оскільки *E. coli*, *P. mirabilis* та *S. aureus* були домінуючими збудниками ГЗЗ шкіри та мали високий рівень антибіотикорезистентності, доцільно було проаналізувати профілі антибіотикорезистентності цих збудників.

Встановлено, що найбільша кількість полірезистентних штамів, а саме 83,6 %, стійких до 4 і більше антибіотиків, виявлялась серед *S. aureus* (рис. 3.4). Крім того 76,2 і 50,0 % штамів *P. mirabilis* і *E. coli*, відповідно, також відносились до полірезистентних.

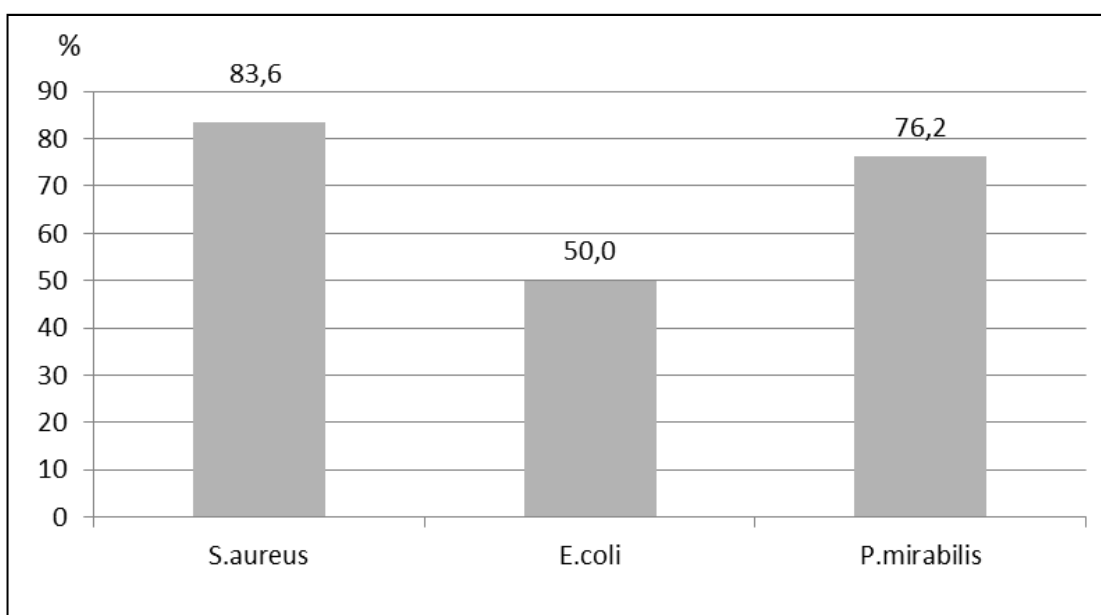


Рис. 3.4 Кільність полірезистентних штамів *S. aureus*, *E. coli* та *P.mirabilis*

Профілі антибіотикорезистентності – це фенотиповий еквівалент сполучень детермінант резистентності кожного з ізолятів. Тому їх визначення має важливе значення для вибору тактики емпіричної та етіотропної антибіотикотерапії ГЗЗ, зокрема шкіри.

Встановлено, що серед найбільш поширених профілів антибіотикорезистентності у *E. coli* зареєстровано сполучення детермінант стійкості до гентаміцину, амікацину та кларитроміцину у 81,3 % штамів, одночасно до гентаміцину, амікацину, кларитроміцину та доксицикліну у 68,8 % штамів, та ампіциліну, цефоперазону, цефазоліну, цефотаксиму, цефтазидиму, цефтріаксону, доксицикліну та кларитроміцину у 56,3 % штамів (табл. 3.10).

Таблиця 3.10

**Найбільш поширені профілі антибіотикорезистентності штамів
E. coli, виділених при ГЗЗ шкіри**

№ штаму	Одночасна стійкість до антибіотиків	№ штаму	Одночасна стійкість до антибіотиків
38 (8831)	IJMN	11 (9803)	AHCEFGIJMN
23 (80)	AIJBN	43 (13412)	AHCEFGKLMN
32 (3938)	AIJMN	41 (12581)	AHCEFGKLMBN
93 (10857)	IJKLN	88 (9715)	AHCEFGIJMBN
13 (11052)	AGIJMN	45 (14237)	ADHCEFGIJMBN
55 (4355)	AHCEFGMNP	70 (15515)	ADHCEFGIJMBN
58 (6857)	HCEFGIJMN	27 (3271)	ADHCEFGIJMBNP
65 (11837)	HEFGIJMBN	33 (5641)	ADHCEFGIJMBNP

Примітка: А – ампіцилін, В – амоксилав, С – цефазолін, D – цефепім, Е – цефотаксим, F – цефтазидим, G - цефтріаксон, Н - цефоперазон, І - гентаміцин, J - амікацин, К – ципрофлоксацин, L – гатіфлоксацин, М – доксициклін, N – кларитроміцин, P – іміпенем.

Серед найбільш поширених профілів антибіотикорезистентності у *P. mirabilis*, зареєстровано сполучення детермінант стійкості до ампіциліну та цефазоліну у 100 % полірезистентних штамів, до ампіциліну, цефазоліну

та цефтріаксону у 87,5 % штамів, до ампіциліну, амоксиклаву та цефазоліну – 75 % штамів, до ампіциліну, цефазоліну та цефотаксиму у 56,3 % штамів, до ампіциліну, цефазоліну, цефтріаксону, гентаміцину, амікацину, доксицикліну, амоксиклав у 56,3 % штамів, до ампіциліну, цефазоліну, цефотаксиму, цефтазидиму та цефтріаксону у 50 % штамів та до цефоперазону, цефазоліну, цефтазидиму, цефтріаксону та доксицикліну у 50 % штамів (табл. 3.11).

Таблиця 3.11

Найбільш поширені профілі антибіотикорезистентності штамів

P. mirabilis, виділених при ГЗЗ шкіри

№ штаму	Одночасна стійкість до антибіотиків	№ штаму	Одночасна стійкість до антибіотиків
18 (12765)	ACGIJMB	90 (10035)	ACGIJKLMBN
49 (15072)	ACFIJBN	15 (12092)	ADHCEFGIJMBN
6 (6050)	ACGIJMBN	61 (9810)	АНCEFGIJKLMN
12 (10557)	АНCFGMBP	24 (184)	ADHCEFGIJKLNP
36 (7691)	ACFGIJMB	54 (4332)	ADHCEFGIJMBNP
93 (10857)	АНCEIJNP	75 (1625)	ADHCEFGIJMBNP
95 (12697)	АНCEFGMBN	82 (4294)	ADHCEFGIJMBNP
76 (2178)	ACGIJKLMBN	38 (8831)	ADHCEFGIJKLMNP

Примітка: А – ампіцилін, В – амоксиклав, С – цефазолін, D – цефепім, Е – цефотаксим, F – цефтазидим, G - цефтріаксон, Н - цефоперазон, І - гентаміцин, J - амікацин, К – ципрофлоксацин, L – гатіфлоксацин, М – доксициклін, N – кларитроміцин, Р – іміпенем.

Серед найбільш поширених профілів антибіотикорезистентності у *S. aureus*, зареєстровано сполучення детермінант стійкості до гентаміцину і амікацину у 71,4 % штамів, до гентаміцину, амікацину та доксицикліну у

60,7 % штамів, еритроміцину і кларитроміцину у 62,5 % штамів, кліндаміцину і лінкоміцину у 51,8% штамів, еритроміцину, рифампіцину і лінкоміцину у 46,4 % штамів, еритроміцину, кларитроміцину і лінкоміцину у 46,4 % штамів (табл.3.12).

Таблиця 3.12

Найбільш поширені профілі антибіотикорезистентності штамів *S. aureus*, виділених при ГЗЗ шкіри

№ штаму	Одночасна стійкість до антибіотиків	№ штаму	Одночасна стійкість до антибіотиків
4 (3574)	IJMRQ	28 (3610)	ABGIJMRN
71 (15653)	MTRQN	34 (5727)	AFGIJMTR
51 (16627)	BMTRQ	37 (8450)	KLMORSQN
73 (44)	OTRQN	66 (12165)	BIJMOTRQ
16 (12382)	IJMORN	77 (2300)	IJMOTRQN
18 (12765)	KMOTRN	79 (3012)	IJKLMRQN
25 (2349)	KMOTQN	81 (4109)	BIJOTRQN
75 (1625)	IJMOTQ	10 (9183)	CIJKMOTRN
86 (9073)	KMOTRN	11 (9803)	IJKLMOTRQ
62 (10851)	CMOTRQ	21 (15553)	IJKLMOTRQ
2 (1545)	IJMOTQN	26 (2431)	AGMOTRSQN
8 (6915)	IJMOTQN	30 (3913)	IJKLMOTRQN
35 (6069)	CIJMOQN	48 (15077)	AGIJKMOTQN
42 (12897)	KMOTRQN	67 (13743)	ABGIJMORQN
50 (16147)	IJKLOQN	44 (13504)	AHCEFGIJMRQ
52 (253)	IJMOTRN	72 (16318)	BIJKLMOTRQN
54 (4332)	IJMTRQN	3 (1713)	AHCEFGKOTRSN
59 (8192)	BIJMORN	76 (2178)	AHCEFGIJTRQN

Продовж. табл. 3.12

63 (11078)	IJMTRQN	90 (10035)	ABEFGIJMORSN
68 (14008)	AGIJMTQ	19 (14787)	АНCEFGIJMOTQN
80 (4054)	AGMOTRQ	24 (184)	АНCEFGK MOTRQN
83 (5253)	IJMOTRQ	94 (12079)	АНCEFGIJOTRQN
91 (10302)	KMOTRQN	7 (6618)	АНCEFGIJMOTRQN
96 (12846)	BKMORQN	69 (14384)	ABHCEFGIJORSQN
97 (13067)	KLMOSQN	74 (1393)	ABHCEFGIJMOTRS
1 (1217)	AFGIJMON	14 (11420)	ADHCEFGIJKLMOTRSNP
5 (5535)	BIJMOTQN	31 (3900)	ADHCEFGIJKMOTRSQNP
12 (10557)	BIJMTRSN	82 (4294)	ABDHCEFGIJKLOTRSQNP

Примітка: А – ампіцилін, В – амоксилав, С – цефазолін, D – цефепім, Е – цефотаксим, F – цефтазидим, G - цефтріаксон, Н - цефоперазон, I - гентаміцин, J - амікацин, К – ципрофлоксацин, L – гатіфлоксацин, М – доксициклін, N – кларитроміцин, О – еритроміцин, Р – іміпенем, Q – кліндаміцин, R – лінкоміцин, S – ванкоміцин, Т – рифампіцин.

Таким чином, представлені дані свідчать про необхідність розробки нових підходів до антимікробної терапії ГЗЗ шкіри.

Висновки до розділу 3:

1. В етіологічній структурі збудників ГЗЗ шкіри у обстежених дітей переважали *S.aureus*, *E.coli*, *Proteus spp.*, доля яких складала 36,4, 17,4 та 14,7 % відповідно.
2. Виявлено, що серед досліджуваних штамів *S.aureus* – 56 штамів з 64, що складало 83,6 %, *E.coli* – 16 штамів з 32 (50%) та 16 штамів з 21 (76,2%) *P.mirabilis* характеризувалися високим рівнем і множинним характером

резистентності до антибактеріальних препаратів, що вказує на обмежений вибір антимікробних препаратів для лікування хворих на ГЗЗ.

3. Встановлено, що більшість ізолятів у планктонній формі були чутливі до цефепіму, ципрофлоксацину, гатіфлоксацину, іміпенему. У формі біоплівки більшість ізолятів були полірезистентними до них.

4. Для подальшого дослідження було відібрано штами *S. aureus* (№11420, 3900, 4294), *E. coli* (№5641, 14237, 15515) та *P. mirabilis* (№4294, 4332, 8831), які мали найбільш високу множинну резистентність.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях: [37, 160, 134, 135].

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ ОПТИЧНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ СИНЬОГО ТА ЧЕРВОНОГО СПЕКТРІВ НА ЧУТЛИВІСТЬ ЗБУДНИКІВ ГЗЗ ШКІРИ ДО ПРОТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ.

В даний час у клінічній практиці широко використовується оптичне випромінювання різного спектрального складу для лікування гнійно-запальних захворювань бактеріальної природи, а також при фізіотерапевтичних процедурах [14, 27, 54, 55]. Контрольований ефект дії світлового випромінювання може бути використаний для корекції чисельності певного виду бактерій, виділених з вогнищ запалення при гнійних ускладненнях після хірургічного втручання та з катетерів, дренажних конструкцій, венфлонів, оскільки застосування тільки антимікробних препаратів є не завжди ефективним, у разі утворення ізолятами щільних біоплівок [15, 25]. Деякі автори доводять, що світлодіодне випромінювання помаранчевого та фіолетового спектрів сприяє посиленню чутливості полірезистентних штамів мікроорганізмів до протимікробних препаратів [63]. Проте, дані про вплив синього та червоного спектрів випромінювання на збудники гнійно-запальних захворювань майже відсутні.

Незважаючи на значну кількість робіт з дослідження функціонування біоплівок, на сьогодні залишається практично не вивченим питання утворення біоплівок мікроорганізмами за впливу світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів. Існуючі способи не забезпечують експериментального дослідження впливу оптичного випромінювання на здатність мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних процесів, до формування біоплівок, як захисної форми їх існування. Вивчення цього аспекту *in vitro* є актуальною задачею для визначення дозування терапевтичного впливу оптичного випромінювання при гнійно-запальних процесах.

Тому метою даного розділу роботи було оцінити ефективність дії світлодіодного синього та червоного випромінювання на планктонні клітини та біоплівки збудників ГЗЗ.

4.1 Вплив світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів на чутливість штамів *P. mirabilis*, *E. coli* та *S. aureus* до антибактеріальних препаратів

При визначенні комплексного впливу світлодіодного випромінювання та протимікробних препаратів на бактеріальну культуру *P.mirabilis* було встановлено, що за впливу світлодіодного випромінювання синього спектра чутливість ізолятів до протимікробних препаратів посилюється: до ампіциліну у 4,2 рази ($p < 0,01$ $F = 11,2$) у тах концентрації, порівняно з контрольними значеннями за дії тільки ампіциліну без опромінення та у 4,6 рази ($p < 0,01$ $F = 12,3$) у міні концентрації, порівняно з контрольними значеннями; до цефепіму – у 5,2 рази ($p < 0,01$ $F = 12,7$) у тах концентрації та у 7,1 рази ($p < 0,001$ $F = 24,4$) у міні концентрації, порівняно з контрольними значеннями; цефоперазону – у 3,6 рази ($p < 0,01$ $F = 15,8$) у тах концентрації та у 4,6 рази ($p < 0,01$ $F = 17,1$) у міні концентрації, порівняно з контрольними значеннями; до цефазоліну – у 3,4 рази ($p < 0,05$ $F = 9,1$) у тах концентрації та у 3,4 рази ($p < 0,05$ $F = 9,1$) у міні концентрації, порівняно з контрольними значеннями; до цефатоксиму – у 3 рази ($p < 0,05$ $F = 9,1$) у тах концентрації та у 4,2 рази ($p < 0,05$ $F = 9,7$) у міні концентрації, порівняно з контрольними значеннями; до цефтазидиму – у 3,7 рази ($p < 0,05$ $F = 8,8$) у тах концентрації та у 3,4 рази ($p < 0,05$ $F = 7,3$) у міні концентрації, порівняно з контрольними значеннями; до цефтріаксону - у 3,4 рази ($p < 0,05$ $F = 7,2$) у тах концентрації та у 3,2 рази ($p < 0,005$ $F = 7,1$) у міні концентрації, порівняно з контрольними значеннями; до гентаміцину – у 3,8 рази ($p < 0,05$ $F = 8,1$) у тах концентрації та у 2,8 рази у міні концентрації, порівняно з контрольними значеннями; до амікацину – у 4,6 рази ($p < 0,01$ $F = 9,3$) у тах концентрації та у 1,7 рази у міні

концентрації, порівняно з контрольними значеннями; до ципрофлоксацину – у 9,3 рази ($p < 0,001$ $F = 26,5$) у max концентрації та у 5,7 рази ($p < 0,01$ $F = 9,9$) у min концентрації, порівняно з контрольними значеннями; до доксицикліну – у 3,7 рази ($p < 0,05$ $F = 7,7$) у max концентрації та у 2 рази у min концентрації, порівняно з контрольними значеннями (табл. 4.1).

За комплексної дії червоного спектра світлодіодного випромінювання чутливість мікроорганізмів до протимікробних препаратів також посилюється, але значно менше: до ампіциліну у 1,3 рази у max концентрації та у 1,5 рази у min концентрації, до цефепіму та до цефотаксиму – 2,6 рази у max концентрації та у min концентрації у 2,8 рази та 3,8 разів ($p < 0,05$ $F = 6,7$); до цефоперазону – у 2,2 рази у max концентрації та у 3,2 у min концентрації, до цефазоліну та до амікацину – у 2 рази у max концентрації та у min концентрації у 2,9 ($p < 0,05$ $F = 5,6$) та 1,5 разів відповідно; до цефтазидиму – у 1,8 рази у max концентрації та у min концентрації у 2,2; до цефтріаксону та до гентаміцину – у 1,9 рази та у min концентрації у 1,7 та 1,5 разів, відповідно; до ципрофлоксацину – у 3,5 рази у max концентрації ($p < 0,05$ $F = 7,7$) та у min концентрації у 2,9 ($p < 0,05$ $F = 6,7$); до доксицикліну – у max концентрації у 1,6 рази та у min концентрації у 1,3 рази, порівняно з контрольними значеннями за дії тільки протимікробних препаратів (табл. 4.1).

Таблиця 4. 1

Чутливість ізолятів *P. mirabilis* до протимікробних препаратів за дії світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів

Антибіотик		Контроль	Червоне світло	Синє світло
Амп	max	0,407 \pm 0,002	0,305 \pm 0,003 *	0,097 \pm 0,002 **
	min	0,622 \pm 0,002	0,417 \pm 0,001*	0,135 \pm 0,002 **
Цфм	max	0,322 \pm 0,003	0,124 \pm 0,003 *	0,062 \pm 0,002 **
	min	0,612 \pm 0,001	0,221 \pm 0,004 *	0,086 \pm 0,002 ***
Цфп	max	0,361 \pm 0,001	0,124 \pm 0,003 *	0,101 \pm 0,001 **
	min	0,616 \pm 0,002	0,221 \pm 0,003 *	0,135 \pm 0,002 **

Продовж. табл.4.1

Цфз	max	0,386±0,002	0,134±0,001 *	0,115±0,002 *
	min	0,622±0,003	0,165±0,003 *	0,182±0,003*
Цфс	max	0,352±0,002	0,125±0,001	0,118±0,002*
	min	0,626±0,003	0,198±0,002	0,149±0,002 *
Цфд	max	0,446±0,003	0,245±0,002	0,121±0,002 *
	min	0,631±0,002	0,291±0,002	0,186±0,002 *
Цфр	max	0,429±0,003	0,226±0,003	0,125±0,001*
	min	0,628±0,002	0,366±0,003	0,198±0,002 *
Ген	max	0,627±0,003	0,226±0,003	0,167±0,002 *
	min	0,642±0,003	0,432±0,002	0,228±0,002 *
Амк	max	0,629±0,003	0,315±0,002 *	0,136±0,002 *
	min	0,634±0,002	0,424±0,003 *	0,381±0,002 *
Цип	max	0,447±0,003	0,128±0,001 *	0,048±0,002***
	min	0,639±0,003	0,218±0,002 *	0,112±0,002 **
Док	max	0,613±0,006	0,375±0,002	0,165±0,002 *
	min	0,638±0,002	0,491±0,002	0,325±0,002

Примітка: * – $p < 0,05$ – порівняно з контрольними значеннями;

** – $p < 0,01$ – порівняно з контрольними значеннями;

*** – $p < 0,001$ – порівняно з контрольними значеннями;

Аналогічна картина спостерігається при комплексному застосуванні протимікробних препаратів та світлодіодного випромінювання на бактеріальну культуру *E.coli* (табл. 4.2).

За результатами дослідження встановлено, що за впливу червоного спектра світлодіодного випромінювання чутливість *E.coli* посилювалася до ампіциліну у 1,8 рази у max концентрації, порівняно з контрольними значеннями за дії тільки ампіциліну без опромінення та у 1,5 рази у min концентрації, порівняно з контрольними значеннями; до цефепіму – у 1,3 рази у max концентрації та у 1,7 рази у min концентрації, порівняно з

контрольними значеннями; цефоперазону – у 1,5 рази у max концентрації та у 1,7 рази у min концентрації, порівняно з контрольними значеннями; до цефазоліну – у 1,6 рази у max концентрації та у 1,4 рази у min концентрації, порівняно з контрольними значеннями; до цефатоксиму – у 1,9 рази у max концентрації та у 1,5 рази у min концентрації, порівняно з контрольними значеннями; до цефтазидиму – у 1,9 рази у max концентрації та у 1,6 рази у min концентрації, порівняно з контрольними значеннями та; до цефтріаксону - у 1,9 рази у max концентрації та у 1,5 рази у min концентрації, порівняно з контрольними значеннями; до гентаміцину – у 1,2 рази у max концентрації та у 1,2 рази у min концентрації, порівняно з контрольними значеннями; до амікацину – у 1,4 рази у max концентрації та у 1,1 рази у min концентрації, порівняно з контрольними значеннями; до ципрофлоксацину – у 2,6 рази ($p < 0,05$ $F = 5,9$) у max концентрації та у 2,3 рази ($p < 0,05$ $F = 5,7$) у min концентрації, порівняно з контрольними значеннями; до доксицикліну – у 1,6 рази у max концентрації та у 1,3 рази у min концентрації, порівняно з контрольними значеннями.

За дії синього спектра світлодіодного випромінювання чутливість *E.coli* до протимікробних препаратів посилюється значно більше: до ампіциліну у 3,1 рази ($p < 0,05$ $F = 7,3$) у max концентрації та у 3,4 рази ($p < 0,05$ $F = 7,7$) у min концентрації, до цефепіму у 4,2 рази ($p < 0,01$ $F = 11,1$) та у 4,1 ($p < 0,01$ $F = 10,8$) відповідно; до цефоперазону – у 3,7 ($p < 0,05$ $F = 7,9$) та 3 рази ($p < 0,05$ $F = 6,1$) відповідно; до цефазоліну у 3,4 ($p < 0,05$ $F = 6,9$) та 2,9 ($p < 0,05$ $F = 7,2$ відповідно; до цефотаксиму у 3,6 ($p < 0,05$ $F = 7,6$) рази та 2,8 ($p < 0,05$ $F = 7,0$) відповідно; до цефтазидиму – у 3,6 ($p < 0,05$ $F = 8,1$) та у 2,9 відповідно; до цефтріаксону – у 3,3 ($p < 0,05$ $F = 5,7$) рази та у 2,2 відповідно; до гентаміцину у 2,2 та у 2,1 відповідно; до амікацину – у 2,1 рази та у 1,9 відповідно; до ципрофлоксацину – у 3,5 рази ($p < 0,05$ $F = 8,2$) та у 4,2 ($p < 0,05$ $F = 9,7$) відповідно; до доксицикліну – у 2,4 рази та у 3,4 ($p < 0,05$ $F = 6,8$) рази відповідно, порівняно з контрольними значеннями за дії тільки протимікробних препаратів без опромінення (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Чутливість ізолятів *E. coli* до протимікробних препаратів за дії світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів

Антибіотик		Контроль	Червоне світло	Синє світло
Амп	max	0,485±0,001	0,265±0,002 *	0,157±0,001 *
	min	0,431±0,003	0,431±0,003*	0,194±0,002 *
Цфм	max	0,346±0,001	0,264±0,004	0,082±0,002 *
	min	0,497±0,001	0,299±0,004	0,121±0,001 *
Цфп	max	0,449±0,003	0,296±0,002	0,082±0,002 **
	min	0,595±0,002	0,348±0,002	0,121±0,001 **
Цфз	max	0,425±0,002	0,258±0,003	0,123±0,002*
	min	0,665±0,002	0,469±0,004	0,199±0,001*
Цфс	max	0,448±0,002	0,235±0,003	0,126±0,002*
	min	0,663±0,001	0,449±0,004	0,237±0,001*
Цфд	max	0,435±0,002	0,232±0,002	0,122±0,001
	min	0,667±0,001	0,423±0,002	0,228±0,002
Цфр	max	0,424±0,002	0,226±0,003	0,127±0,002 *
	min	0,645±0,002	0,434±0,003	0,229±0,001 *
Ген	max	0,557±0,001	0,471±0,003	0,259±0,002
	min	0,648±0,003	0,563±0,003	0,308±0,002
Амк	max	0,488±0,002	0,347±0,003	0,236±0,002
	min	0,663±0,001	0,582±0,003	0,343±0,002
Цип	max	0,336±0,002	0,128±0,004*	0,095±0,002 *
	min	0,553±0,002	0,237±0,004 *	0,131±0,002 *
Док	max	0,653±0,002	0,553±0,002	0,269±0,002 *
	min	0,664±0,002	0,501±0,003	0,197±0,001 *

Примітка: * – $p < 0,05$ – порівняно з контрольними значеннями;

** – $p < 0,01$ – порівняно з контрольними значеннями;

При визначенні антибіотикочутливості ізолятів *S.aureus* за впливу червоного світла та протимікробних препаратів було виявлено, що виділені штами проявляли стійкість до досліджуваних антибактеріальних препаратів – у комірках мікропланшетів як з більшою, так і з меншою концентрацією антибактеріальних препаратів був наявний ріст культури (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Чутливість ізолятів *S. aureus* до протимікробних препаратів за дії світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів

Антибіотик		Контроль	Червоне світло	Сіне світло
Ген	max	0,541±0,002	0,221±0,002	0,137±0,003 *
	min	0,557±0,001	0,349±0,002	0,219±0,002
Ери	max	0,517±0,001	0,247±0,002	0,168±0,002*
	min	0,515±0,002	0,365±0,002	0,223±0,002
Риф	max	0,512±0,001	0,381±0,002	0,215±0,002
	min	0,518±0,002	0,414±0,003	0,294±0,003
Цип	max	0,572±0,002	0,342±0,002	0,114±0,002 *
	min	0,576±0,002	0,354±0,002	0,165±0,002 *
Лін	max	0,458±0,002	0,345±0,002	0,219±0,002
	min	0,567±0,003	0,458±0,002	0,324±0,002
Ван	max	0,438±0,003	0,138±0,002	0,113±0,002 *
	min	0,571±0,002	0,291±0,002	0,184±0,002 *
Цфм	max	0,436±0,002	0,135±0,002	0,112±0,003 *
	min	0,521±0,001	0,228±0,002	0,189±0,003 **

Примітка: * – $p < 0,05$ – порівняно з контрольними значеннями;

** – $p < 0,01$ – порівняно з контрольними значеннями;

Встановлено, що за дії синього та червоного спектрів оптичного випромінювання чутливість бактеріальної культури *S. aureus* до

протимікробних препаратів посилюється. Так, наприклад, за впливу червоного спектра світлодіодного випромінювання чутливість до цефепіму посилювалася у 1,7 рази у тах концентрації порівняно з контрольними значеннями за дії тільки цефепіму без опромінення та у 1,6 рази у міні концентрації порівняно з контрольними значеннями; до ванкоміцину – у 3,2 рази у тах концентрації та у 2 рази у міні концентрації порівняно з контрольними значеннями; до лінкоміцину – у 1,6 рази у тах концентрації та у 1,2 рази у міні концентрації порівняно з контрольними значеннями; до ципрофлоксацину – у 3,2 рази у тах концентрації та у 2,3 рази у міні концентрації порівняно з контрольними значеннями; до рифампіцину – у 1,3 рази у тах та міні концентрації порівняно з контрольними значеннями; до еритроміцину – у 2,3 рази у тах концентрації та у 1,6 рази у міні концентрації порівняно з контрольними.

А за дії синього спектра світлодіодного випромінювання чутливість до цефепіму посилювалася у 5,1 рази ($p < 0,01$ $F = 11,7$) у тах та у 3 рази ($p < 0,05$ $F = 9,3$) у міні концентрації; до ванкоміцину – у 3,9 рази ($p < 0,05$ $F = 8,5$) у тах та у 3,1 рази ($p < 0,05$ $F = 6,9$) у міні концентрації; до лінкоміцину – у 2,6 рази у тах та у 1,8 рази у міні концентрації; до ципрофлоксацину – у 3,8 рази ($p < 0,05$ $F = 7,7$) у тах та у 3,2 рази ($p < 0,05$ $F = 5,8$) у міні концентрації; до рифампіцину – у 2,4 рази у тах та у 1,8 разів у міні концентрації; до еритроміцину – у 3,4 рази ($p < 0,05$ $F = 6,2$) у тах та у 2,5 рази у міні концентрації; до гентаміцину - у 3,9 рази ($p < 0,05$ $F = 8,1$) у тах та у 2,5 рази у міні концентрації, порівняно з контрольними значеннями за дії тільки цефепіму без опромінення, що дає підставу рекомендувати комплексне застосування світлодіодного випромінювання разом з протимікробними препаратами.

Переважає більшість мікроорганізмів існує у двох фізіологічних формах, одна з яких є форма біоплівки, що характеризує мікробіологічну спільноту як функціонально координований консорціум з певними механізмами захисту від антимікробних препаратів та імунних факторів. У

зв'язку з цим було вирішено провести дослідження щодо встановлення комплексної дії світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів та антибактеріального препарату на біоплівкоутворення дослідних штамів.

Виходячи з того, що найбільш активним по відношенню до виділених штамів бактерій у планктонній та біоплівковій формі існування був цефепім, було вирішено взяти у дослідження саме цей препарат, який застосовувався для лікування дітей з ГЗЗ шкіри у хірургічному відділенні лікарні, звідки забирали матеріал для дослідження.

4.2 Здатність ізолятів *P. mirabilis*, *E. coli* та *S. aureus* утворювати біоплівки за дії світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів і цефепіму

Встановлено, що після опромінення дослідних штамів червоним спектром світлодіодного випромінювання їх оптична щільність збільшувалася а саме: у 1,4 разів - *P. mirabilis* ($0,89 \pm 0,04$ од.ощ.), у 1,4 рази - *E. coli* ($0,94 \pm 0,04$ од.ощ.) та у 1,5 рази - *S. aureus* ($0,86 \pm 0,04$ од.ощ.), порівняно з контролем без світлодіодного опромінення ($0,62 \pm 0,04$ од.ощ., $0,68 \pm 0,04$ од.ощ. та $0,59 \pm 0,05$ од.ощ., відповідно) (рис.4.4), що можна пояснити активацією метаболічних процесів в бактеріальних клітинах.

При комплексній дії червоного світлодіодного випромінювання та цефепіму знижується щільність бактеріальної культури: у 2,5 рази - *E. coli* ($0,26 \pm 0,02$ од.ощ.) порівняно з контролем з цефепімом без СДВ ($0,66 \pm 0,04$ од.ощ.), у 2,8 рази - *P. mirabilis* ($0,22 \pm 0,02$ од.ощ.) порівняно з контролем ($0,61 \pm 0,04$ од.ощ.) та у 1,7 рази - *S. aureus* ($0,34 \pm 0,03$ од.ощ.) порівняно з контролем ($0,57 \pm 0,05$ од.ощ.), що можна пояснити тим, що червоне світлодіодне випромінювання сприяє прискоренню експоненціального росту клітин, а бактерицидний ефект цефалоспоринів, зокрема цефепіму, реалізується тільки у процесі росту й розмноження бактерій [24, 58].

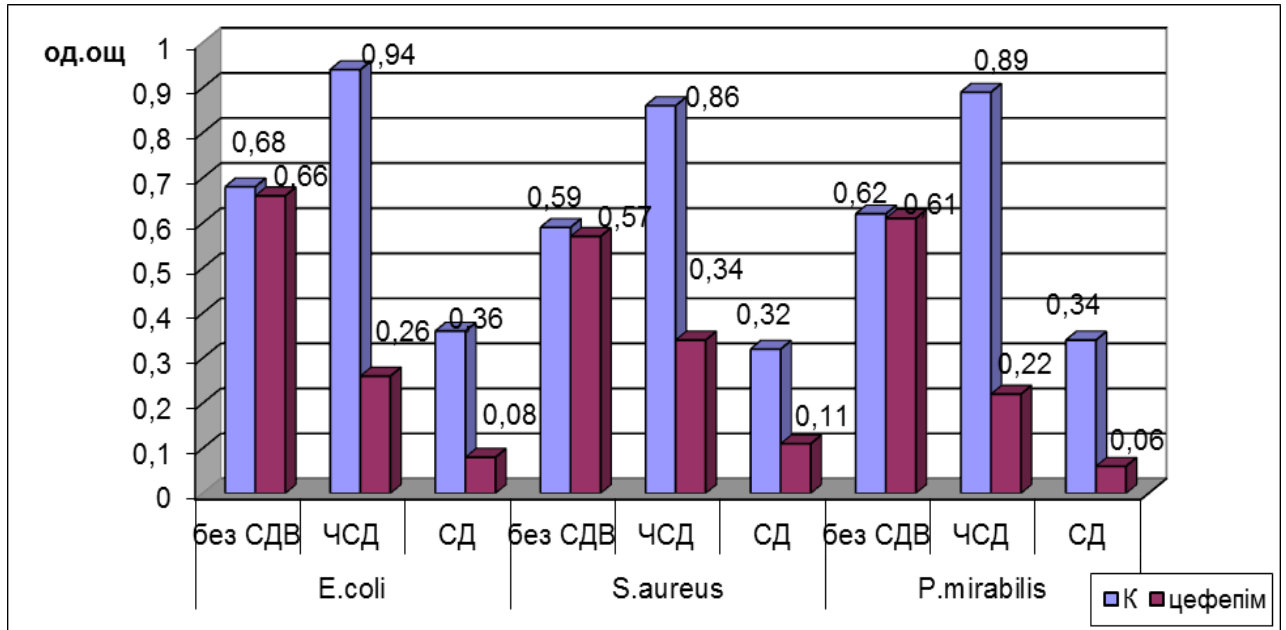


Рис. 4.4 Вплив світлодіодного випромінювання на ріст суспензійних культур ізолятів *P. mirabilis*, *E. coli* та *S. aureus* (СДВ – світлодіодне випромінювання; ЧСД – червоний світлодіод; СД – синій світлодіод; К – контроль без антибактеріального препарату)

За дії синього спектра світлодіодного випромінювання та цефепіму спостерігається пригнічення росту бактерій майже у 3,5 рази порівняно з дією червоного світлодіодного випромінювання та цефепіму. Щільність суспензійної культури знижується у 8,3 рази - *E. coli* ($0,08 \pm 0,006$ од.ощ.) порівняно з контролем з цефепімом без СДВ ($0,66 \pm 0,04$ од.ощ.), у 10,2 рази - *P. mirabilis* ($0,06 \pm 0,005$ од.ощ.) порівняно з контролем ($0,61 \pm 0,04$ од.ощ.) та у 5,2 рази - *S. aureus* ($0,11 \pm 0,01$ од.ощ.) порівняно з контролем ($0,57 \pm 0,05$ од.ощ.), що можна пояснити синергізмом, який проявляється на тлі послаблення бар'єрної функції клітинних мембран, що викликано впливом на них атомарних форм кисню за дії світлодіодного випромінювання синього спектра [2, 85] з одного боку та з другого – безпосередньої дії цефепіму на клітинну стінку бактерій, що й викликає біоінгібіцію.

При вивченні здатності ізолятів до формування біоплівки (рис. 4.5) за дії червоного світлодіодного випромінювання та цефепіму встановлено

зниження їх щільності: у ізолятів *P. mirabilis* у 4,3 рази ($0,58 \pm 0,03$ од.ощ.); у ізолятів *E. coli* та у ізолятів *S. aureus* – у 1,9 рази ($0,79 \pm 0,05$ од.ощ. та $1,22 \pm 0,03$ од.ощ., відповідно) порівняно з контрольними значеннями за дії тільки цефепіму без світлодіодного випромінювання ($2,47 \pm 0,02$ од.ощ., $1,48 \pm 0,04$ од.ощ. та $2,26 \pm 0,04$ од.ощ., відповідно).

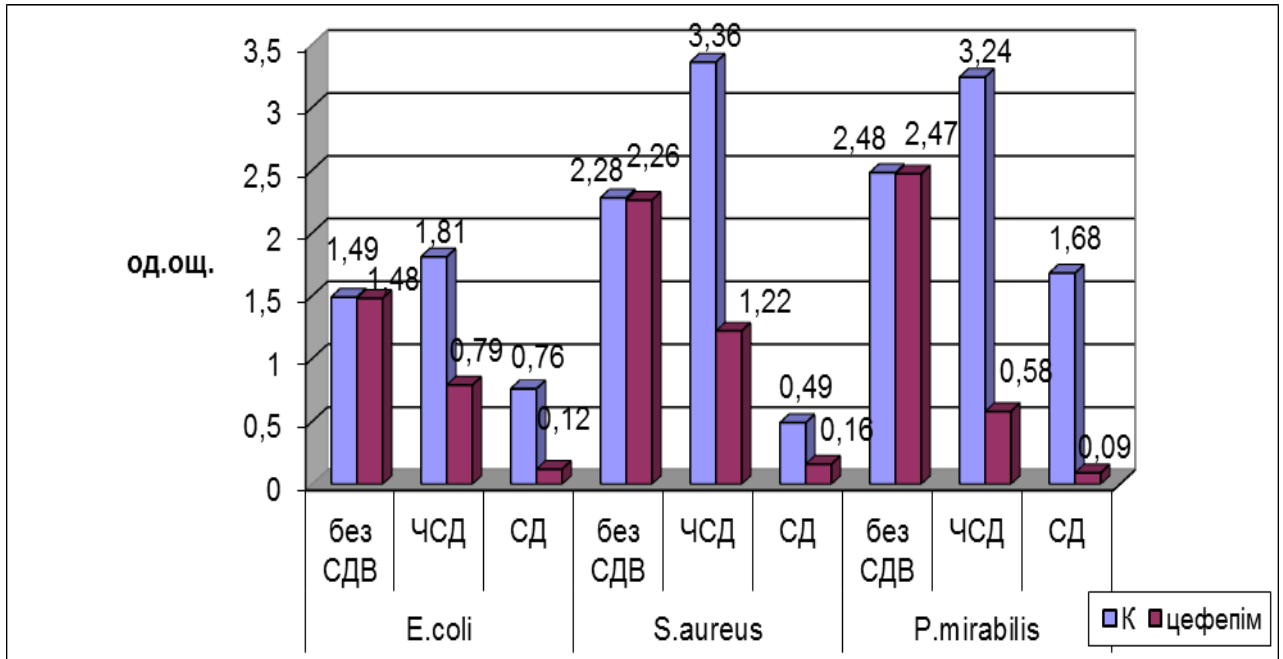


Рис. 4.5 Оптична щільність первинних біоплівки за впливу світлодіодного випромінювання та цефепіму на суспензійну культуру (СДВ – світлодіодне випромінювання; ЧСД – червоний світлодіод; СД – синій світлодіод; К – контроль без антибактеріального препарату)

Більшою мірою відбувається зниження оптичної щільності первинних біоплівки за дії синього світлодіодного випромінювання комплексно з цефепімом: у ізолятів *P. mirabilis* у 27,4 рази ($0,09 \pm 0,006$ од.ощ.), у ізолятів *E. coli* – у 12,3 рази ($0,12 \pm 0,01$ од.ощ.), у ізолятів *S. aureus* – у 14,1 рази ($0,16 \pm 0,01$ од.ощ.), порівняно з контрольними значеннями за дії тільки цефепіму без світлодіодного випромінювання, що є важливим фактом для обґрунтування застосування світлодіодного випромінювання для підвищення антимікробної активності антибіотиків.

При вивченні здатності первинних біоплівок (рис. 4.6) утворювати нові бактеріальні клітини встановлено, що за дії червоного світлодіодного випромінювання та цефепіму відбувається пригнічення їх щільності: для *P.mirabilis* – у 4,8 рази ($0,38 \pm 0,02$ од.ощ.) порівняно з контрольними значеннями – цефепім без світлодіодного випромінювання ($1,81 \pm 0,05$ од.ощ.), *E. coli* – у 1,8 рази ($0,46 \pm 0,04$ од.ощ.) порівняно з контролем ($0,83 \pm 0,03$ од.ощ.), *S. aureus* – у 1,4 рази ($0,68 \pm 0,02$ од.ощ.) порівняно з контролем ($0,94 \pm 0,04$ од.ощ.) а за дії синього комплексно з цефепімом: *P.mirabilis* – у 45,3 рази ($0,04 \pm 0,002$ од.ощ.), *E. coli* – у 5,9 разів ($0,14 \pm 0,01$ од.ощ.) та *S. aureus* – у 15,7 разів ($0,06 \pm 0,006$ од.ощ.) порівняно з контролем.

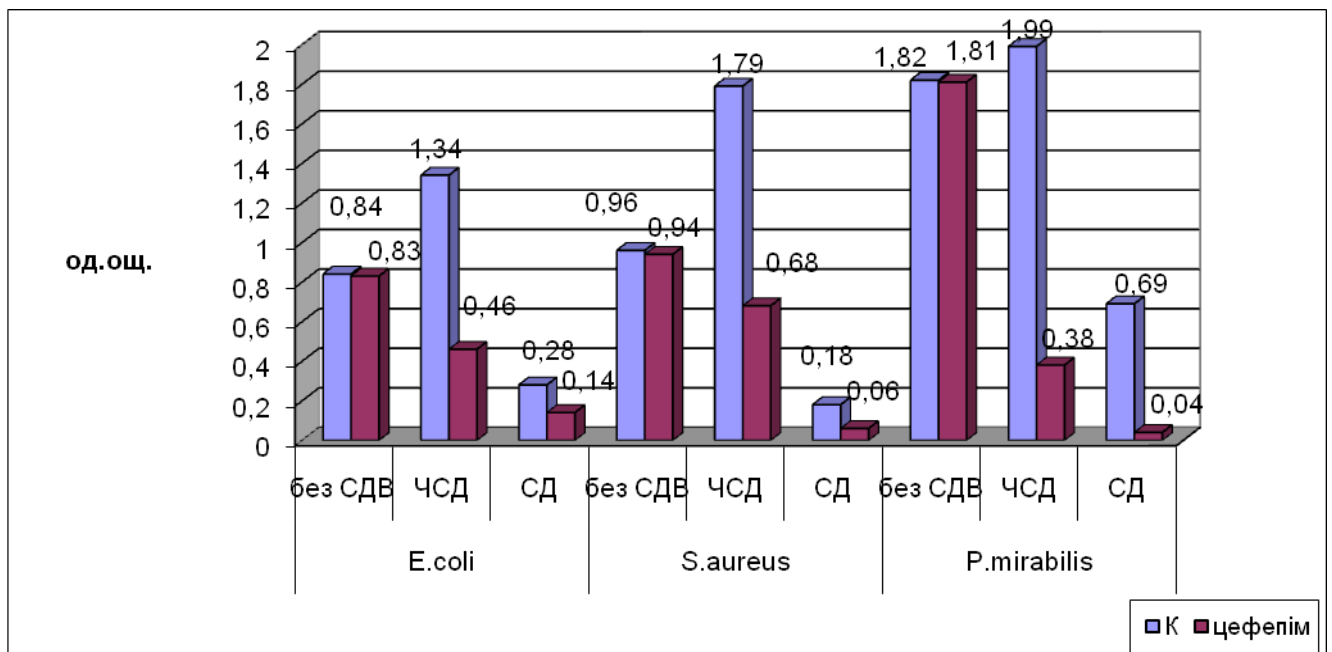


Рис. 4.6 Оптична щільність планктонних клітин, що були утворені первинними біоплівками за впливу світлодіодного випромінювання та цефепіму на суспензійну культуру (СДВ – світлодіодне випромінювання; ЧСД – червоний світлодіод; СД – синій світлодіод; К – контроль без антибактеріального препарату)

При вивченні здатності планктонних клітин, що були утворені після дії світлодіодного випромінювання та цефепіму на суспензійну культуру ізолятів, формувати вторинні біоплівки (рис. 4.7) було встановлено для

P.mirabilis, що за дії червоного світлодіодного випромінювання та цефепіму оптична щільність вторинних біоплівок була знижена у 9,8 разів ($0,37 \pm 0,02$ од.ощ.) порівняно з контрольними значеннями за дії тільки цефепіму без світлодіодного випромінювання ($3,61 \pm 0,06$ од.ощ.), а за дії синього випромінювання комплексно з цефепімом – у 120,3 ($0,03 \pm 0,003$ од.ощ.) рази порівняно з контролем.

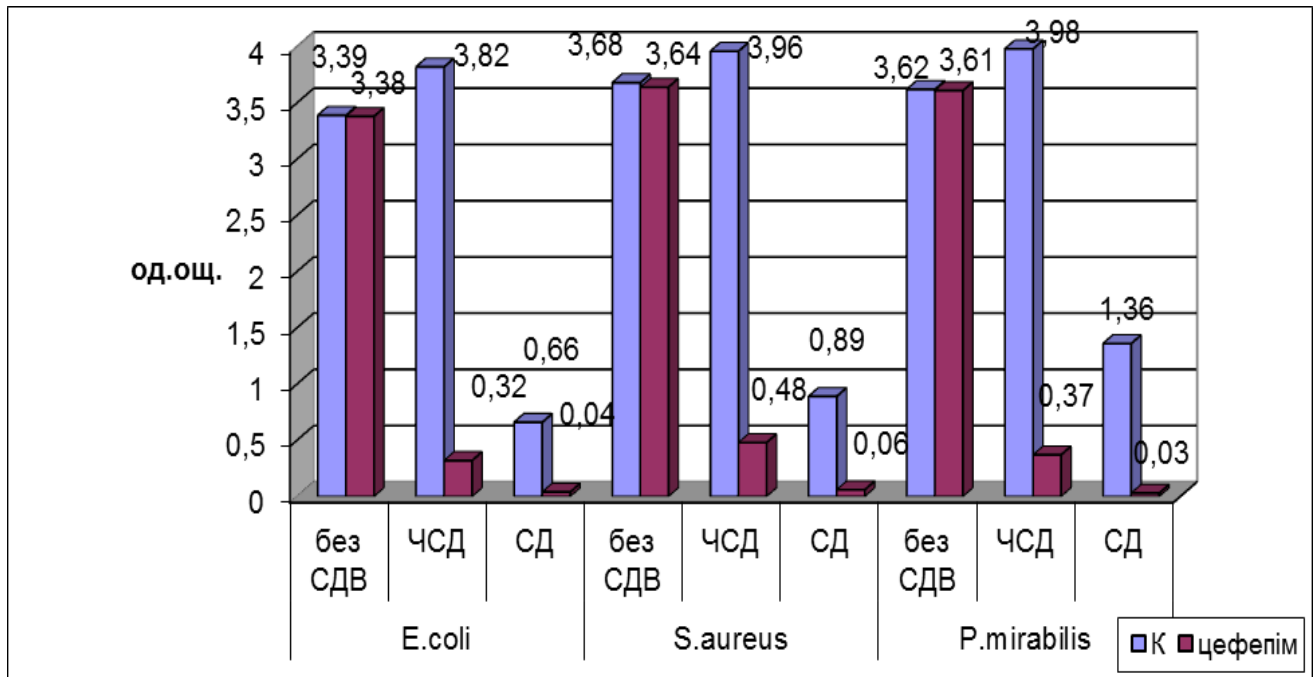


Рис. 4.7 Здатність планктонних клітин до формування вторинних біоплівок за впливу світлодіодного випромінювання та цефепіму на суспензійну культуру (СДВ – світлодіодне випромінювання; ЧСД – червоний світлодіод; СД – синій світлодіод; К – контроль без антибактеріального препарату)

Аналогічні дані були отримані для *E. coli* та *S. aureus*: показники оптичної щільності вторинних біоплівок знижувались: за дії синього світлодіодного випромінювання та цефепіму - у 84,5 рази ($0,04 \pm 0,002$ од.ощ.) для *E. coli* та у 60,6 разів ($0,06 \pm 0,003$ од.ощ.) для *S. aureus*, а за дії червоного випромінювання комплексно з цефепімом – у 10,6 разів для *E. coli* ($0,32 \pm 0,02$ од.ощ.) та у 7,6 рази для *S. aureus* ($0,48 \pm 0,04$ од.ощ.) порівняно з

контрольними значеннями ($3,38 \pm 0,06$ од.ощ. та $3,64 \pm 0,05$ од.ощ. відповідно) за дії тільки цефепіму без світлодіодного випромінювання.

Таким чином, оптимальною для пригнічення утворення біоплівок досліджених ізолятів є світлодіодне випромінювання синього спектра. Форма існування мікроорганізму - планктонна й біоплівка одного і того ж ізоляту відрізняються одна від одної за рівнем стійкості до антибактеріальних препаратів. Комплексне застосування світлодіодного випромінювання та цефалоспоринового препарату пригнічує формування біоплівок мікроорганізмів.

4.3 Комбінована дія оптичного випромінювання синього й червоного спектрів та антисептичних препаратів на здатність до формування біоплівок ізолятами *P. mirabilis*, *E. coli* та *S. aureus*

Встановлено, що при застосуванні оптичного випромінювання червоного спектра разом з антимікробним препаратом хлоргексидином (ХГ) відбувалось пригнічення утворення планктонних клітин *Proteus mirabilis* у 3,2 рази ($0,104 \pm 0,008$ од.ощ.) та з антисептичним препаратом пероксиду водню (ПВ) у 5 рази ($0,066 \pm 0,006$ од.ощ.), порівняно з контролем (суспензійна культура без опромінення та антисептика) ($0,328 \pm 0,004$ од.ощ.), та у 1,4 і 2,1 рази відповідно, порівняно з контролем (суспензійна культура без опромінення з антисептиком) ($0,149 \pm 0,004$ од.ощ. та $0,137 \pm 0,004$ од.ощ., відповідно). При комплексному застосуванні світлодіодного випромінювання синього спектра та ХГ встановлено пригнічення суспензійної культури *Proteus mirabilis* у 5,9 рази ($0,056 \pm 0,005$ од.ощ.), а при застосуванні ПВ – у 4,8 рази ($0,068 \pm 0,006$ од.ощ.), порівняно з контролем без опромінення та антисептика, й у 2,7 і 2 рази відповідно, порівняно з контролем без опромінення з антисептиком (рис. 4.8; рис. 4.9).

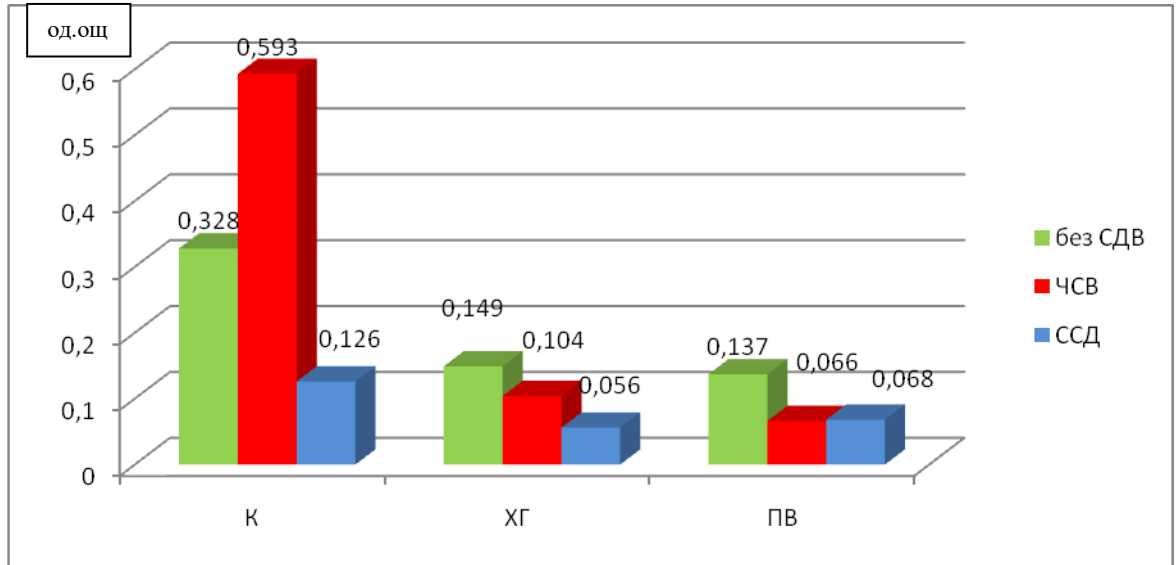


Рис. 4.8 Вплив антисептичних препаратів (ХГ та ПВ) й оптичного випромінювання синього та червоного спектрів на суспензійну культуру ізолятів *Proteus mirabilis*. (К - контроль без антисептичних препаратів)

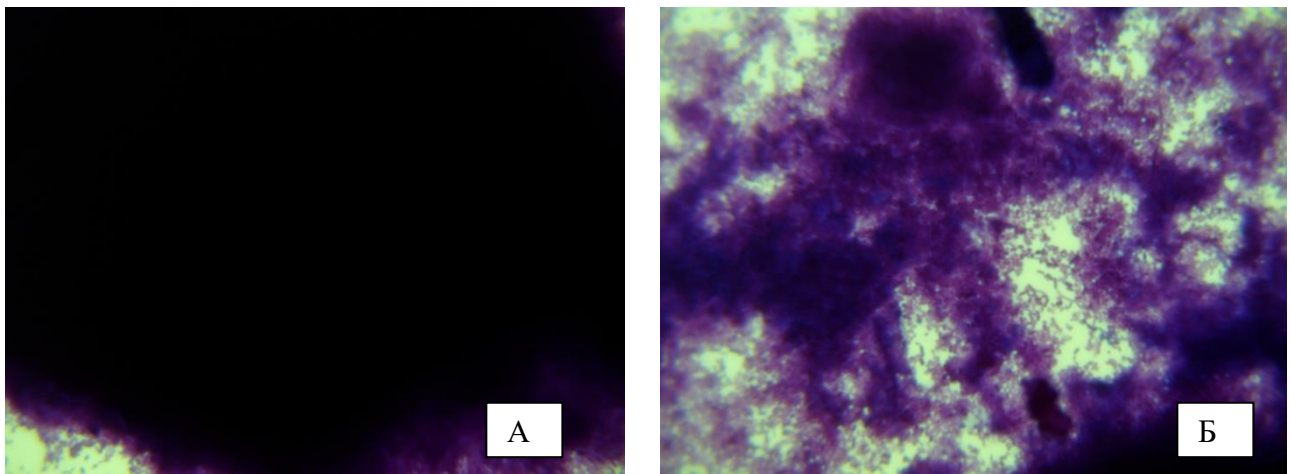


Рис. 4.9 Формування біоплівки ізолятами *Proteus mirabilis* без дії протимікробних препаратів (А) та за дії ХГ (Б) на суспензійну культуру

Аналізуючи результати щодо здатності формування біоплівки планктонними клітинами після комплексної дії оптичного випромінювання та антимікробних препаратів на суспензійні культури ізолятів *Proteus mirabilis* встановлено, що за дії світлодіодного випромінювання синього спектра значно посилюється чутливість ізолятів до ХГ, що запобігає утворенню щільних біоплівки ізолятами: здатність до формування біоплівки

знижується у 10,4 рази ($0,238 \pm 0,006$ од.ощ.), порівняно з контрольними значеннями без впливу оптичного випромінювання та ХГ ($2,481 \pm 0,009$ од.ощ.), й у 7,3 рази, порівняно з контролем без СДВ з ХГ ($1,736 \pm 0,005$ од.ощ.). А при комплексному застосуванні із антисептичним препаратом ПВ – пригнічення формування біоплівки – у 9,2 рази ($0,271 \pm 0,005$ од.ощ.), порівняно з контрольними значеннями без впливу оптичного випромінювання та антисептика, й у 5,6 разів, порівняно з контролем без опромінення з антисептиком ($1,531 \pm 0,006$ од.ощ.). За дії ЧСВ та ХГ здатність до формування біоплівки знижується у 2,6 рази ($0,961 \pm 0,006$ од.ощ.) та за дії ЧСВ та ПВ – у 9,5 разів ($0,262 \pm 0,004$ од.ощ.), порівняно з контролем без СДВ та антисептика, й у 1,8 та 5,8 разів відповідно, порівняно з контролем без опромінення з антисептиками ($1,736 \pm 0,005$ од.ощ. та $1,531 \pm 0,006$ од.ощ.), відповідно (рис. 4.10).

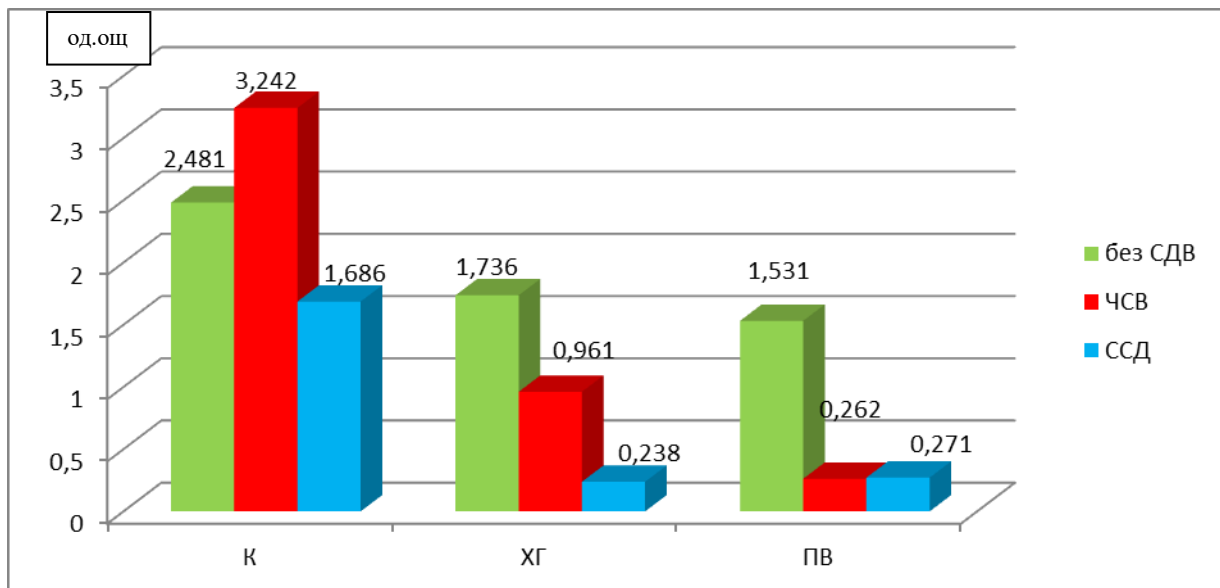


Рис. 4.10 Формування біоплівки ізолятами *Proteus mirabilis* за дії дослідних препаратів й оптичного випромінювання на суспензійну культуру полірезистентних штамів

При визначені здатності добових біоплівки *Proteus mirabilis*, які утворилися після дії антисептичних препаратів і світлодіодного випромінювання на бактеріальні культури ізолятів, утворювати планктонні

клітини встановлено, що під впливом світлодіодного випромінювання червоного спектра (рис. 4.11) спостерігається пригнічення утворення планктонних клітин у комплексі з ХГ - у 29,3 рази ($0,062 \pm 0,003$ од.ощ.), у комбінації з ПВ пригнічення утворення планктонних клітин спостерігається у 64,9 рази ($0,028 \pm 0,002$ од.ощ.), порівняно з контролем без опромінення та антисептика ($1,816 \pm 0,01$ од.ощ.), та у 1,7 й 3,7 разів відповідно, порівняно з контролем без опромінення з антисептиками ($0,108 \pm 0,005$ од.ощ. та $0,103 \pm 0,005$ од.ощ, відповідно). Це можна пояснити специфікою механізму дії: у клітинах під впливом ферментів, таких як пероксидаза й каталаза, пероксид водню розкладається з виділенням атомарного кисню, який проявляє антимікробні властивості. За дії червоного спектра світлодіодного випромінювання відбувається активація ферментативної активності мікроорганізмів [63], зокрема пероксидазної та каталазної, тож відбувається активне виділення кисню з подальшим запобіганням утворення нових мікробних клітин.

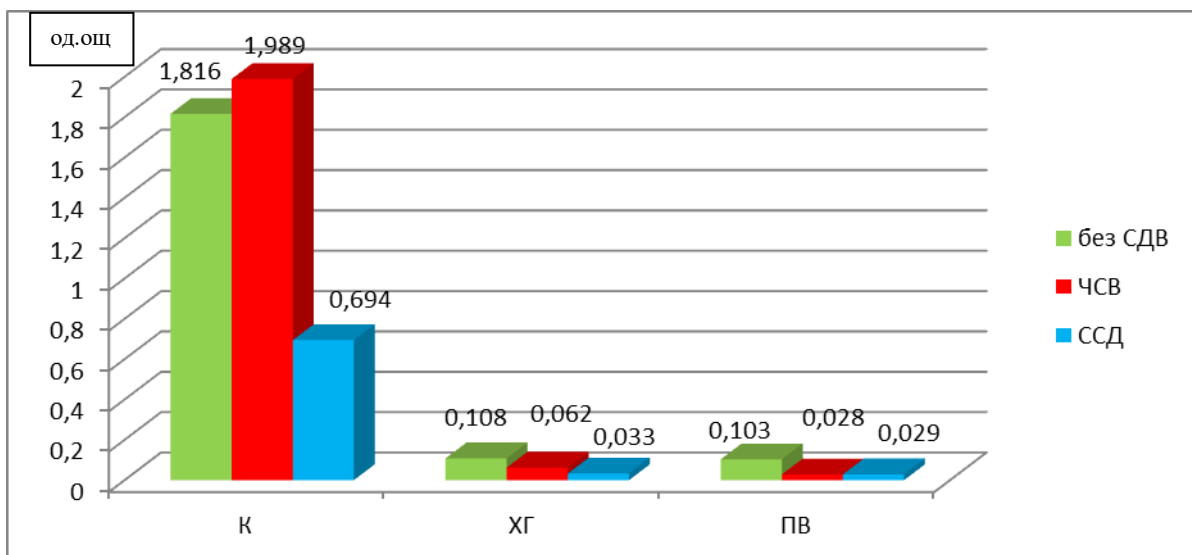


Рис. 4.11 Здатність до утворення планктонних клітин первинними біоплівками клінічних штамів *Proteus mirabilis* за дії антисептичних препаратів і світлодіодного випромінювання червоного та синього спектрів на бактеріальну суспензію

При аналізі результатів, які були отримані після визначення здатності планктонних клітин *Proteus mirabilis* формувати нові біоплівки за впливу світлодіодного випромінювання і протимікробних препаратів було встановлено пригнічення здатності до формування нових біоплівок планктонними клітинами клінічних штамів *Proteus mirabilis*: у 21,4 рази при застосуванні ЧСВ і ХГ ($0,169 \pm 0,008$ од.ощ.) та у 43 рази - при застосуванні ЧСВ і ПВ ($0,084 \pm 0,002$ од.ощ.), порівняно з контролем без опромінення та антисептика ($3,615 \pm 0,05$ од.ощ.), й у 2,3 та 3,1 рази відповідно, порівняно з контролем без опромінення з антисептиком ($0,387 \pm 0,003$ од.ощ. та $0,262 \pm 0,002$ од.ощ., відповідно). За дії синього спектра світлодіодного випромінювання та ХГ спостерігається пригнічення формування вторинних біоплівок у 57,4 рази ($0,063 \pm 0,002$ од.ощ.), а у комплексному застосуванні з ПВ – у 36,5 рази ($0,099 \pm 0,003$ од.ощ.), порівняно з контролем без опромінення й антисептика, та у 6,1 й 2,6 разів відповідно, порівняно з контролем без опромінення з антисептиком (рис. 4.12).

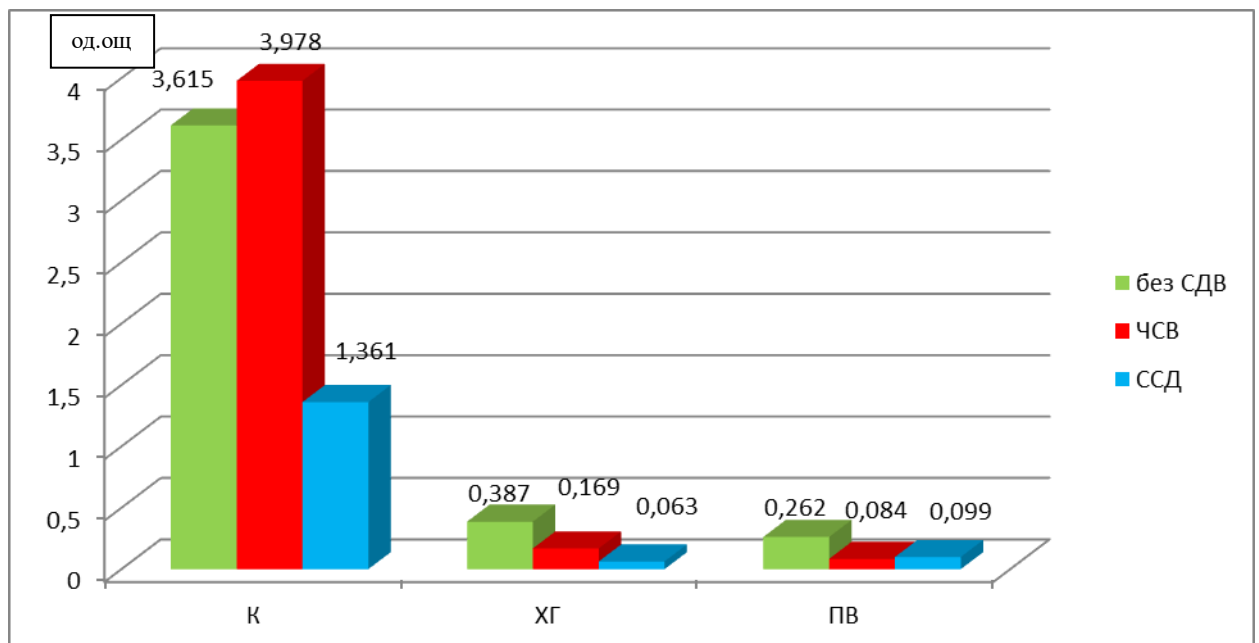


Рис. 4.12 Щільність вторинних біоплівок клінічних штамів *Proteus mirabilis*, що сформовані планктонними клітинами за дії антисептичних препаратів і світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів на суспензійну культуру

Аналогічні результати зафіксовано й для ізолятів *E. coli*: при застосуванні світлодіодного випромінювання червоного спектра разом з антисептичним препаратом ХГ встановлено пригнічення утворення планктонних клітин *E. coli* у 6,7 рази ($0,101 \pm 0,003$ од.ощ.), а при застосуванні ЧСВ та ПВ – у 11,9 разів ($0,057 \pm 0,004$ од.ощ.), порівняно з контролем без опромінення та антисептика, та у 1,4 й 2,2 рази відповідно, порівняно з контролем без опромінення з антисептиком ХГ ($0,139 \pm 0,005$ од.ощ.) та ПВ ($0,124 \pm 0,005$ од.ощ.). При комплексному застосуванні світлодіодного випромінювання синього спектра й ХГ встановлено пригнічення суспензійної культури *E. coli* у 14,2 рази ($0,048 \pm 0,004$ од.ощ.), а при застосуванні ПВ – у 11,2 рази ($0,061 \pm 0,004$ од.ощ.) порівняно з контролем без опромінення та антисептика, та у 2,9 й 2 рази відповідно, порівняно з контролем без опромінення з антисептиком (рис. 4.13).

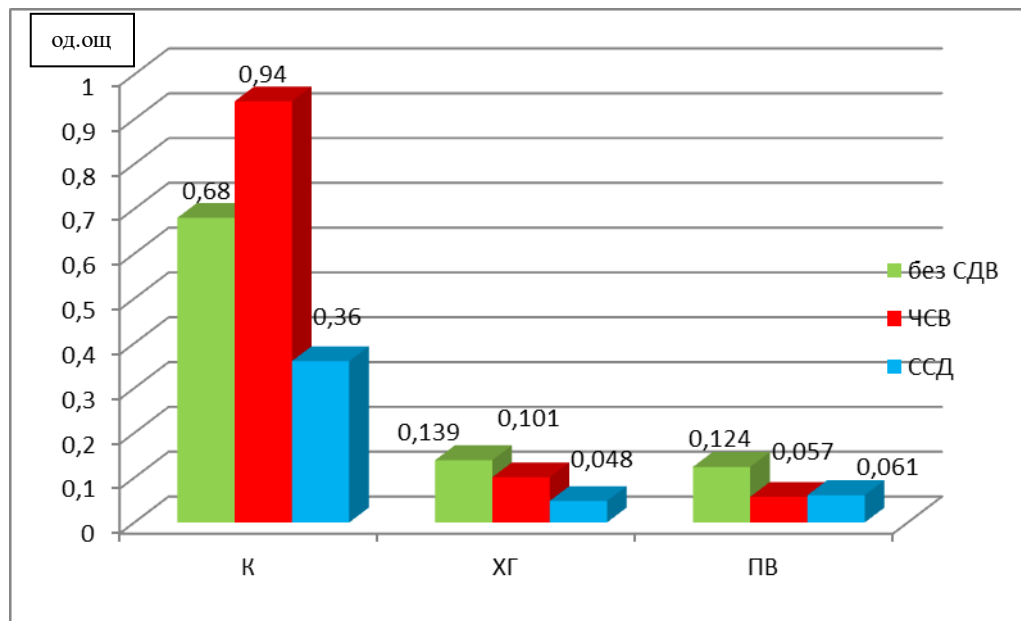


Рис. 4.13 Дія антисептичних препаратів й оптичного випромінювання синього та червоного спектрів на суспензійну культуру ізолятів *E. coli*.

Аналізуючи результати щодо здатності формування біоплівки планктонними клітинами після комплексної дії оптичного випромінювання

та антисептичних препаратів встановлено, що за впливу ССВ разом з ХГ здатність до формування біоплівок знижується у 6,4 рази ($0,234 \pm 0,008$ од.ощ.), а за впливу ЧСВ та ХГ – у 1,6 ($0,946 \pm 0,01$ од.ощ.), порівняно з контрольними значеннями без опромінення та ХГ ($1,49 \pm 0,06$ од.ощ.), та у 4,8 й 1,2 рази відповідно, порівняно з контролем без опромінення з ХГ ($1,124 \pm 0,04$ од.ощ.). За впливу ССВ та ПВ здатність до формування біоплівок знижується у 5,6 разів ($0,266 \pm 0,01$ од.ощ.), а за впливу ЧСВ та ПВ – у 5,8 разів ($0,259 \pm 0,01$ од.ощ.), порівняно з контролем без опромінення та антисептика, та у 4 й 3,9 рази відповідно, порівняно з контролем без опромінення з антисептиком (рис. 4.14).

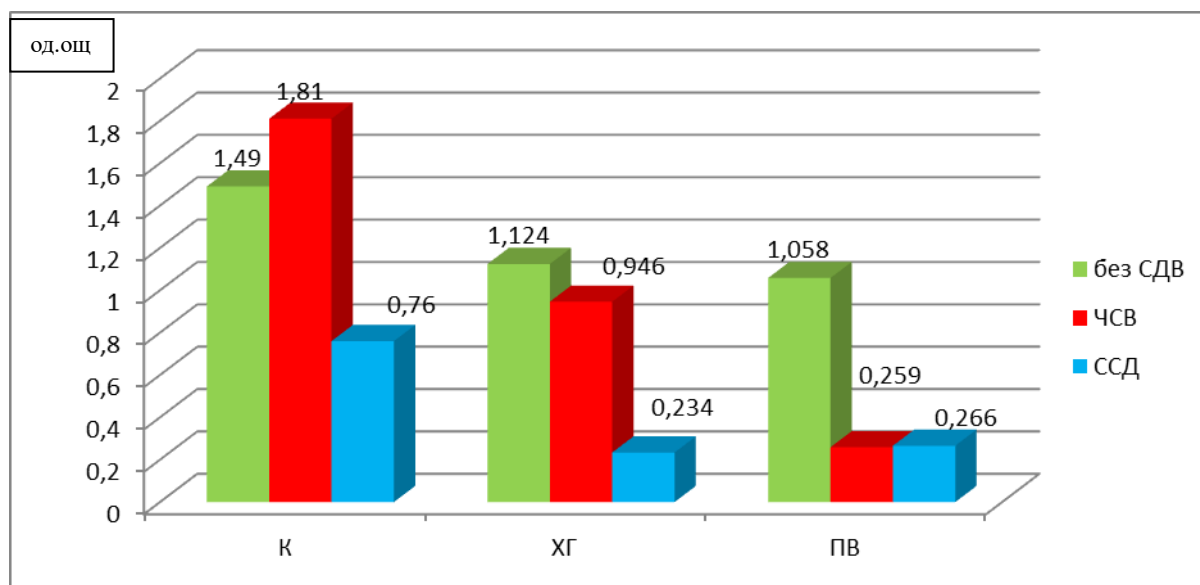


Рис. 4.14 Здатність до формування біоплівок ізолятами *E. coli* за дії дослідних препаратів й оптичного випромінювання на суспензійну культуру

При визначенні здатності добових біоплівок *E. coli*, які утворилися після дії антисептичних препаратів і світлодіодного випромінювання на бактеріальні культури ізолятів, утворювати планктонні клітини встановлено, що під впливом світлодіодного випромінювання червоного спектра (рис. 4.15) спостерігається пригнічення утворення планктонних клітин у комплексі з ХГ - у 15,8 разів ($0,053 \pm 0,003$ од.ощ.), у комбінації з ПВ пригнічення

утворення планктонних клітин спостерігається у 70 разів ($0,012 \pm 0,001$ од.ощ.) порівняно з контролем без опромінення та антисептиків ($0,84 \pm 0,03$ од.ощ.). Порівняно з контролем без опромінення з антисептиком ХГ ($0,102 \pm 0,007$ од.ощ.) та ПВ ($0,094 \pm 0,004$ од.ощ.) відбувається пригнічення утворення планктонних клітин у 1,9 та 7,8 разів відповідно. За дії ССВ та ХГ відбувається пригнічення утворення планктонних клітин у 40 разів ($0,021 \pm 0,002$ од.ощ.), та у 19,5 разів ($0,043 \pm 0,002$ од.ощ.) за дії ССВ та ПВ, порівняно з контролем без опромінення та антисептика. Утворення планктонних клітин знижується у 4,9 й 2,2 рази відповідно, порівняно з контролем без опромінення з антисептиком.

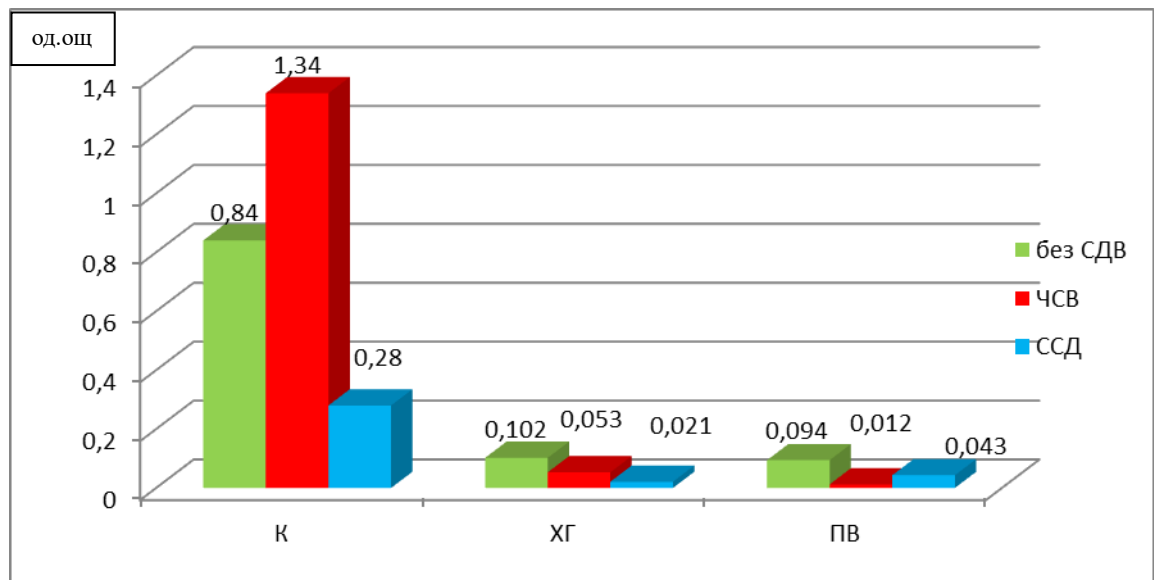


Рис. 4.15 Здатність до утворення планктонних клітин біоплівками клінічних штамів *E. coli*, за дії антисептичних препаратів і світлодіодного випромінювання червоного та синього спектрів на бактеріальну суспензію

Оцінюючи результати, які були отримані після визначення здатності планктонних клітин *E. coli* формувати нові біоплівки за впливу світлодіодного випромінювання і антисептичних препаратів було встановлено пригнічення здатності до формування нових біоплівок планктонними клітинами клінічних штамів *E. coli* (рис. 4.16) у 21,3 рази

($0,159 \pm 0,006$ од.ощ.) при застосуванні ЧСВ й ХГ та у 47,8 рази ($0,071 \pm 0,003$ од.ощ.) - при застосуванні ЧСВ й ПВ, порівняно з контролем без опромінення та антисептиків ($3,39 \pm 0,1$ од.ощ.) (рис.4.17). Порівняно з контролем без опромінення з антисептиком ХГ ($0,354 \pm 0,003$ од.ощ.) та ПВ ($0,246 \pm 0,002$ од.ощ.) – у 2,2 та 3,5 разів відповідно. За дії ССВ й ХГ спостерігається пригнічення формування вторинних біоплівки у 55,6 рази ($0,061 \pm 0,004$ од.ощ.), а у комплексному застосуванні з ПВ – у 36,1 рази ($0,094 \pm 0,003$ од.ощ.), порівняно з контролем без опромінення та антисептиків. Та у 5,8 й 2,6 рази, відповідно, порівняно з контролем без опромінення з антисептиком.

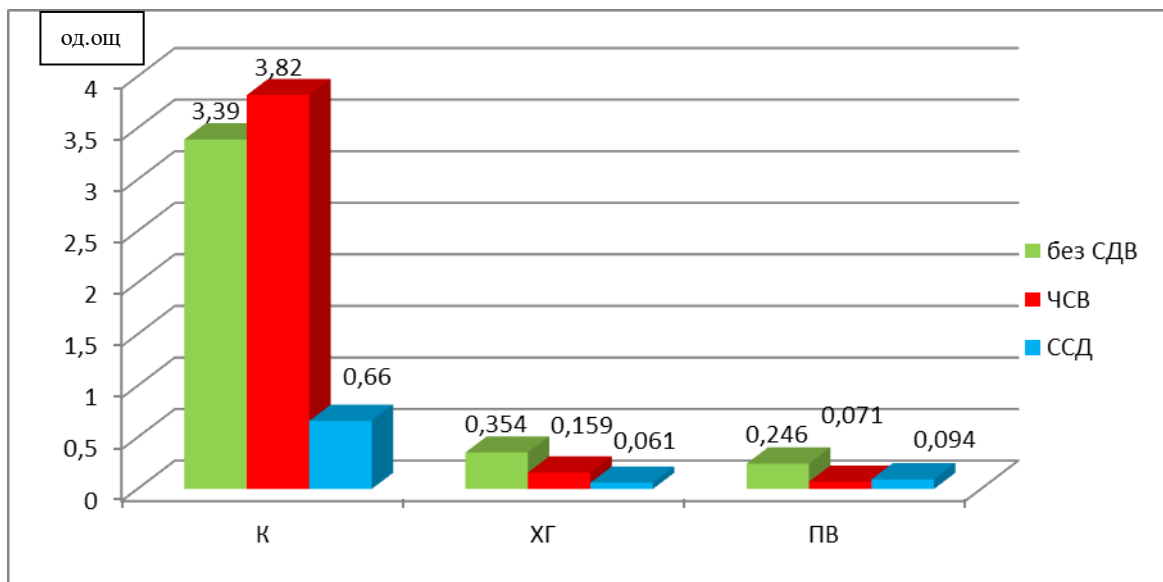


Рис. 4.16 Здатність до формування вторинних біоплівки клінічних штамів *E.coli* планктонними клітинами за дії антисептичних препаратів і світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів на суспензійну культуру

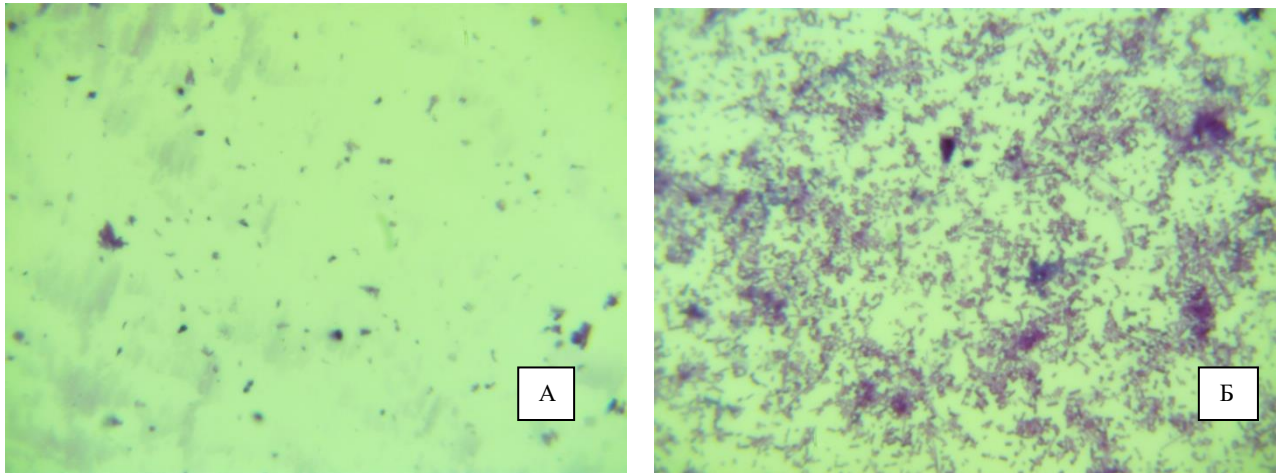


Рис. 4.17 Формування вторинних біоплівок клінічних штамів *E.coli* планктонними клітинами за дії світлодіодного випромінювання червоного спектра та пероксиду водню і (А) та хлоргексидину (Б) на суспензійну культуру

Для ізолятів *S. aureus* при застосуванні оптичного ЧСВ разом з ХГ встановлено пригнічення утворення планктонних клітин *S. aureus* у 7,2 рази ($0,082 \pm 0,004$ од.ощ.) та з ПВ у 6 разів ($0,098 \pm 0,003$ од.ощ.), а при комплексному застосуванні ССВ й ХГ встановлено пригнічення суспензійної культури *S. aureus* у 17,4 рази ($0,034 \pm 0,003$ од.ощ.), а при застосуванні ПВ – у 7,8 рази ($0,076 \pm 0,003$ од.ощ.) порівняно з контролем без опромінення та антисептиків ($0,59 \pm 0,04$ од.ощ.). Порівнюючи результати з контролем без опромінення з антисептиком ХГ ($0,102 \pm 0,01$ од.ощ.) встановлено пригнічення утворення планктонних клітин *S. aureus* у 1,2 рази та з ПВ ($0,118 \pm 0,005$ од.ощ.) у 1,6 разів, а при комплексному застосуванні ССВ і ХГ встановлено пригнічення суспензійної культури *S. aureus* у 3 рази, а при застосуванні ССВ і ПВ – у 1,6 рази (рис. 4.18).

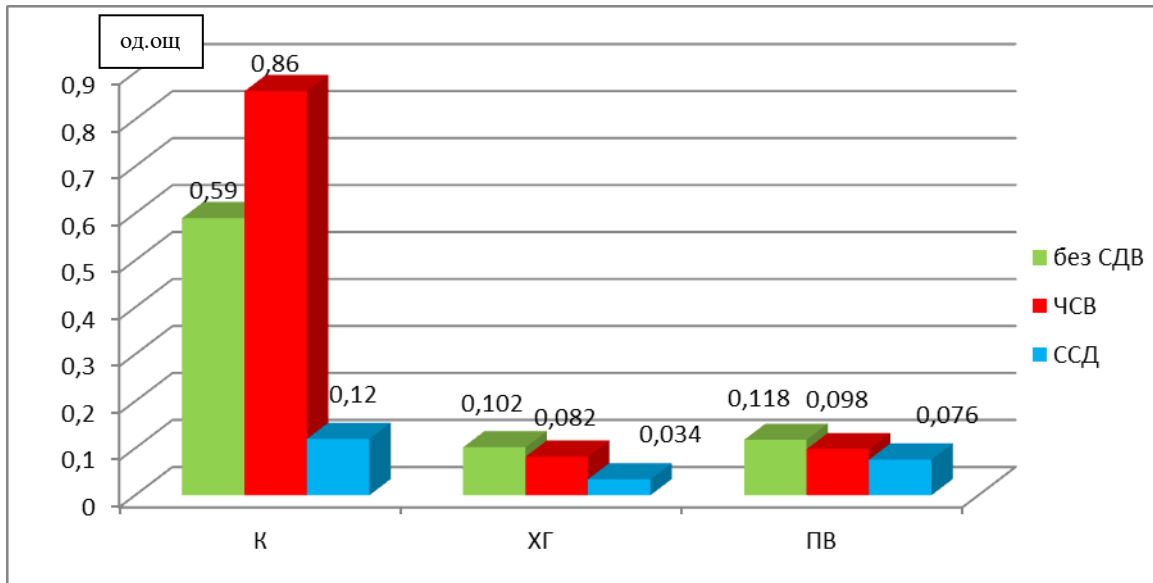


Рис. 4.18 Дія антисептичних препаратів й оптичного випромінювання синього та червоного спектрів на суспензійну культуру ізолятів *S. aureus*

Здатність до формування біоплівки планктонними клітинами *S. aureus* порівняно з контрольними значеннями без впливу оптичного випромінювання та антисептика ($2,28 \pm 0,05$ од.ощ.) знижується у майже 18 разів ($0,127 \pm 0,04$ од.ощ.) за дії ССВ із ХГ, та у 9,3 рази ($0,246 \pm 0,004$ од.ощ.) за дії ССВ із ПВ, а при комплексному застосуванні ЧСВ із ХГ відбувається пригнічення формування біоплівки у 9,7 разів ($0,236 \pm 0,006$ од.ощ.) та ЧСВ із ПВ – у 10,9 рази ($0,209 \pm 0,007$ од.ощ.). Порівнюючи результати з контролем без опромінення з антисептиком ХГ ($1,041 \pm 0,01$ од.ощ.) та ПВ ($1,067 \pm 0,02$ од.ощ.), встановлено зниження оптичної щільності біоплівки *S. aureus*: за дії ССВ та ХГ – у 8,2 рази, за дії ССВ та ПВ – у 4,3 рази, за дії ЧСВ та ХГ – у 4,4 рази та за дії ЧСВ та ПВ – у 5,1 рази. (рис. 4.19).

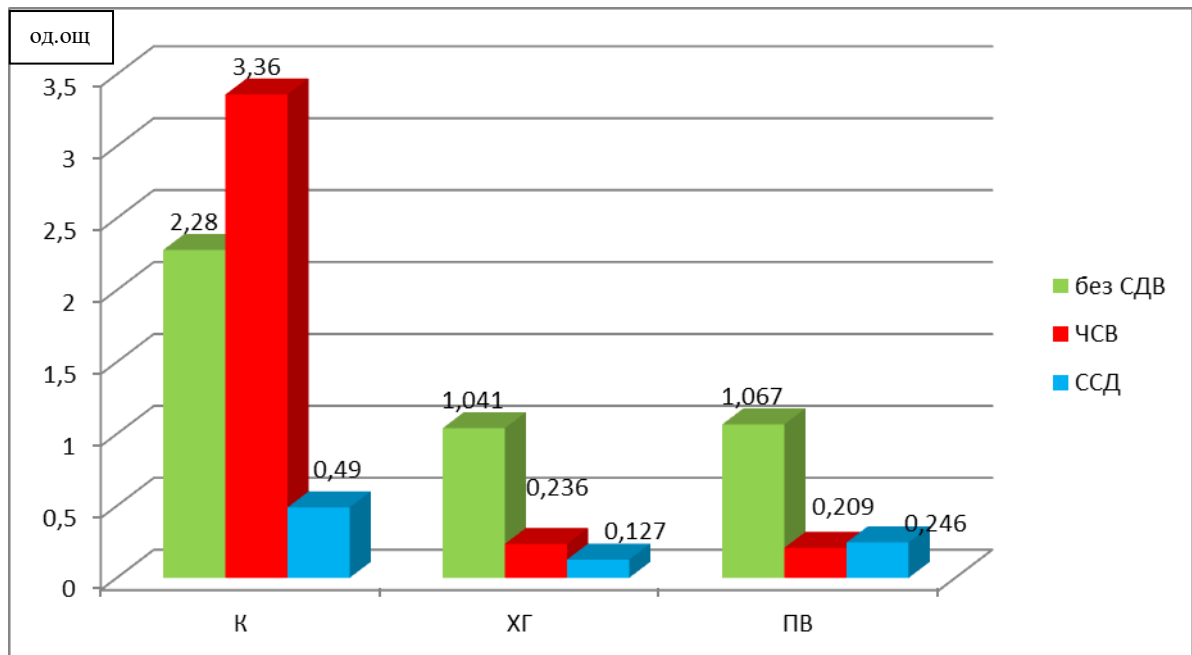


Рис. 4.19 Здатність до формування біоплівки ізолятами *S. aureus* за дії дослідних препаратів й оптичного випромінювання на суспензійну культуру полірезистентних штамів

При визначені здатності добових біоплівок *S. aureus* утворювати планктонні клітини встановлено, що за впливу ЧСВ спостерігається пригнічення утворення планктонних клітин у комплексі з ХГ - у 31 раз ($0,031 \pm 0,002$ од.ощ.) , у комбінації з ПВ - у 40 разів ($0,024 \pm 0,002$ од.ощ.). За впливу ССВ та ПВ пригнічення утворення планктонних клітин відбувається у 17,1 раз, найкращий результат виявлено при комплексному застосуванні ССВ з ХГ – пригнічення у 53,3 рази ($0,018 \pm 0,001$ од.ощ.), порівняно з контролем без опромінення та антисептика ($0,86 \pm 0,07$ од.ощ.). Порівнюючи результати з контролем без опромінення з антисептиком ХГ ($0,092 \pm 0,008$ од.ощ.) та ПВ ($0,114 \pm 0,005$ од.ощ.), встановлено пригнічення утворення планктонних клітин : за дії ЧСВ з ХГ – у 3 рази, за дії ЧСВ з ПВ – у 4,8 рази, за дії ССВ та ХГ – у 5,1 разів та за дії ССВ та ПВ – у 2 рази (рис. 4.20).

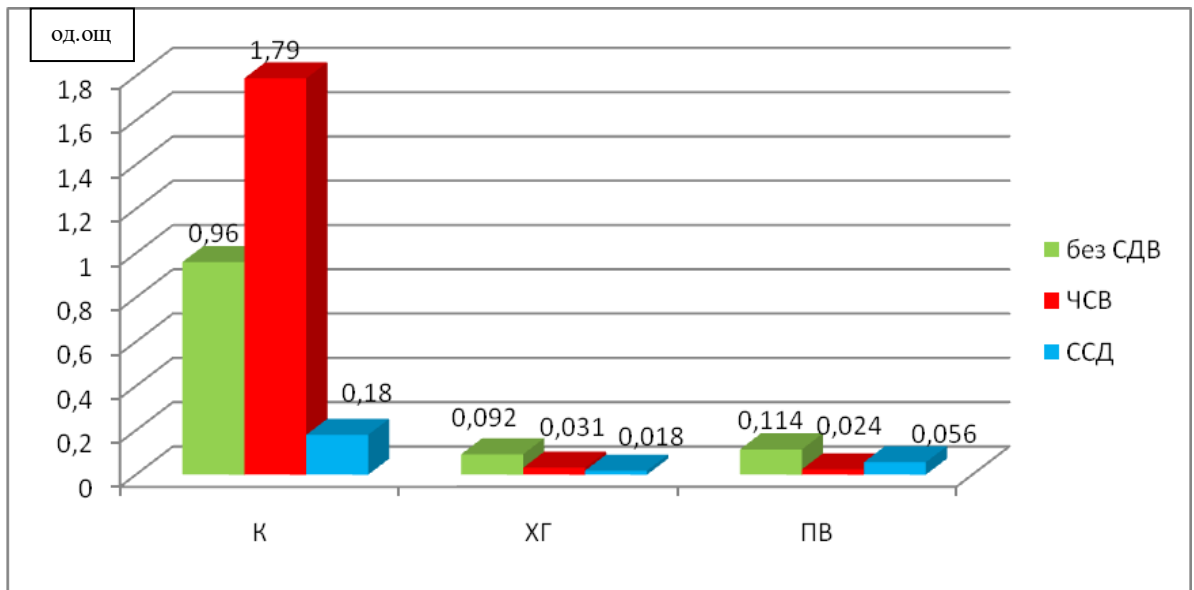


Рис. 4.20 Здатність до утворення планктонних клітин біоплівками клінічних штамів *S. aureus* за дії антисептичних препаратів і світлодіодного випромінювання червоного та синього спектрів на бактеріальну суспензію

Аналогічні дані виявлено при вивченні здатності планктонних клітин *S. aureus* формувати нові біоплівки. Встановлено пригнічення у 28,5 рази ($0,129 \pm 0,006$ од.ощ.) при застосуванні ЧСВ й ХГ та у 37,9 рази ($0,097 \pm 0,005$ од.ощ.) – за дії ЧСВ й ПВ, за дії ССВ з ПВ – у 33,8 рази ($0,109 \pm 0,04$ од.ощ.), а з ХГ – у 141,5 рази ($0,026 \pm 0,002$ од.ощ.), порівняно з контролем без опромінення та антисептика ($3,68 \pm 0,05$ од.ощ.). Порівнюючи результати з контролем без опромінення з антисептиком ХГ ($0,234 \pm 0,004$ од.ощ.) та ПВ ($0,368 \pm 0,009$ од.ощ.), встановлено пригнічення утворення вторинних біоплівок : за дії ЧСВ з ХГ – у 1,8 рази, за дії ЧСВ з ПВ – у 3,8 рази, за дії ССВ та ХГ – у 9 разів та за дії ССВ та ПВ – у 3,4 рази (рис. 4.21).

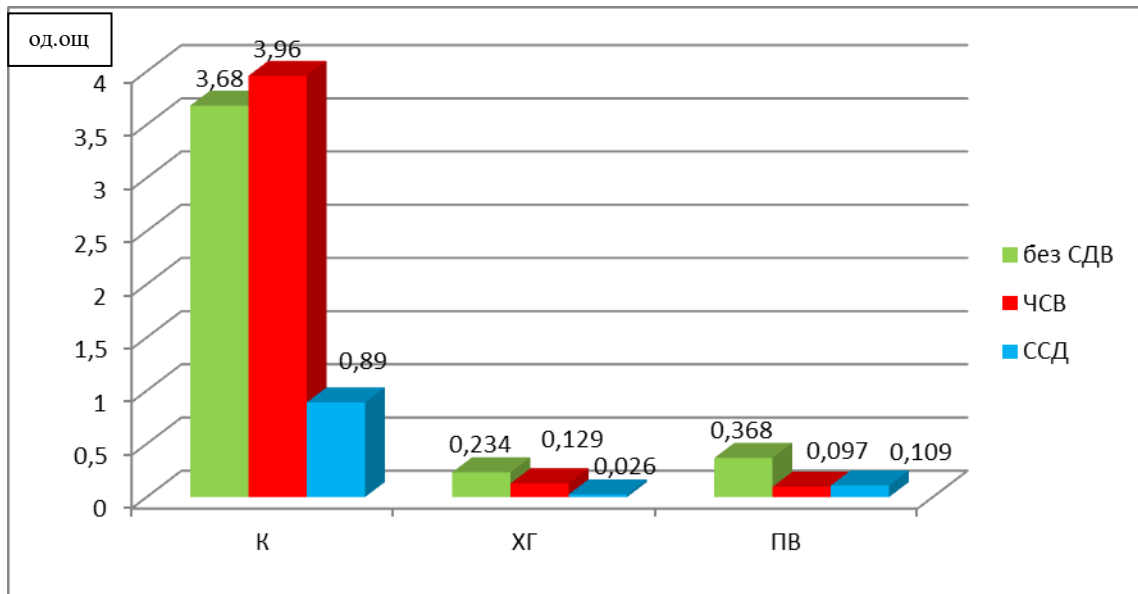


Рис. 4.21 Здатність до формування вторинних біоплівки клінічних штамів *S. aureus*, що сформовані планктонними клітинами за дії антисептичних препаратів і світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів на суспензійну культуру

Висновки до розділу 4:

1. Встановлено, що найвищу антимікробну активність проявляють комбінації пероксиду водню й світлодіодного випромінювання червоного спектра, а також хлоргексидину й світлодіодного випромінювання синього спектра. Використання цих комбінацій призводить до пригнічення утворення планктонних клітин від 1,2 до 3 разів та формування ними біоплівки від 4,1 до 8,2 разів порівняно з використанням лише вказаних антисептиків.
2. Обґрунтовано можливість застосування у комплексній терапії гнійно-запальних процесів оптичного випромінювання синього та червоного спектрів з антисептичними препаратами, що сприяє пригніченню здатності до формування, як первинних, так й вторинних біоплівки бактеріями, що попереджає дисемінацію збудника в організмі.

3. Встановлено, що за впливу світлодіодного випромінювання як червоного так і синього спектра посилюється антимікробний ефект цефепіму.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях: [32, 35, 36, 136].

РОЗДІЛ 5

ЕФЕКТИВНІСТЬ КОМБІНОВАНОЇ ДІЇ ПРОТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА СВІТЛОДІОДНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ СИНЬОГО ТА ЧЕРВОНОГО СПЕКТРІВ В ДОСЛІДАХ *IN VIVO*

Метою цього розділу досліджень було вивчення ефективності антибактеріальної світлотерапії в комплексному лікуванні локалізованої гнійної патології в експерименті *in vivo*.

5.1 Ефективність синього та червоного світлодіодного випромінювання й цефепіму при локалізованій гнійно-запальній інфекції

Ефективність комбінованої терапії із застосуванням синього й червоного світлодіодів при локалізованій гнійно-запальній протейній інфекції оцінювали за ступенем загоювання вогнища запалення. На підставі розробленого на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д.П. Гриньова ХНМУ [86] способу моделювання локалізованої гнійно-некротичної протейної інфекції було проведено експериментальне дослідження на 64 мишах інбредних ліній BALB/cJLacSto (8 груп по 8 мишей у кожній; розподіл лабораторних тварин на групи було проведено з урахуванням результатів дослідження *in vitro*: доцільним було застосування антисептика хлоргексидину при дії світлодіодного випромінювання синього спектра та антисептику пероксиду водню при дії світлодіодного випромінюванні червоного спектра на осередок запалення). Моделювання локалізованої гнійно-некротичної інфекції проводили шляхом внутрішньошкіряного введення інфікуючої дози лабораторного штаму *P.mirabilis* (ГІСК 160208=SS F403) 300 млн мікробних клітин в об'ємі 0,1 мл фізіологічного розчину. Через 24 години у групах тварин, що були інфіковані, зафіксовано запальну реакцію у вигляді припухлості шкіри з інфільтратом в діаметрі 3 мм. В інфільтрат, що утворився вводили 150 млн

мікробних клітин в 0,1 мл фізіологічного розчину. Для лікування застосовували цефепім, який вводили 0,1 мл внутрішньом'язово 5, 6, 7 та 8 групі тварин. Опромінення зони некрозу лабораторних тварин проводили протягом 5 хвилин спеціально розробленими апаратами на базі надяскравих світлодіодів, що випромінюють у червоному ($\lambda=627$ нм) та синьому ($\lambda=470$ нм) діапазонах спектра.

Загоювання гнійно-запального осередку при використанні тільки цефепіма (5 група) було зафіксовано на 12 добу. Комплексне застосування світлодіодного випромінювання з цефепімом виявило тенденцію до більш швидкого загоювання осередку запалення: цефепім з червоним спектром світлодіодного випромінювання (7 група) – у 1,3 рази; цефепім з синім спектром світлодіодного випромінювання (6 група) – у 2 рази; цефепім з червоним та синім спектрами випромінювання (8 група) – у 2,4 рази (рис. 5.1)

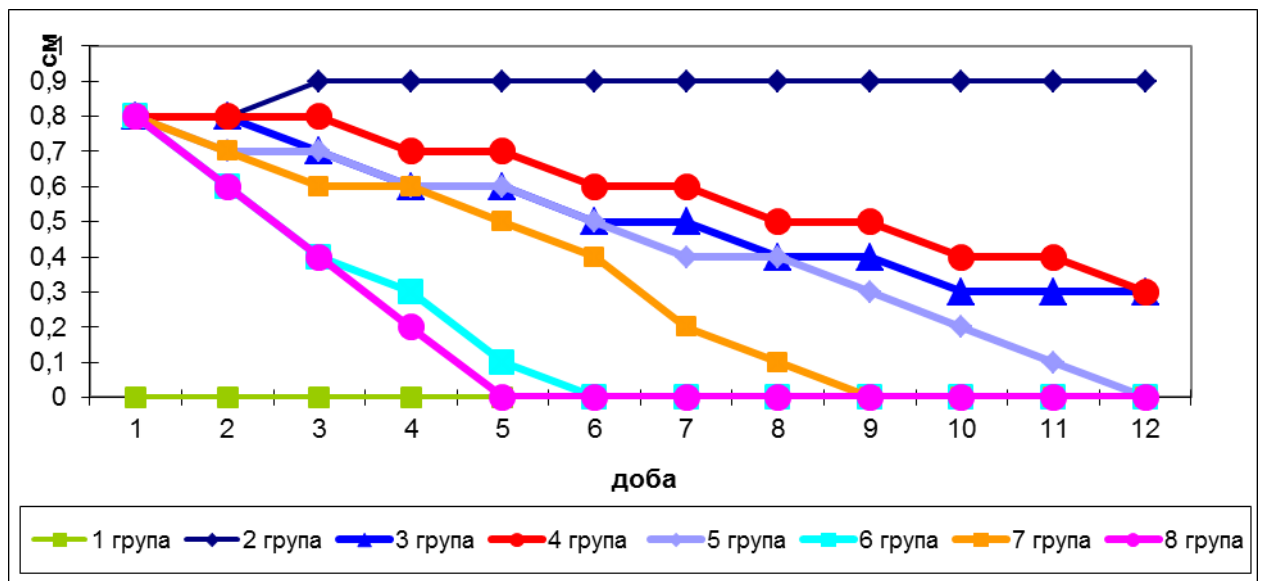


Рис. 5.1 Динаміка загоєння вогнища гнійно-запальної протейної інфекції у дослідних тварин за умов використання різних підходів до лікування

Реєструючи динаміку загоєння гнійно-запальної інфекції з проявом некрозу в експерименті, можна зробити висновок про те, що найбільш оптимальною та раціональною, з точки зору швидкості загоєння вогнища

запалення і витрат на лікування, є застосування одночасно з цефепімом синього й червоного світлодіодного випромінювання протягом 5 хвилин на осередок ураження (8 група).

5.2 Вплив світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів на імуноцитокіновий стан та активність фагоцитарного процесу з утворенням нейтрофільних позаклітинних пасток при локалізованій гнійно-запальній інфекції

Серед множинних факторів імунного захисту провідну роль в елімінації збудників ГЗЗ відіграє Т-клітинна ланка імунітету, а основними молекулами, що координують дію імунних клітин, виступають цитокіни, які й визначають ефективність імунної відповіді та перебіг запального процесу в організмі. Цитокіни здатні модулювати регуляторні й ефекторні функції клітин. У здоровому організмі існує баланс між цитокінами з прозапальною й протизапальною активністю. Встановлено, що у відповідь на інфекцію в тканинах відбувається локальна продукція цитокінів, що викликають обмежену запальну реакцію і сприяють ліквідації ушкоджень. Нормально функціонуюча імунна система перешкоджає безконтрольному виділенню медіаторів запалення і забезпечує адекватну реакцію макроорганізму на інвазію мікроорганізму. Відомо, що захисна роль прозапальних цитокінів проявляється тоді, коли ці медіатори працюють локально, у вогнищі запалення, однак їх системна продукція не означає високої ефективності протиінфекційного імунітету. Всупереч цьому, надлишкова та генералізована продукція прозапальних цитокінів призводить до розвитку органних дисфункцій [57]. Тому дана частина роботи присвячена комплексному вивченню особливостей імунного та цитокінового стану під впливом дії світлодіодного випромінювання синього й червоного спектрів та комплексного застосування із хіміотерапевтичними препаратами при гнійно-запальних захворюваннях.

Оцінка функціонування фагоцитарної ланки імунітету є важливою та, навіть, необхідною для аналізу імунної відповіді при ГЗЗ. Тож, початковим дослідженням щодо стану клітинного імунітету при локалізованій протейній інфекції та після впливу фізико-біологічних факторів, було визначення фагоцитарної активності нейтрофілів.

Інтегральні показники фагоцитозу (табл. 5.1) у тварин з локалізованою протейною інфекцією (2 група – позитивний контроль) дорівнюють: фагоцитарне число (ФЧ) – $1,5 \pm 0,2$ та фагоцитарний індекс (ФІ) – $41,4 \pm 2,3$ % були нижче контрольних значень ($3,8 \pm 0,2$ й $80,1 \pm 1,3$ % відповідно).

У групі інфікованих тварин, яким було проведено лікування цефепімом (5 група) ФІ був нижчий ніж показник з групи інтактних тварин (1 група) у 1,5 рази, та групи тварин, яким осередок запалення опромінювали червоним спектром світлодіодного випромінювання (4 група) у 1,3 рази. У порівнянні з групою інфікованих тварин (2 група) та групою тварин, яким осередок запалення опромінювали синім спектром світлодіодного випромінювання (3 група) – показник ФІ був підвищений у 1,3 та 1,2 рази відповідно. Показник ФЧ був знижений порівняно з контрольною групою інтактних тварин, але в порівнянні з 2, 3 та 4 групою був дещо підвищений.

Аналізуючи динаміку цих показників під впливом світлодіодного випромінювання синього спектра *per se* (3 група), встановлено, що інтегральні показники фагоцитозу достовірно не відрізнялися від групи тварин з локалізованою протейною інфекцією без лікування.

За впливу червоного спектра світлодіодного випромінювання показник ФІ мав тенденцію до підвищення в порівнянні з показником контрольної групи інфікованих тварин, але не досягав значень показника ФІ інтактних тварин. При визначенні комплексного впливу цефепіму та червоного випромінювання (7 група), та цефепіму, червоного та синього спектрів (8 група) на вогнище запалення було встановлено, що показники ФІ дорівнювали таким групи інтактних тварин.

Таблиця 5.1

**Стан фагоцитозу при застосуванні світлодіодного випромінювання
синього й червоного спектрів і цефепіму**

Групи тварин		Показник	
		Фагоцитарний індекс (ФІ), %	Фагоцитарне число (ФЧ), од.
контр	1 група (інтактні)	80,1±1,3	3,8±0,2
	2 група (інфіковані)	41,4±1,4	1,5±0,2
дослідні групи	3 група (синій спектр)	43,8±1,3*	1,8±0,1*
	4 група (червоний спектр)	68,3±0,7* [#]	2,0±0,2*
	5 група (цефепім)	53,6±2,6* [#]	2,3±0,1*
	6 група (цефепім+синій)	66,3±1,5* [#]	6,5±0,4* [#]
	7 група (цефепім+червоний)	80,8±1,9 [#]	6,2±0,6* [#]
	8 група (цефепім+синій+червоний)	81,8±2,1 [#]	5,9±0,4* [#]

Примітка: * $p < 0,001$ – порівняно з інтактними тваринами;

[#] $p < 0,001$ - порівняно з інфікованими тваринами.

При вивченні функціональної активності нейтрофілів встановлено, що нейтрофіли за впливу світлодіоду червоного спектра активно фагоцитують частинки латексу, причому в групі тварин з комплексною терапією ця функція проявляється сильніше, ніж в групі тварин за дії тільки опромінення.

При визначенні кількості антигенів в нейтрофілі та в NETs [29] *in vivo* було встановлено, що у інтактних тварин (1 група) інтенсивність фагоцитозу складала 3,8±0,2 од., формування NETs не було зафіксовано. У групі тварин з локалізованою протейною інфекцією без лікування (2 група) виявлено зниження інтенсивності фагоцитарного процесу з різким підвищенням вмісту антигенів в NETs (Рис.5.2).

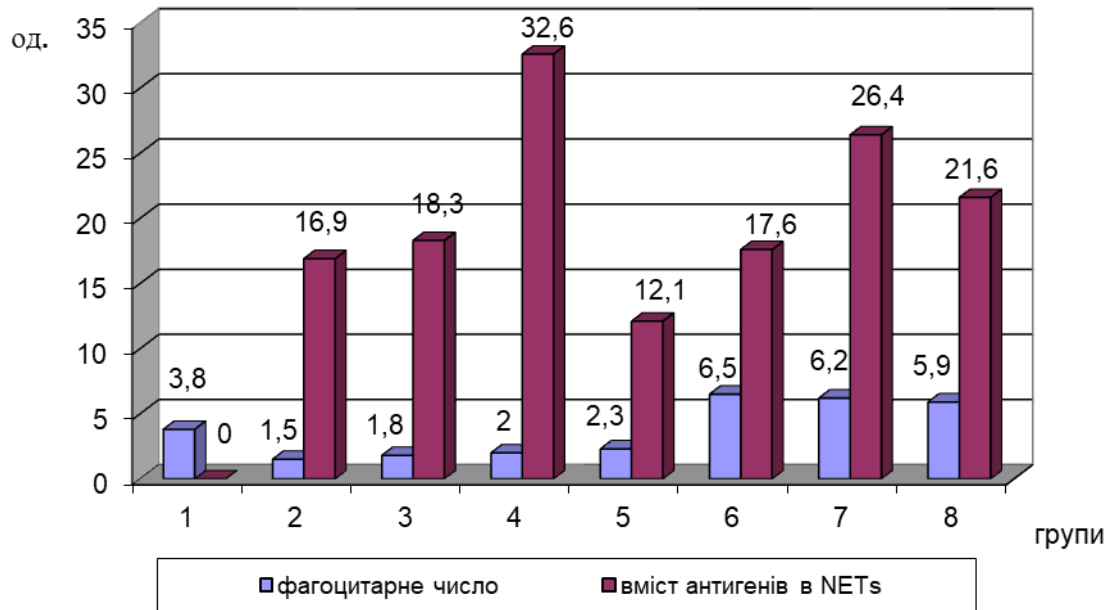


Рис. 5.2 Кількість антигенів в нейтрофілі та в NETs (од.) *in vivo* 1 - інтактні миші (негативний контроль); 2 - інфіковані миші без лікування (позитивний контроль); 3 група – інфіковані тварини з опроміненням осередку запалення синім світлодіодом; 4 група – інфіковані тварини з опроміненням осередку запалення червоним світлодіодом; 5 група - інфіковані миші та проведення терапії цефепімом; 6 - інфіковані миші та проведення терапії цефепімом з опроміненням інфільтрату, синім світлодіодом; 7 - інфіковані миші та проведення терапії цефепімом з опроміненням інфільтрату червоним світлодіодом, 8 - інфіковані миші та проведення терапії цефепімом з опроміненням інфільтрату синім і червоним світлодіодом

У групі інфікованих тварин, осередок запалення яких був опромінений синім спектром світлодіодного випромінювання (3 група) встановлено, що показник інтенсивності фагоцитозу та кількості антигенів в NETs майже не відрізнялися від аналогічних групи інфікованих тварин (2 група). У групі інфікованих тварин, осередок запалення яких був опромінений червоним спектром світлодіодного випромінювання (4 група) встановлено, що показник інтенсивності фагоцитозу мав тенденцію до підвищення, а вміст

антигенів в NETs підвищилась майже у 2 рази порівняно з групою інфікованих тварин. Аналізуючи інтенсивність фагоцитарного процесу та кількість антигенів в NETs у інфікованих тварин за впливу тільки антибактеріального препарату цефепім (5 група) встановлено, що показник ФЧ був підвищений у 1,5 рази, а кількість антигенів в NETs знижено у 1,4 рази порівняно з контрольною групою інфікованих тварин.

За впливу світлодіодного випромінювання синього спектра комплексно з протимікробним препаратом цефепімом у групі інфікованих тварин (6 група) встановлено, що показник інтенсивності фагоцитозу був підвищений у 4,3 рази, а вміст антигенів в NETs – достовірно не відрізнявся від аналогічного групи контролю інфікованих тварин. У групі інфікованих тварин, лікування яких проводилося цефепімом, а осередок запалення яких був опромінений червоним спектром світлодіодного випромінювання (7 група) встановлено, що показник інтенсивності фагоцитозу був підвищений у 4,1 рази, а кількість антигенів в NETs – підвищено у 1,6 рази, що свідчить про активацію фагоцитарної ланки імунного захисту.

У групі інфікованих тварин лікування яких проводилося цефепімом, а осередок запалення яких був опромінений синім та червоним спектрами світлодіодного випромінювання у комбінації (8 група) встановлено, що показник інтенсивності фагоцитозу був підвищений у 3,9 рази порівняно з групою контролю інфікованих тварин (2 група) та у 1,5 рази порівняно з групою контролю інтактних тварин (1 група), кількість антигенів в NETs – у 1,3 рази порівняно з групою інфікованих тварин, що є самим оптимальним співвідношенням інтенсивності фагоцитарного процесу з подальшим утворенням NETs.

В результаті вивчення загального стану імунітету організму піддослідних груп тварин встановлено, що в групі інфікованих тварин (2 група) характерно достовірне зниження кількості лейкоцитів й лімфоцитів у периферичній крові. Субпопуляційний аналіз лімфоцитів показав, що

лімфопенія супроводжувалась вираженим зниженням вмісту окремих субпопуляцій цих клітин. Так, було достовірно знижено кількість всіх вивчених субпопуляцій Т-лімфоцитів з маркерами диференціації CD3⁺, CD4⁺, CD11⁺, CD18⁺. Співвідношення CD4⁺/CD8⁺ також було достовірно нижче, ніж у інтактних тварин.

Отже, проведені імунологічні дослідження дозволили встановити, порівняно з групою контролю (інтактні тварини), наступні показники: змінюються параметри клітинного імунітету (рис. 5.3): статистично значимими зміни відмічаються за кількістю CD3⁺ – 33,8±1,0%; CD4⁺ – 15,2±1,2%; CD11⁺ – 16,7±0,8% й CD18⁺ – 12,8±0,4 %.

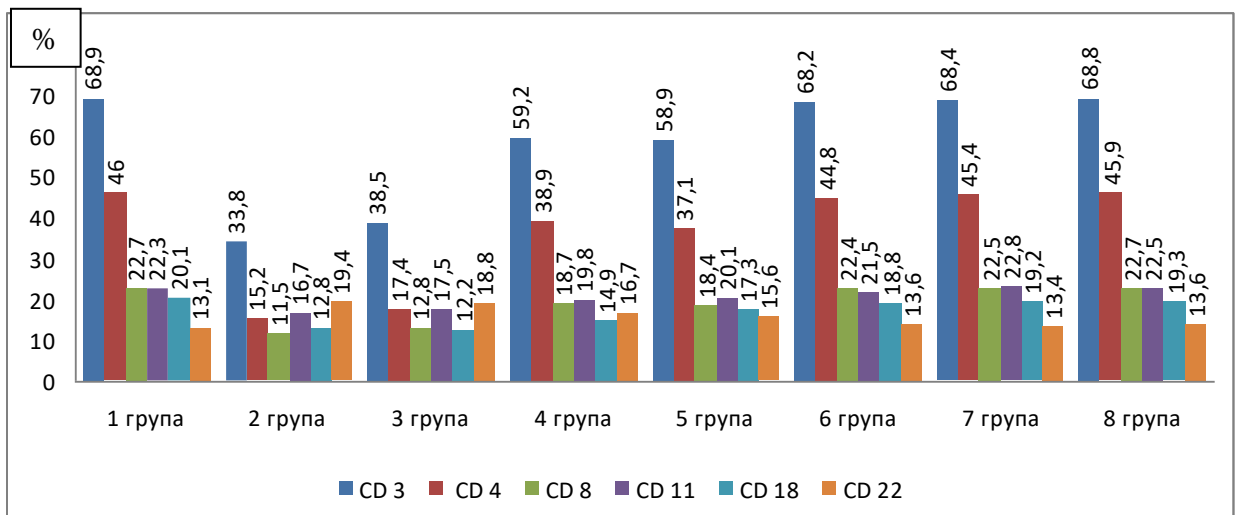


Рис. 5.3 Інтегральні показники субпопуляцій лімфоцитів

Поряд з пригніченням Т-системи відмічається підвищення кількості В-лімфоцитів CD22⁺, що є ключовими рецепторами, які модулюють проходження сигналу під час антигенної стимуляції. Аналізуючи субпопуляційний склад лімфоцитів можна відмітити стан кілерної ланки: зниження кількості CD8⁺, порівняно з групою інтактних тварин.

При імуноморфологічному дослідженні було виявлено, що у внутрішніх органах інфікованих лабораторних тварин ступінь виразності макрофагальної реакції, реакції плазматизації вірогідно вище таких у інтактних тварин. Відмічається внутрішньосудинна фіксація нейтрофільних гранулоцитів CD18

до поверхні, кількість плазмобластів підвищена. У складі запальної інфільтрації визначалися лімфоцити (CD3 (рис. 5.4), CD4, CD8, CD45RA), макрофаги (ED1) і поодинокі нейтрофільні гранулоцити (CD18), плазмобласти з IgM і IgG.

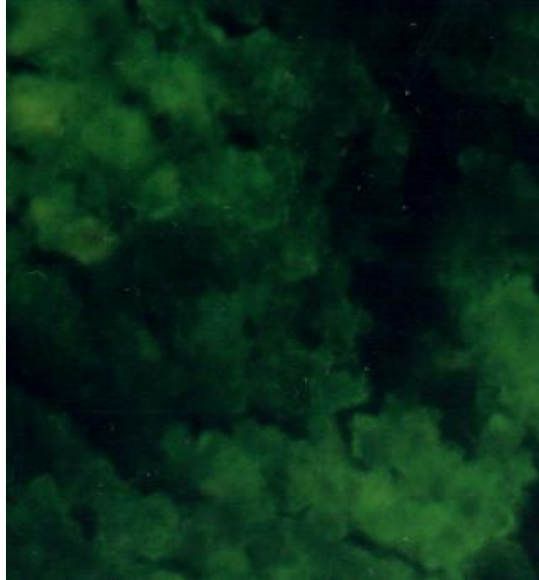


Рис. 5.4 Субпопуляції Т-лімфоцитів (CD3) у вогнищі протейної інфекції

Дані імуноморфологічного дослідження свідчать про розвиток гнійно-запального процесу, що підтверджується внутрішньосудинною фіксацією CD18 нейтрофілів до поверхні. В периферичних органах імунної системи (селезінка та лімфатичні вузли) виявлено різку гіперплазію як Т-, так і В-зон на тлі вираженої макрофагальної реакції, посилену плазматизацію. Подібна закономірність з боку місцевої імунної реакції виявлена і в інтерстиції серця, нирок і печінки, де спостерігалася виражена макрофагальна реакція, посилена плазматизація.

Аналізуючи вплив комплексної терапії із застосуванням світлодіодного випромінювання слід зазначити, що в усіх групах зареєстровано відновлення клітинної ланки імунітету.

Провідна роль у патогенезі гнійно-запального процесу належить медіаторам запалення, які утворюються в організмі у відповідь на фактори агресії, що продукують мікроорганізми. При визначенні цитокінового статусу встановлено, що у інфікованих тварин зафіксовано достовірне

підвищення концентрацій IL-1 β та TNF- α в сироватці крові (рис. 5.5), порівняно з контрольною групою інтактних тварин, а рівень протизапального інтерлейкіну (IL-4) був достовірно знижений тобто спостерігався дисбаланс цитокінового статусу. Активність TNF- α і IL-1 β у сироватці крові дослідних груп лабораторних тварин із застосуванням тільки світлодіодного випромінювання (3 та 4 групи) та з монотерапією (5 група) значно відрізнялася від аналогічних показників як інтактних тварин, так і тварин дослідних груп з комбінованою терапією (6, 7, 8 групи). Так найбільш високий рівень IL-1 β був виявлений у тварин 3-ї та 4-ї дослідних груп, вогнище запалення яких опромінювали синім та червоним спектром (*per se*) світлодіодного випромінювання. Показники IL-1 β в групах, де проводилася комплексна терапія дорівнювала таким показникам групи інтактних тварин.

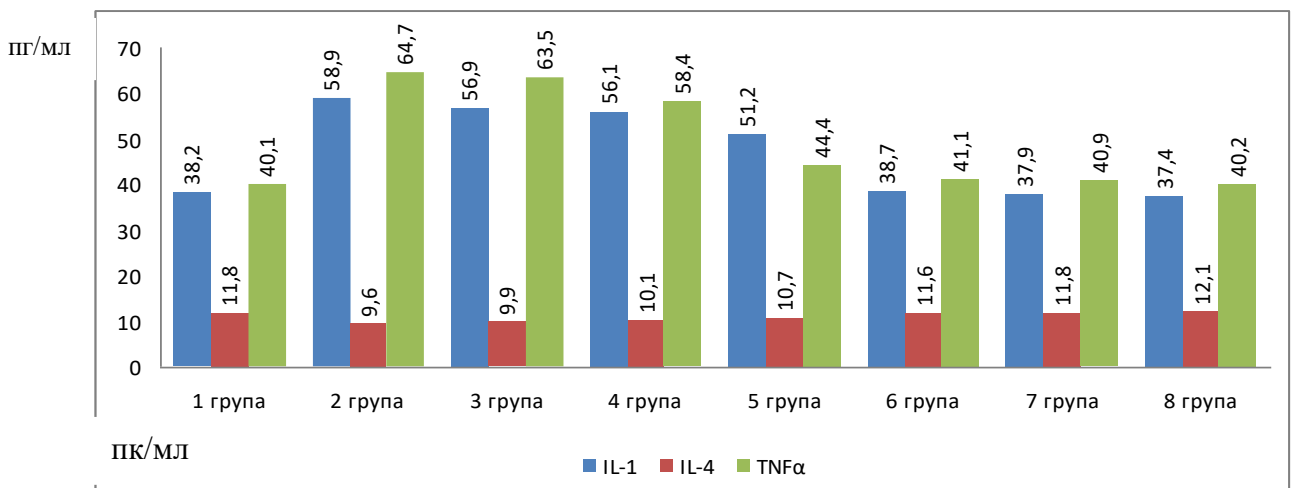


Рис. 5.5 Цитокіновий баланс у сироватці крові контрольних й дослідних групах тварин з комплексною терапією із застосуванням синього й червоного світлодіодів

Поверхневі рецептори до IL-1 β в серці, печінці та нирках, напевно, мають сполучнотканинні клітини, ендотеліоцити, моноцити крові. У зв'язку з чим, не дивлячись на відсутність запальних інфільтратів в стромі цих органів при комбінованому лікуванні експресія вищевказаних рецепторів відзначалася. Найбільш високий рівень IL-1 β був виявлений в тканинах

інфікованої групи тварин без лікування та 3-ї дослідної групи, вогнище запалення яких опромінювали синім світлодіодом (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

Відносна кількість клітин-продуцентів IL-1 β в стромі внутрішніх органів експериментальних тварин ($M \pm m$)

Групи тварин		Відносна кількість клітин продуцентів IL-1 β (%)		
		тканини серця	тканини печінки	тканини нирки
контр	1 група (інтактні)	7,0 \pm 0,3	8,0 \pm 0,4	5,0 \pm 0,3
	2 група (інфіковані)	39,0 \pm 0,6	38,0 \pm 0,6	36,0 \pm 0,7
дослідні групи	3 група (синій спектр)	34,0 \pm 0,6 *# p <0,001	36,0 \pm 0,6 *p <0,005 # p<0,001	32,0 \pm 0,7 *# p <0,001
	4 група (червоний спектр)	28,0 \pm 0,7 *# p <0,001	31,0 \pm 0,8 *# p <0,001	29,0 \pm 0,7 *# p <0,001
	5 група (цефепім)	27,0 \pm 0,5 *# p <0,001	29,0 \pm 0,7 *# p <0,001	26,0 \pm 0,5 *# p <0,001
	6 група (цефепім+синій)	24,0 \pm 0,5 *# p <0,001	21,0 \pm 0,6 *# p <0,001	20,0 \pm 0,5 *# p <0,001
	7 група (цефепім+червоний)	12,0 \pm 6,0 *# p <0,001	17,0 \pm 0,4 *# p <0,001	14,0 \pm 0,4 *# p <0,001
	8 група (цефепім+синій+червоний)	8,0 \pm 0,4 *p <0,001 # p<0,05	9,0 \pm 0,4 *p <0,001 # p<0,1	6,0 \pm 0,3 *p <0,001 # p<0,02

* достовірність порівняно з групою інфікованих тварин без лікування

достовірність порівняно з групою інтактних тварин.

Кількість цих клітин порівняно з групою інфікованих тварин (2 група) прогресивно зменшується вже з початку експерименту і до його завершення. Порівняно з групою інтактних тварин показники клітин-продуцентів IL-1 β 3-ї, 4-ї та 5-ї (рис. 5.6) на всіх стадіях експерименту значно вище, що обумовлено проліферацією клітин-продуцентів цитокінів.

У складі клітинної імунної реакції в тканинах 6-ї дослідної групи тварин виявляється поступове зменшення вмісту клітин-продуцентів IL-1 β .

В групах, де проводилася комплексна терапія із застосуванням цефепіму й червоного світлодіоду (7 група) та цефепіму, червоного й синього світло діоду (8 група) різниця вмісту клітин-продуцентів IL-1 β порівняно з контрольною 2-ю групою, була достовірно зниженою.

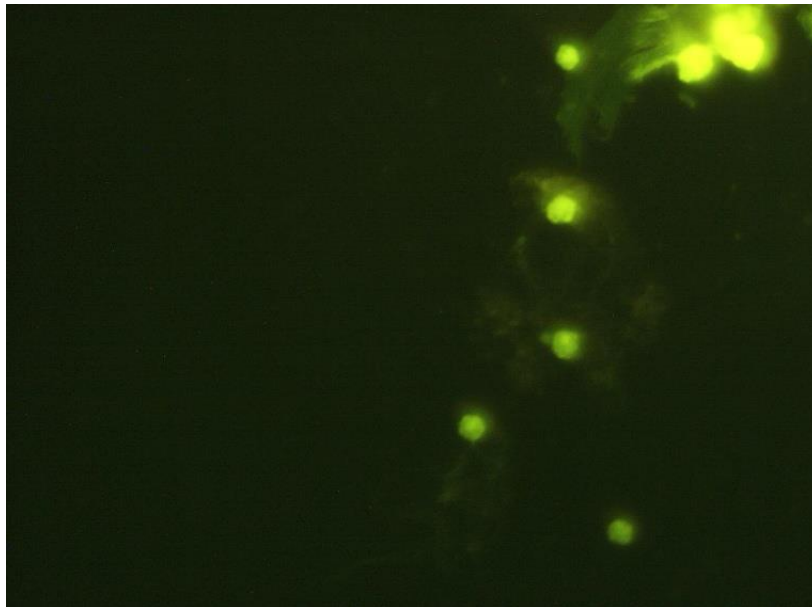


Рис. 5.6 Клітини-продуценти IL-1 β у вогнищі протейної інфекції. 5 група

Проведені дослідження вмісту вогнища протейної інфекції дозволили встановити той факт, що серед клітин запального інфільтрату зростає популяція клітин-продуцентів прозапального цитокіну - IL-1 β , тоді як при комплексній дії цефепіму та синього й червоного світла кількість цих клітин знижувалась. Таким чином, комплексне застосування синього й червоного світлодіодів з цефепімом купірує прозапальну реакцію й знімає антигенне навантаження.

При гнійно-запальній інфекції виявлено достовірне збільшення титру циркулюючого імунного комплексу (ЦІК) в дослідних групах (3, 4 та 5) та групі позитивного контролю (2 група). Ці показники вказують на неповноцінність клітин, що фагоцитують на фоні тривалої персистенції антигену в організмі, що підтверджується активацією цитокінового каскаду. Паралельно з високим вмістом ЦІК відмічалось зниження комплементарної активності, що може бути пов'язано з факторами агресії патогенів (табл.5.3).

Таблиця 5.3

**Динаміка імунологічних показників у тварин дослідних
й контрольних груп**

Групи тварин		Показник			
		ЦІК, од	Ig G г/л	IgM г/л	СН 50
контроль	1 група (інтактні)	10,1±0,1	12,8±1,1	0,6±0,01	42,9±1,01
	2 група (інфіковані)	23,2±0,7*	13,3±1,8	3,8±0,3*	17,2±0,5*
дослідні групи	3 група (синій спектр)	22,8±0,4*	13,8±0,9	3,6±0,2*	18,2±0,6*
	4 група (червоний спектр)	19,7±0,7*	15,6±0,8*#	3,1±0,3*	18,8±0,5*
	5 група (цефепім)	15,6±0,7*	14,7±0,6	2,2±0,4*	26,1±0,6*
	6 група (цефепім+синій спектр)	12,2±0,4#	14,2±0,8	0,9±0,06#	41,5±1,2#
	7 група (цефепім+червоний спектр)	11,3±0,2#	15,4±0,6*#	0,8±0,02#	41,9±1,8#
	8 група (цефепім+синій+червоний спектри)	11,7±0,4#	14,9±0,7*#	0,7±0,03#	41,8±1,6#

Примітка: * $p < 0,001$ – порівняно з інтактними тваринами;

$p < 0,001$ – порівняно з інфікованими тваринами.

Аналіз рівнів імуноглобулінів IgM і IgG групи інфікованих тварин дозволив встановити, що показник сироваткового IgM ($3,8 \pm 0,3$ г/л) був достовірно підвищений порівняно з групою інтактних тварин ($0,6 \pm 0,01$ г/л), а IgG ($13,3 \pm 1,8$ г/л) мав тенденцію до підвищення. Встановлений дефіцит показника активності системи комплементу (СН50). Достовірно показано участь СН50 в механізмах елімінації ЦК, що перешкоджає надмірному накопиченню імунних комплексів і, відповідно, пошкодженню органів і тканин. Тому даний дефект імунної відповіді можна розцінити як результат, з одного боку, порушення секретуючої функції макрофагів, що виробляють СН50, і, з іншого боку, надмірного споживання комплементу при підвищеній продукції імуноглобулінів, а також при утворенні ЦК.

Відповідно, не викликає сумніву, що пригнічення фагоцитарної ланки і дисбаланс рівня імуноглобулінів у сироватці впливають на характер виявлених порушень системи комплементу, але вирішальне значення надає активація антитілоутворення. Здатність В-лімфоцитів до переключення синтезу класів антитіл обумовлена міжклітинною взаємодією за участю ряду цитокінів.

Таким чином, застосування комбінованої терапії виявилось найбільш раціональним. Своєчасна діагностика вкрай важлива, оскільки швидке призначення комбінованої терапії із застосуванням антимікробних засобів з світлодіодним опроміненням на осередок запалення може запобігти розвитку ускладнень. Тому на підставі проведених досліджень був розроблений діагностичний алгоритм (рис. 5.7).

визначення показників клітинної й гуморальної ланок імунітету й цитокінового статусу.

5.3 Морфологічні зміни тканин експериментальних тварин за дії світлодіодного випромінювання синього і червоного спектрів та цефепіму при локалізованій протейній інфекції

Мікроскопічне дослідження тканин інтактної групи лабораторних тварин

При мікроскопічному дослідженні [30] серця інтактних тварин цитоплазма кардіоміоцитів слабо еозинофільна, при ШИК-реакції в ній визначаються численні дрібні зерна глікогену; ядра паличкоподібні, базофільні. При забарвленні по ван Гізон між м'язовими волокнами і навколо судин візуалізуються слабо фуксинофільні тонкі колагенові волокна. Відзначається інтенсивна фуксинофілія стінок великих судин. Інтрамуральні судини помірно кровонаповнені. Базальна мембрана судин помірно ШИК-позитивна. Ендотеліоцити, що лежать на базальній мембрані, сплюснені, з дещо витягнутими базофільними ядрами, рівномірно розташовані по периметру судини. У периваскулярній стромі зустрічаються нечисленні лімфоцити, макрофаги, фібробласти, тучні клітини. Епікард, клапанний та пристінковий ендокард зі слабко фуксинофільною стромою (Додаток Г, рис. 5.8).

Печінка при мікроскопічному дослідженні покрита помірно фуксинофільною сполучнотканинною капсулою, паренхіма з нечітким розподілом на дольки, в центрі яких визначається помірно кровонаповнена центральна вена. Від центральної вени розходяться ряди гепатоцитів, що формують печінкові балки. Клітини печінки неправильної багатокутної форми, ядра округлі, базофільні. Цитоплазма гепатоцитів еозинофільна, з гранулами глікогену, що визначаються при ШИК-реакції у вигляді бузково-малинових грудочок. Ряди гепатоцитів розділені синусоїдами, стінки яких

вистелені сплещеними ендотеліоцитами зі слабо еозинофільною цитоплазмою і великими темними ядрами. Між ендотеліоцитами зустрічаються великі зірчасті купферовські клітини. У портальних зонах визначаються тріади - печінкова артерія, портальна вена, жовчний проток. Строма печінки представлена рихлою волокнистою сполучною тканиною з інтенсивною фуксинофілією фібробластів, лімфоцитів, гістіоцитів. Судини печінки, жовчні протоки і капіляри з ШИК-позитивною базальною мембраною. Ендотеліоцити, що лежать на базальній мембрані, сплещені, з дещо витягнутими базофільними ядрами, рівномірно розташовані по периметру судини (Додаток Г, рис. 5.9).

Нирки з фуксинофільною фіброзною капсулою. У корковій речовині візуалізується 5-6 рядів нефронів (Додаток Г, рис. 5.10).

Капілярні петлі клубочків рівномірно кровонаповнені, містять помірну кількість мезангіоцитів і ендотеліоцитів. Просвіти капсул Боумена-Шумлянського виражені, парієтальний і вісцеральний листок представлений кубічним епітелієм зі слабо еозинофільною та фуксинофільною цитоплазмою і ШИК-позитивною базальною мембраною. Нефротелій проксимальних і дистальних каналців, петель Генле - кубічний з базофільною цитоплазмою і помірно ШИК-позитивною мембраною. Канальці, збиральні трубочки з вираженими просвітами, останні вистелені призматичним епітелієм з помірно еозино- і фуксинофільною цитоплазмою. Міждолькові та дугові вени юкстамедулярної зони помірно кровонаповнені. Стінки великих судин інтенсивно фуксинофільні. Балія і чашечки вистелені перехідним епітелієм з округлими синіми ядрами і еозинофільною цитоплазмою.

Селезінка вкрита фуксинофільною сполучнотканинною капсулою, від якої всередину органа відходять трабекули. Лімфоїдні фолікули округлої форми, з ексцентрично розташованими центральними артеріями, навколо яких визначаються 4 нечітко розмежовані зони: періартеріальна, світлий центр розмноження, мантийна і крайова. Лімфоїдні фолікули оточені помірно

повнокровними крайовими синусоїдальними судинами. Червона пульпа з фуксинофільними ретикулярними волокнами з розташованими в ній елементами крові і численними повнокровними судинами (Додаток Г, рис. 5.11).

Таким чином, мікроскопічна картина вище описаних препаратів серця, печінки, нирок, селезінки відповідають їх нормальній гістологічній будові, що дозволяє вважати досліджувану групу правильно підбраною в якості контролю.

Морфологічні зміни тканин групи лабораторних тварин з гнійно-запальною протейною інфекцією

При мікроскопічному дослідженні серця інфікованої групи тварин (позитивний контроль) - цитоплазма кардіоміоцитів слабо еозинофільна з зернистими еозинофільними включеннями, ядра паличкоподібні, помірно базофільні. При ШИК-реакції візуалізуються поодинокі дрібні зерна глікогену в перинуклеарній зоні клітин. Простори між м'язовими волокнами і периваскулярними просторами виглядають оптично порожніми за рахунок набряку строми, при забарвленні за ван Гізоном, остання слабо фуксинофільна. Інтрамуральні судини повнокровні, з вогнищевими периваскулярними крововиливами в субепікардіальній зоні. Відзначається інтенсивна фуксинофілія стінок великих судин. Базальна мембрана судин помірно ШИК-позитивна. Ендотеліоцити, що лежать на базальній мембрані, набряклі, вогнищево дескваміровані, вогнищево проліферовані (Додаток Г, рис. 5.12).

Навколо судин, місцями з поширенням на прилеглу строму міокарду виявляються гістіолімфоцитарні інфільтрати. Епікард зі слабо фуксинофільною стромою, набряклий, з дрібновогнищевими запальними інфільтратами, в яких переважають сегментоядерні лейкоцити. Клапанний і пристінковий ендокард набряклий, слабо фуксинофільний з вогнищами запальної лімфогістіоцитарної інфільтрації.

Печінка при мікроскопічному дослідженні покрита помірно фуксинофільною сполучнотканинною капсулою, паренхіма з нечітким розподілом на часточки, в центрі яких визначається повнокровна центральна вена, в частині полів зору з повнокрів'ям прилеглих синусоїдів і вогнищевими периваскулярними крововиливами. Від центральної вени розходяться ряди гепатоцитів, що формують печінкові балки. Клітини печінки неправильної форми, ядра їх округлої форми, слабо базофільні. Зустрічаються нечисленні гепатоцити, ядра в яких не визначаються або візуалізуються у вигляді тіней, окремі клітини містять два ядра. Цитоплазма гепатоцитів слабо забарвлюється кислими барвниками, містить еозинофільні зернисті включення, в частині клітин дрібні вакуолі, заповнені цитоплазматичною рідиною. При ШИК-реакції гранули глікогену визначаються тільки в деяких гепатоцитах центрів дольок. Ряди гепатоцитів розділені синусоїдами, стінки яких вистелені сплещеними ендотеліоцитами зі слабо еозинофільною цитоплазмою і великими темними ядрами. Між ендотеліоцитами зустрічаються великі зірчасті купферовські клітини, в частині препаратів відзначається їх проліферація навколо некротизованих гепатоцитів. У портальних зонах визначаються тріади – печінкова артерія, портальна вена, жовчний проток Периваскулярно в портальних трактах місцями з поширенням на міждолькову строму зустрічаються вогнищеві лімфогістіоцитарні запальні інфільтрати. Строма печінки представлена рихлою волокнистою сполучною тканиною з інтенсивною фуксинофільією в портальних трактах і стінках великих судин. Судини печінки, жовчні протоки і капіляри з ШИК-позитивною базальною мембраною. Ендотелій судин набряклий, частково десквамований (Додаток Г, рис. 5.13).

Нирки з фуксинофільною фіброзною капсулою. У корковій речовині візуалізується 5-6 рядів нефронів. Капілярні петлі клубочків нерівномірно повнокровні, містять помірну кількість мезангіоцитів і ендотеліоцитів. Просвіти капсул Боумена-Шумлянського виражені, парієтальний і вісцеральний листок представлений кубічним епітелієм зі слабо

еозинофільною та фуксинофільною цитоплазмою і ШИК-позитивною базальною мембраною. Нефротелій проксимальних і дистальних каналців, петель Генле - кубічний з базофільною цитоплазмою і помірно ШИК-позитивної мембраною. Просвіти проксимальних каналців звужені за рахунок набряклого епітелію з еозинофільною зернистістю в цитоплазмі, ядра слабо базофільні, в частині клітин не визначаються або візуалізуються у вигляді тіней. Збиральні трубочки з вираженими просвітами, вистелені призматичним епітелієм з помірно еозино- і фуксинофільною цитоплазмою. Міждолькові і дугові вени юкстамедулярної зони з вогнищевими периваскулярними крововиливами (Додаток Г, рис. 5.14).

Навколо судин переважно коркового шару зустрічаються вогнищеві запальні інфільтрати, в частині спостережень поширюються на прилеглу строму, до складу яких входять переважно лімфоцити, гістіоцити, поодинокі нейтрофіли. Стінки великих судин інтенсивно фуксинофільні. Балія і чашечки вистелені перехідним епітелієм з округлими синіми ядрами і еозинофільною цитоплазмою.

Селезінка вкрита фуксинофільною сполучнотканинною капсулою, від якої всередину органа відходять трабекули. Лімфоїдні фолікули гіперплазовані з проясненням центрів за рахунок витіснення лімфоцитів плазмоцитами і плазмобластами. Плазматизація також має місце в крайовій зоні лімфатичних вузликів, внаслідок чого вона виглядає світлою. Лімфоцити зустрічаються переважно в періартеріальній зоні фолікулів і у вигляді вогнищевих скупчень в червоній пульпі. Лімфоїдні фолікули оточені помірно повнокровними крайовими синусоїдальними судинами. Червона пульпа з набряклою слабо фуксинофільною стромою, повнокровними судинами з вогнищевими екстравазатами, містить велику кількість плазмобластів і макрофагів (Додаток Г, рис. 5.15).

Таким чином, дані мікроскопічного дослідження тканин серця, печінки, нирок інфікованих тварин, показують, що в них переважають дисциркуляторні порушення, дистрофічні зміни і слабо виражена запальна

реакція в стромі. У селезінці як в органі імунної системи має місце помірно виражені гіперпластичні процеси з плазмобластною трансформацією лімфоцитів і макрофагальною реакцією. Виявлені у внутрішніх органах зміни обумовлені загальною інтоксикацією, що розвивається за наявності гнійно-деструктивного вогнища з генералізацією процесу.

Мікроскопічне дослідження тканин групи інфікованих тварин за дії синього спектра світлодіодного випромінювання на осередок запалення

При використанні електромагнітного випромінювання синього спектра для лікування тварин з локалізованим гнійно-некротичним процесом морфологічно відзначається обмеження вираженості інтерстиціального запалення і поширеності дистрофічних процесів в паренхімі серця і нирок органів, порівняно з тваринами, що не лікувалися. Однак, в печінці характер морфологічних змін істотно не відрізняється від таких у групі без лікування. У селезінці зберігаються явища гіперплазії і плазмобластно-макрофагальної трансформації лімфоїдної тканини.

При вивченні препаратів серця даної групи цитоплазма кардіоміоцитів набрякла, з еозинофільної зернистістю, паличкоподібні ядра помірно сприймають основні барвники. При ШИК-реакції визначається втрата глікогену більшістю м'язових клітин. Групи м'язових волокон роз'єднані, простори між ними розширені за рахунок набряку інтерстицію. Строма всіх шарів стінки серця при забарвленні по Ван Гізон містить слабо фуксинофільні колагенові волокна, стінки великих судин інтенсивно фуксинофільні. Судинна базальна мембрана помірно ШИК-позитивна та фуксинофільна. Ендотелій, що їх вистилає, трохи набряклий з ділянками десквамації і проліферації. Судини повнокровні, переважно в субепікардіальній зоні з вогнищевими екстравазатами. У більшості спостережень у всіх шарах стінки серця периваскулярно визначаються дрібновогнищеві периваскулярні лімфогістіоцитарні інфільтрати (Додаток Г, рис. 5.16).

У печінці центральні вени часточок і судини порталних трактів повнокровні з вогнищевими периваскулярними крововиливами. Базальна мембрана судин, жовчних протоків та капілярів помірно фуксинофільні, ШИК-позитивна. Стінки судин фуксинофільні. Портальні зони розширені, інфільтровані переважно лімфоцитами та гістіоцитами з поширенням інфільтрації на міждолькову строму.

Гепатоцити з ознаками білкової дистрофії, без втрати глікогену при ШИК-реакції. Зустрічаються дрібновогнищеві некрози гепатоцитів з проліферацією навколо купферовських клітин. Зрідка візуалізуються двоядерні гепатоцити. Перисінусоїдальні простори дещо розширені (Додаток Г, рис. 5.17).

У нирках відзначається повнокров'я судин інтермедіарної зони, нерівномірне повнокров'я капілярів клубочків. Базальні мембрани судин помірно фуксинофільні та ШИК-позитивні. Стінки великих судин інтенсивно фуксинофільні. Периваскулярно визначаються в частині полів зору крововиливи, вогнищеві лімфогістіоцитарні інфільтрати, не поширюються на прилеглу межуточну тканину. Строма кілька набрякла, слабо фуксинофільна. Клубочки з помірним вмістом мезангіальних і ендотеліальних клітин, просвіти капсул оптично порожні. Епітелій усіх відділів нефрону з еозинофільною цитоплазмою і базофільним округлим ядром. В епітелії проксимальних каналців визначається еозинофільна зернистість, набрякання епітелію, за рахунок чого просвіт каналців виражений нерівномірно.

При мікроскопічному дослідженні селезінки фолікули переважно укрупнені за рахунок розширення гермінтативних центрів і крайової зони, плазмобластною трансформацією лімфоцитів в них. Періартеріальна і мантійна зони не розширені. Червона пульпа повнокровна з нерізко вираженими явищами гіперплазії і плазмобластно-макрофагальної трансформації. Строма органу слабо фуксинофільна, судини селезінки повнокровні, їх стінка помірно фуксинофільна, ендотеліоцити з ядром

втягнутої форми, слабо еозинофільною цитоплазмою, базальна мембрана їх помірно ШИК-позитивна.

Морфологічні зміни тканин групи лабораторних тварин з локалізованою гнійно-запальною протейною інфекцією за дії світлодіодного випромінювання червоного спектра

При використанні червоного спектра електромагнітного випромінювання для лікування місцевого гнійного процесу вираженість інтерстиціального запалення в серці, печінці та нирках носить локалізований вогнищевий характер, у запальний процес практично не залучаються паренхіматозні структури цих органів, альтеративні зміни спостерігаються у вигляді паренхіматозної дистрофії та вогнищового некробіозу, відзначаються дисциркуляторні порушення, явища гіперплазії і плазмобластно-макрофагальної трансформації лімфоїдної тканини селезінки та лімфатичних вузлів.

Мікроскопічно в кардіоміоцитах виявляються ознаки паренхіматозної дистрофії кардіоміоцитів у вигляді еозинофільної зернистості в цитоплазмі і відсутності включень глікогену, що визначається при ШИК-реакції. Ядра клітин з чіткими контурами, помірно забарвлюються основними барвниками, субендокардіально окремі ядра слабо пофарбовані гематоксиліном. Строма всіх шарів серця слабо фуксинофільні, дещо набрякла, з вогнищевими переважно периваскулярними інфільтратами, у складі яких переважають клітини лімфоїдного ряду та гістіоцити. Судини повнокровні, ендотеліоцити кілька набрякли, з вогнищами проліферації і десквамації, судинна базальна мембрана збережена на всьому протязі, слабо ШИК-позитивна. Стінки судин помірно фуксинофільні, периваскулярно зустрічаються вогнищеві крововиливи (Додаток Г, рис.5.18).

У печінці гепатоцити з еозинофільною зернистістю цитоплазми, ядра помірно сприймають основні барвники. При ШИК-реакції відзначається відсутність глікогену в гепатоцитах периферичних відділів дольок. Там же зустрічаються окремі гепатоцити зі слабо пофарбованим ядром, оточені

проліферуючими купферовськими клітинами; зустрічаються двоядерні гепатоцити. Центральні вени дольок і прилеглі міжбалочні капіляри повнокровні. Міждолькова строма при забарвленні за ван Гізоном помірно фуксинофільна, перисінусоїальні простори дещо розширені. Портальні тракти помірно фуксинофільні з вогнищевою лімфогістіоцитарною інфільтрацією, яка не поширюється на міждолькову строму. Судини з помірно фуксинофільною стінкою, ендотелій дещо набряклий, ядра помірно забарвлюються основними барвниками. Базальна мембрана ендотелію неперервна, помірно ШИК-позитивна.

У нирках епітелій проксимальних каналців з еозинофільними включеннями, ядра клітин чітко окреслені, помірно або слабо забарвлені гематоксиліном. Просвіти каналців нерівномірно звужені. Розміри і форма клубочків не змінені, просвіти капсул виражені, оптично порожні. Строма нирок слабо фуксинофільна, набрякла.

Судини переважно інтермедіарної зони повнокровні з вогнищевими екстравазатами. Ендотелій дещо набряклий, базальна мембрана неперервна, слабо ШИК-позитивна і фуксинофільна. Периваскулярно зустрічаються обмежені лімфогістіоцитарні інфільтрати (Додаток Г, рис.5.19).

При мікроскопічному дослідженні селезінки фолікули переважно великого і середнього калібру з явищами гіперплазії і плазмобластно-макрофагальної трансформації. У червоній пульпі поряд зі збільшенням щільності лімфоцитів визначається значна кількість плазмобластів, плазмоцитів, макрофагів. Судини селезінки, переважно червоної пульпи, помірно повнокровні, базальна мембрана збережена, слабо ШИК-позитивна.

Таким чином, при застосуванні синього або червоного світлодіодного випромінювання морфологічні зміни у внутрішніх органах характеризуються зниженням ступеню вираженості запально-проліферативних процесів і дисциркуляторних розладів у стромі і судинах, зменшенням вираженості альтеративних змін в паренхіматозних структурах, із збереженням гіперпластичних процесів в імунокомпетентних тканинах.

Морфологічні зміни тканин групи лабораторних тварин з локалізованою гнійно-запальною інфекцією з наступною терапією цефепімом

При мікроскопічному вивченні серця інфікованих тварин з наступною терапією цефепімом було встановлено, що строма міокарда набрякла, що візуалізується у вигляді роз'єднання м'язових волокон і розширення периваскулярних просторів (Додаток Г, рис. 5.20).

При забарвленні за ван Гізоном міжм'язова та периваскулярна строма визначається у вигляді тонких слабо фуксинофільних колагенових волокон; стінки великих судин з вираженою фуксинофілією. Судини помірно повнокровні, переважно в субепікардіальній зоні зустрічаються периваскулярні крововиливи. Базальна мембрана судин неперервна, ШИК-позитивна, ендотеліоцити, що лежать на ній дещо набряклі з базофільним ядром, ендотелій частково десквамований, зустрічаються вогнища проліферації ендотеліоцитів.

Кардіоміоцити з базофільними паличкоподібними ядрами, слабо еозинофільною цитоплазмою, в якій зустрічаються дрібні еозинофільні включення. При ШИК-реакції в цитоплазмі частини м'язових клітин визначаються ланцюжки із зерен глікогену. Строма епікарда і ендокарда дещо набрякла, слабо фуксинофільна. Зрідка в стромі міокарда, епікарда периваскулярно візуалізуються дрібновогнищеві лімфогістіоцитарні інфільтрати. В ендокарді запальна інфільтрація не визначається.

У печінці капсула помірно фуксинофільна, дольчатість не різко виражена. Центральні вени і судини порталних трактів повнокровні, базальна мембрана їх неперервна, помірно ШИК-позитивна. Ендотеліоцити артерій, вен і синусоїдів сплюснені, з витягнутим базофільним ядром, в частині спостережень зустрічаються вогнища десквамації та проліферації цих клітин. У стромі порталних трактів периваскулярно в половині спостережень визначаються дрібновогнищеві запальні інфільтрати, у складі яких переважають лімфоцити і гістіоцити. Проліферація купферовських клітин

носить дрібновогнищевий характер. Балочна будова в печінці збережена; гепатоцити з округлими помірно базофільними ядрами з чіткими межами, зустрічаються численні двоядерні гепатоцити. Цитоплазма печінкових клітин з еозинофільною зернистістю, при ШИК-реакції перінуклеарно в частині клітин центру дольок визначаються дрібні бузково-малинові зерна глікогену. У частині спостережень визначається повнокров'я центральних вен з прилеглими синусоїдами і вогнищевими периваскулярними крововиливами.

Мікроскопічно нирки покриті фуксинофільною капсулою. У корі налічується 5-6 рядів нефронів. Капілярні клубочки повнокровні, у мезангії визначається помірна кількість мезангіоцитів і ендотеліоцитів. Просвіти капсул Боумена-Шумлянського не розширені, виглядають оптично порожніми, парієтальний і вісцеральний листок представлені кубічним епітелієм зі слабо еозинофільною цитоплазмою. Нефротелій проксимальних і дистальних канальців, петель Генле – кубічний з базофільною цитоплазмою. Базальна мембрана нефротелію всіх відділів нефрону помірно ШИК-позитивна і помірно фуксинофільна. У набряклому епітелії проксимальних канальців візуалізується еозинофільна зернистість цитоплазми із звуженням просвіту канальців. Збиральні трубочки з вираженими просвітами, вистелені призматичним епітелієм з помірно еозино- і фуксинофільною цитоплазмою. Міждолькові й дугові вени юкстамедулярної зони повнокровні з вогнищевими периваскулярними крововиливами (Додаток Г, рис. 5.21).

В одному спостереженні в кірковому шарі периваскулярно візуалізуються дрібновогнищеві запальні інфільтрати, до складу яких входять переважно лімфоцити і гістіоцити. Стінки великих судин інтенсивно фуксинофільні. Балія і чашечки вистелені перехідним епітелієм з округлими ядрами і еозинофільною цитоплазмою

Селезінка з фуксинофільною сполучнотканинною капсулою, з трабекулами, що відходять у глибину органу. Лімфоїдні фолікули збільшені, гермінтативні центри великі, світлі, містять плазмобласти, плазмоцити,

макрофаги. Плазматизація також має місце в крайовій зоні лімфатичних вузликів, внаслідок чого вона виглядає світлою. Періартеріальні зони фолікулів розширені за рахунок гіперплазії лімфоцитів, вогнищеві скупчення яких зустрічаються в червоній пульпі. Лімфоїдні фолікули оточені помірно повнокровними крайовими синусоїдальними судинами. Червона пульпа з набряклою слабо фуксинофільною строюю, повнокровними судинами з вогнищевими екстравазатами (Додаток Г, рис. 5.22).

Таким чином, при використанні цефепіму в паренхіматозних органах відзначається зниження вираженості межучотного запалення, що пояснюється протимікробною активністю препарату. Поряд з цим, зберігаються дистрофічні і дисциркуляторні зміни в органах. У селезінці спостерігаються гіперпластичні процеси в В- і Т-зонах лімфатичних фолікулів, що відображає розвиток імунних реакцій як на інфекційних бактеріальних агентів, так і на введення хіміотерапевтичного препарату.

Мікроскопічне дослідження тканин групи інфікованих тварин з комплексною терапією цефепімом й опроміненням осередку запалення синім світлодіодом

В мікропрепаратах тканин групи інфікованих тварин з комплексною терапією цефепімом й опроміненням осередку запалення синім світлодіодом в серці зменшується вираженість набряку строми, який відзначається тільки в 2 - спостереженнях. У цих же спостереженнях в міокарді периваскулярно визначаються дрібновогнищеві лімфогістіоцитарні інфільтрати, не поширюються на прилеглі відділи строми; в ендокарді та епікарді запальна інфільтрація або відсутня, або носить дрібновогнищевий характер.

При забарвленні за ван Гізоном волокнисті структури строми помірно фуксинофільні, судинні стінки з більш вираженою фуксинофільією. Артеріальні та венозні судини помірно повнокровні, в 3-х спостереженнях в субепікардіальній зоні зустрічаються дрібні периваскулярні крововиливи. Базальна мембрана судин при ШИК-реакції візуалізується у вигляді безперервної лінії з помірною інтенсивністю забарвлення. Ендотеліоцити з

набряклою слабо еозинофільною цитоплазмою і дещо витягнутим базофільним ядром. У цитоплазмі кардіоміоцитів виявляється еозинофільна зернистість, при ШИК-реакції глікоген визначається в деяких м'язових клітинах у вигляді ланцюжків із гранул бузково-малинового кольору.

У печінці спостерігається нерівномірно виражене повнокров'я центральних вен і судин порталних трактів. Базальна мембрана судин, жовчних протоків і капілярів при ШИК-реакції неперервна, з помірною інтенсивністю забарвлення. У дещо набряклій стромі порталних зон в більшості спостережень зустрічаються дрібно вогнищеві лімфогістіоцитарні інфільтрати, що не мають тенденції до поширення на міждолькову строму (Додаток Г, рис. 5.23).

Гепатоцити з еозинофільною зернистістю в цитоплазмі, при ШИК-реакції глікоген не завжди візуалізується. Окремі гепатоцити в стані некробіозу і некрозу, оточені проліфератами з зірчастих ретикулоендотеліоцитів. Зустрічаються двоядерні печінкові клітини.

У нирках відзначається нерівномірно виражене повнокров'я судин і капілярів клубочків. Судинні базальні мембрани помірно фуксинофільні, при ШИК-реакції візуалізуються у вигляді безперервної лінії з помірно вираженістю реакції (Додаток Г, рис. 5.24).

У інтермедіарній зоні зустрічаються периваскулярні крововиливи. У більшості спостережень навколо деяких судин визначаються дрібновогнищеві лімфогістіоцитарні інфільтрати без поширення на прилеглу межуточну тканину. В епітелії проксимальних каналців відзначається еозинофільна зернистість цитоплазми, просвіти каналців звужені, місцями не визначаються.

У селезінці мають місце ознаки антигенної стимуляції: гіперплазія червоної пульпи і лімфоїдних фолікулів з плазмобластно-макрофагальною трансформацією останніх, проте вираженість гіперпластичних процесів нижче, збільшується вміст лімфоцитів в периартеріальній зоні фолікулів і в

червоній пульпі, крайова зона фолікулів чіткіше диференціюється з червоною пульпою. Разом з тим зберігається повнокров'я судин селезінки.

Таким чином, при застосуванні комплексно цефепіму з використанням синього світлодіоду на вогнище запалення, в серці, печінці та нирках відзначається деяке зниження вираженості межуточного запалення із збереженням дисциркуляторних порушень і дистрофічних процесів в паренхіматозних структурах. У селезінці відзначаються морфологічні ознаки, що свідчать про тенденцію до відновлення її структури. Отримані результати свідчать про те, що даний вид електромагнітного випромінювання підсилює чутливість мікроорганізмів до дії хіміотерапевтичного препарату, сприяючи обмеженню розповсюдження інфекції і запобігаючи розвитку виражених запальних змін у внутрішніх органах.

Мікроскопічне дослідження тканин групи інфікованих тварин з комплексною терапією цефепімом й опроміненням осередку запалення червоним світло діодом

При мікроскопічному дослідженні серця тканин групи інфікованих тварин з комплексною терапією цефепімом й опроміненням вогнища запалення червоним світлодіодом виявляється, що кардіоміоцити перебувають у стані паренхіматозної білкової дистрофії. При ШИК-реакції в цитоплазмі частини клітин визначаються бузково-малинові грудочки глікогену. Судини, головним чином, субепікардіального відділу міокарда повнокровні, вистелені сплосченим ендотелієм з базофільними ядрами. Базальна мембрана судин ШИК-позитивна, неперервна. У 3-х спостереженнях периваскулярно визначаються крововиливи. Строма міокарда, епікарда, ендокарда набрякла, сполучнотканинні волокна помірно фуксинофільні, стінки судин з вираженою фуксинофілією. У половині спостережень в розширених периваскулярних просторах міокарда визначаються вогнищеві запально-клітинні інфільтрати, переважно лімфогістіоцитарні. У епікарді зустрічаються дрібновогнищеві скупчення макрофагів і лімфоцитів (Додаток Г, рис. 5.25).

У печінці спостерігається повнокров'я центральних вен дольок, судин порталних трактів. Базальна мембрана судин і жовчних протоків, капілярів помірно ШИК-позитивна, неперервна. Ендотеліоцити сплюснені, з базофільним витягнутим ядром, в одному спостереженні відзначається вогнищева десквамація ендотелію з ділянками його проліферації. Строма набрякла, колагенові волокна слабо фуксинофільні. Запальна лімфогістіоцитарна інфільтрація порталних зон носить вогнищевий характер без поширення на міждолькову строму. В гепатоцитах візуалізується еозинофільна зернистість цитоплазми, в деяких клітинах центрів дольок при ШИК-реакції виявляються грудочки глікогену. Іноді виявляються некротизовані гепатоцити, оточені купферовськими клітинами, і двоядерні гепатоцити.

У нирках строма декілька набрякла, відзначається нерівномірно виражене повнокров'я судин, капілярів клубочків. Ендотеліальних і мезангіальних клітин у клубочках помірна кількість. Зустрічаються вогнищеві екстравазати, вогнищеві периваскулярні лімфогістіоцитарні інфільтрати, не поширюються на прилеглу межуточну тканину. Епітелій проксимальних каналців набряклий з еозинофільною зернистістю в цитоплазмі, звуженням просвіту каналців.

При мікроскопічному дослідженні селезінки відзначається укрупнення лімфоїдних фолікулів з гіперплазією Т- і В-залежних зон, плазмобластною трансформацією і макрофагальною реакцією в фолікулах і червоній пульпі. Судини селезінки, переважно червоної пульпи, помірно повнокровні (Додаток Г, рис. 5.26).

Отже, при застосуванні у комплексній протимікробній терапії гнійно-некротичного процесу червоного світлодіоду й цефепіму морфологічні дані свідчать про зменшення ступеня вираженості дистрофічних процесів та інтерстиціального запалення в паренхіматозних органах порівнянно з групами, в яких терапія не проводилася або тварини отримували тільки

антибактеріальний препарат. Разом з тим зберігаються явища гіперплазії лімфоїдної тканини селезінки.

Мікроскопічне дослідження тканин групи інфікованих тварин з комплексною терапією цефепімом й опроміненням осередку запалення синім та червоним світлодіодами

При мікроскопічному дослідженні тканин внутрішніх органів групи інфікованих тварин з комплексною терапією цефепімом й опроміненням осередку запалення синім та червоним світлодіодами, в кардіоміоцитах цитоплазма помірно еозинофільна, ядра добре сприймають основні барвники, при ШИК-реакції в частині клітин не візуалізується глікоген. Значно зменшується набряк помірно фуксинофільні строми міокарда, запальні зміни не виявляються, тільки в одному спостереженні іноді в міокарді зустрічалися дрібновогнищеві периваскулярні лімфогістіоцитарні інфільтрати. Судини помірно повнокровні, вогнищеві периваскулярні крововиливи зустрічаються в одному спостереженні. Базальна мембрана судин помірно ШИК-позитивна і фуксинофільна. Епікард з дещо набряклою помірно фуксинофільною стромою без запальних змін. Клапанний і пристінковий ендокард з помірно фуксинофільною дещо набряклою стромою без деструктивних і запальних змін.

У печінці в досліджуваній групі спостерігається помірно повнокров'я центральних вен дольок без поширення на прилеглі міжбалочні капіляри. Перисінусоїдальні простори дещо розширені. У стінках синусоїдів проліферація купферовських клітин в більшості спостережень не відзначається, в одному випадку зустрічаються дрібні проліферати навколо одиничних загиблих гепатоцитів. Зустрічаються численні двоядерні гепатоцити (Додаток Г, рис. 5.27).

В слабо еозинофільній цитоплазмі печінкових клітин, переважно центрів дольок, виявляються при ШИК-реакції грудочки глікогену, на периферії дольок зберігаються ознаки паренхіматозної білкової та вуглеводної дистрофії. Строма порталних трактів дещо набрякла,

розволокнена, зрідка з дрібновогнищевими периваскулярними інфільтратами з лімфоцитів і гістіоцитів. Стінки судин фуксинофільні, вистелені сплещеними ендотеліоцитами, базальна мембрана судин, жовчних протоків та капілярів помірно ШИК-позитивна і фуксинофільна.

У нирках судини помірно повнокровні з одиничними вогнищевими екстравазатами. Ендотеліоцити витягнутої форми зі слабо базофільною цитоплазмою і базофільним ядром, рівномірно розподілені по судинній стінці. Судинна базальна мембрана при ШИК-реакції чітко контурується у вигляді безперервної тонкої лінії. Ниркові клубочки з добре вираженим просвітом капсули, без ознак проліферації клітинних елементів, капілярні петлі помірно повнокровні, з помірно ШИК-позитивною базальною мембраною. Нефротелій всіх відділів зі слабо еозинофільною та фуксинофільною цитоплазмою, ядра клітин помірно забарвлюються основними барвниками, базальна мембрана слабо ШИК-позитивна. Епітелій проксимальних каналців дещо набряклий, місцями з еозинофільними включеннями, просвіти каналців виражені нерівномірно (Додаток Г, рис. 5.28).

При мікроскопічному дослідженні селезінки фолікули переважно середнього розміру, з диференціюванням периартеріальної зони, світлого центру розмноження, мантийною та крайовою зоною. Біла пульпа чітко відділяється від червоної, в останній відмічається зменшення вираженості гіперплазії і плазмобластно-макрофагальної трансформації. У порівнянні з попередніми групами, серед клітинних елементів селезінки зменшується вміст плазмобластів, плазмоцитів і макрофагів.

Строма органу слабо фуксинофільна, судини селезінки помірно повнокровні, стінка помірно фуксинофільна, ендотеліоцити з ядром витягнутої форми, слабо еозинофільною цитоплазмою, базальна мембрана їх помірно ШИК-позитивна.

Висновки до розділу 5:

1. Комплексне застосування світлодіодного випромінювання червоного та синього спектрів й цефепіму при локалізованій гнійно-запальній протейній інфекції скорочує терміни загоювання осередку запалення порівняно із застосуванням тільки цефепіму - до 7 діб, забезпечує добре загоєння осередку запалення, що підвищує ефективність протимікробної терапії гнійно-запальних захворювань.
2. Доведено *in vivo*, що прискорення репаративних процесів некротичного осередку за комплексного впливу світлодіодного випромінювання червоного спектра пов'язано з підвищенням активації фагоцитозу у 1,9 рази й кількості антигенів в нейтрофільних позаклітинних пастках у 1,6 рази, а за дії синього спектра – з пригніченням формування біоплівки мікроорганізмами.
3. Показано, що при розвитку локалізованої гнійно-запальної інфекції шкіри відбувається внутрішньосудинна фіксація CD18 нейтрофілів до поверхні ендотелію судин. В периферичних органах імунної системи виявлено гіперплазію як Т- , так і В - зон на тлі вираженої макрофагальної реакції, що підтверджує розвиток гострого інфекційного процесу в організмі піддослідних тварин.
4. При комплексному використанні цефепіму та світлодіодного випромінювання червоного і синього оптичних спектрів морфологічна картина в паренхіматозних органах характеризується значним зниженням ступеня вираженості запальних процесів в стромі паренхіматозних органів, зменшенням вираженості дистрофічних і дисциркуляторних порушень. В селезінці, як органі імунної системи, спостерігаються ознаки нормалізації її морфофункціонального стану.
5. Таким чином, при наявності в організмі вогнищового гнійного запалення вищеназвана комплексна терапія попереджає розвиток генералізації процесу, сприяє посиленню репаративних можливостей організму.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях: [31, 33, 34, 137, 138, 170].

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

За останні роки в Україні спостерігається збільшення частоти випадків локалізованих гнійно-запальних захворювань. Переважно при перших ознаках захворювання пацієнти не звертаються за медичною допомогою та намагаються лікуватися самостійно. Відсутність комплексного підходу, а також невірно обрана тактика лікування хворого в профільних установах можуть сприяти генералізації інфекції у пацієнта і погіршенню його стану. Широке впровадження антимікробних препаратів в клінічну практику, за даними літератури [5], дозволило значно скоротити терміни лікування хворих і скоротити летальність. Разом з тим, усі призначення повинні бути обґрунтованими і адекватними. У повсякденній клінічній практиці швидка постановка бактеріологічного діагнозу ускладнена в силу різних причин, тому найчастіше призначення антибіотиків відбувається емпіричним методом, що призводить до безконтрольного їх використання, сприяючи поширенню антибіотикорезистентних форм збудників інфекції.

У літературі досить широко описані ефекти дії на мікроорганізми іонізуючого і ультрафіолетового випромінювань [26]; в той час як вплив оптичного випромінювання, зокрема синього та червоного спектрів, залишається мало дослідженим. При цьому слід зазначити, що вивчення ефектів, що надаються випромінюваннями на бактерії, має і фундаментальний характер, оскільки випромінювання здатні здійснювати як позитивний, так і негативний вплив, механізми якого не виявлені. Даних про вплив світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів на планктонну та біоплівкову форми існування мікроорганізмів та на репаративні процеси при експериментальному ГЗЗ шкіри, вивчено недостатньо, а отримання результатів щодо вивчення імунного, цитокінового стану та морфологічних ознак становить значний науковий інтерес і може мати прикладне значення. Тому дана робота присвячена визначенню дії

протимікробних препаратів та світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів на планктонну і біоплівкову форму існування збудників гнійно-запальних захворювань шкіри за мікробіологічними, імунологічними та морфологічними ознаками.

При дослідженні чутливості виділених штамів мікроорганізмів до протимікробних препаратів було виявлено, що серед культур є штами, які мають множинну резистентність, що є наслідком широкого й не завжди раціонального застосування антибіотиків. Узагальнюючи результати з вивчення антибактеріальної активності протимікробних препаратів, що використовуються в клініках, відносно штамів бактерій, слід зазначити їх невисоку ефективність.

Відомо, що бактеріальні клітини мають дві форми існування: планктонну – вільно існуючі бактерії, обумовлює процес розповсюдження (дисемінації мікроорганізмів) та форму біоплівки, фіксовану до поверхні, яка є захистом бактеріальної спільноти від факторів зовнішнього середовища та одним з факторів патогенності мікроорганізмів. Тож, встановлено, що усі ізоляти були здатні формувати щільні біоплівки. Ці дані узгоджуються з результатами досліджень вчених медичного Південно-західного регіонального Оксфордського центру по догляду за ранами, які визначили, що біоплівки присутні в 70% відкритих ран і зазвичай спостерігали, що присутність бактерій при хронічних, відкритих ранах, таких як венозні та діабетичні виразки ніг тощо, присутні як континуум ранової інфекції від зараження через колонізацію до місцевої та системної інфекції, що може погіршуватися під впливом патологічних процесів, таких як венозна або артеріальна недостатність, діабет, пошкодження тиском або окультний злякисний процес. Вони довели, що наявність бактеріальних біоплівок на поверхні рани може стимулювати і збуджувати основну, невідповідну і надмірну запальну реакцію через стимуляцію нейтрофілів і макрофагів, викликаючи тривале вивільнення оксиду азоту, запальних цитокінів і вільних радикалів з уповільненням загоєння. Ця концепція допомагає пояснити, чому

деякі хронічні хірургічні рани не лікуються, часто з поверхневим ураженням шкіри, без класичних, клінічних ознак гострої інфекції і нездатність ідентифікувати мікроорганізми з рани [187].

У всьому світі останнім часом виникає занепокоєння підвищенням відсотку штамів бактерій з антимікробною резистентністю, що загрожує ефективній профілактиці та лікуванню постійно зростаючого кола інфекцій. Все більша кількість фахівців присвячує свої зусилля цій проблемі, яка є настільки серйозною, що загрожує досягненням сучасної медицини [150]. Тому частина наших досліджень була присвячена виявленню стійких до антибактеріальних препаратів штамів та встановлення їх полірезистентності. Отже, при визначенні чутливості до антимікробних препаратів було встановлено, що більшість ізолятів у планктонній формі були чутливі до цефалоспоринів (цефепім), фторхінолонів (гатіфлоксацин), карбапенемів (іміпенем). Але при визначенні чутливості ізолятів у формі біоплівки до антибактеріальних препаратів встановлено, що більшість ізолятів були полірезистентними до них.

Аналогічні дослідження були проведені щодо виявлення збудників полімікробних інфекцій та здатності до формування щільних біоплівок [154]. Так, наприклад, фахівцями виявлені ізоляти *S. aureus*, які були полірезистентними до протимікробних препаратів. При визначенні формування біоплівки авторами показано, що серед ізолятів були виявлені штами з щільними біоплівками. Тож, дослідники показали, що полірезистентні ізоляти *S. aureus* використовували біоплівкову модель існування для захисту та автори сподіваються на те, що такі дослідження є необхідними для розробки стратегій запобігання виникненню інфікування. Фахівці університету Гейдельберга [165] провели дослідження щодо розробки методу для тестування ефективності дезінфікуючих засобів на бактеріальні біоплівки, причому ними було теж обрано клінічні полірезистентні штами як тест-ізоляти для проведення тестування на здатність до формування біоплівки, але вони вивчали життєздатність

біоплівки за допомогою кінетичного аналізу метаболічної активності в біоплівках після впливу дезінфікуючого засобу для оцінки ефективності дезінфікуючого засобу. Авторами було зроблено висновок, що всі випробувані засоби були ефективними проти тестових ізолятів у планктонному стані, тоді як дезінфектанти були лише слабо ефективними проти бактерій у біоплівках. Тож, дослідження показує, що результати, отримані при тестуванні ефективності дезінфікуючих препаратів на планктонні бактерії, не можуть бути екстрапольовані для прогнозування ефективності дезінфікуючої дії на бактеріальних біоплівках клінічно значимих полірезистентних організмів, що узгоджується з нашими дослідженнями щодо тестування чутливості ізолятів до протимікробних препаратів у планктонній формі та у формі біоплівки.

Для оцінки ефективності дії світлодіодного випромінювання *in vitro* на збудники гнійно-запальних захворювань було розроблено пристрій. Як світловипромінюючі елементи використані світлодіоди з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 470 нм та 627 нм. Найближчим аналогом до запропонованої моделі обрано пристрій для екстракорпорального ультрафіолетового опромінення трансфузійних рідин [90], що містить штатив з вузлами кріплення джерела оптичного випромінювання та підставки для розміщення оброблюваного матеріалу. Зазначений пристрій передбачає розміщення на штативі принаймні одного встановленого вертикально джерела ультрафіолетового випромінювання, у верхнього краю якого встановлені принаймні два гакоподібні тримачі для кювет із стерильним трансфузійним розчином. Але відомий пристрій не забезпечує експериментального вивчення дії світлодіодного випромінювання на мікроорганізми – збудники гнійно-запальних процесів.

Було розроблено спосіб визначення впливу випромінювання фотонної матриці Коробова на здатність до формування біоплівок мікроорганізмами *in vitro*, що включає вимірювання оптичної щільності плівки, утвореної мікроорганізмами, збудниками гнійно-запальних процесів, на поверхні

комірок полістиролової панелі після інкубації інокуляту впродовж 18-24 години, відрізняється тим, що перед інкубацією інокульовані дослідні ізоляти розміщують у зону дії фотонної матриці Коробова та опромінюють протягом не менш ніж 15 хвилин, а потім за порівнянням оптичної щільності дослідних та контрольних сформованих біоплівки роблять висновок про ступінь плівкоутворення. Тобто цей спосіб відрізняється від існуючих тим, що для опромінення використовують фотонну матрицю Коробова, яка містить 24 світловипромінюючих елементів; для опромінення використовують світлодіоди з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 470 нм та 627 нм; інкубацію бактеріальної суспензії проводять протягом 18 годин з термостатуванням при температурі 37 °С у вологій камері.

Найбільш близьким аналогом до розробленої моделі за сукупністю ознак є спосіб, в якому процес формування біоплівки, утворених мікроорганізмами, збудниками гнійно-запальних процесів, вивчають за допомогою визначення здатності штамів бактерій до адгезії на поверхні 96-коміркової полістиролової панелі, шляхом вимірювання оптичної щільності плівки, утвореної на поверхні комірок після інкубації інокуляту протягом 18-24 години [87].

Для подальшого вивчення впливу світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів було відібрано полірезистентні штами *S.aureus*, *E.coli* та *P.mirabilis*, які найчастіше викликають гнійно-запальні процеси. Узагальнюючи дані, ми прийшли висновку, що при комплексній дії червоного світлодіодного випромінювання та цефепіму підвищується чутливість мікроорганізмів, що можна пояснити тим, що червоне світлодіодне випромінювання сприяє прискоренню експоненціального росту клітин, а бактерицидний ефект цефалоспоринів, зокрема цефепіму, реалізується тільки у процесі росту й розмноження мікроорганізмів [24]. При дії синього світлодіодного випромінювання та цефепіму спостерігається пригнічення росту мікроорганізмів, що можна пояснити синергізмом, який проявляється на тлі послаблення бар'єрної функції клітинних мембран, що

викликано впливом на них атомарних форм кисню за дії світлодіодного випромінювання синього спектра з одного боку та з другого - безпосередньої дії цефепіму на клітинну стінку бактерій, що й викликає біоінгібіцію (рис.6.1).



Рис. 6.1 Механізм антимікробної дії світлодіодного випромінювання та цефалоспоринів (цефепіму). ЦС – цефалоспорини, ССВ – синє світлодіодне випромінювання, ЧСВ – червоне світлодіодне випромінювання [24, 58, 85]

Обґрунтовуючи механізм антимікробної дії світлодіодного випромінювання та препаратів цефалоспоринового ряду (цефепіму) на підставі аналізу робіт провідних вчених світу [24, 44, 58, 80, 85] можна зробити висновок, що за дії синього світлодіодного випромінювання відбувається утворення реакційноздатних молекул: кисневих радикалів, синглетного кисню, атомарного кисню, що призводить до порушення

бар'єрної функції клітинної стінки бактерій з одного боку та внаслідок впливу цефепіму з механізмом дії на клітинну стінку бактерій – відбувається синергізм протимікробних ефектів синього світла та цефалоспоринових препаратів, тобто утворюється подвійний удар по клітинній стінці бактерії.

А за дії червоного світлодіодного випромінювання відбувається прискорення експоненціального росту клітин з наступним підвищенням бактерицидного ефекту цефепіму, що можливо тільки в умовах активної логарифмічної фази росту бактерій.

Що стосується здобутих результатів з вивчення дії антисептичних засобів на бактеріальні біоплівки та планктонні форми існування бактерій, то ці дані співставляються із дослідженнями, що були проведені Щербаковою Д.С. при вивченні дії антисептиків на бактеріальні біоплівки у пацієнтів з запальними захворюваннями пародонту, яка довела, що використані антисептики, а саме хлоргексидин, мультицид та ферментний препарат дезоксирибонуклеаза, показали високу активність по відношенню до мікробних біоплівок і викликали в них значне зниження числа КУО. Максимальне зниження кількості життєздатних бактерій зареєстровано в присутності хлоргексидину [146]. У наших дослідженнях показано, що посилити та подовжити дію хлоргексидину можливо за рахунок застосування світлодіодного випромінювання синього спектра, а пероксиду водню у комплексному застосуванні з світлодіодним випромінюванням червоного спектра, що підвищує ефективність локальної терапії.

У дисертаційній роботі Маланчук С.Г. [63] було встановлено, що найбільший біодеструктивний вплив мав фіолетовий спектр, який також призводив до зниження активності ферментів патогенності мікроорганізмів. В даній роботі було показано, що максимальне пригнічення утворення біоплівок, продукції планктонних клітин ізолятів відбувалось за використання світлодіодного випромінювання фіолетового спектра з левофлоксацином. Порівнюючи наші результати дослідження щодо доцільності використання світлодіодного випромінювання в складі

комплексної терапії ГЗЗ та дані дисертаційної роботи Маланчук С.Г. слід зазначити, що за даними Маланчук С.Г. доцільним є використання препарату фторхінолонового ряду в поєднанні з світлодіодним випромінюванням фіолетового спектра та катіонних антисептичних препаратів, що містять едетат натрію. Наші дослідження показали, що саме світлодіодне випромінювання синього спектра надає найбільшого бактерицидного ефекту в поєднанні з цефепімом та хлорвмісним антисептичним препаратом хлоргексидин. Порівнюючи ефективність впливу світлодіодного випромінювання різних спектрів можна зробити висновок про односпрямованість дії синього й фіолетового спектрів та червоного й помаранчевого спектрів: світлодіодне випромінювання синього та фіолетового спектрів надавало бактеріцидну дію на планктонну форму існування бактерій та деструктивний вплив на добові біоплівки ізолятів, а світлодіодне випромінювання червоного та помаранчевого спектрів – сприяло росту та розмноженню бактерій. В дисертаційній роботі Маланчук С.Г. надано особливості змін активності ферментів патогенності за впливу світлодіодного випромінювання фіолетового, зеленого та помаранчевого спектрів, але не було вивчено комплексне застосування світлодіодного випромінювання з антисептичними засобами *in vivo* та вплив світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів, які найчастіше застосовуються у клінічній практиці, на антибіотикорезистентні мікроорганізми, збудники ГЗЗ шкіри.

Доклінічні випробування впливу світлодіодного випромінювання та протимікробного препарату проводили на експериментальних тваринах. Ефективність комбінованої терапії із застосуванням синього та червоного світлодіодного випромінювання при локалізованій гнійно-запальній протейній інфекції оцінювали за ступенем загоювання осередку запалення. В результаті дослідження встановлено, що загоєння осередку запалення при лікуванні тільки цефепімом було зафіксовано на 12 добу. Комплексне застосування цефепіму і світлодіодного випромінювання виявило тенденцію

до більш швидкого загоєння осередку запалення - цефепім з червоним світлодіодним випромінюванням - на 9 добу, цефепім з синім світлодіодним випромінюванням - на 6 добу. Цефепім в поєднанні з червоним і синім світлом - на 5 добу. Реєструючи динаміку загоєння осередку запалення при локалізованій гнійно-запальній інфекції, можна зробити висновок про те, що найбільш оптимальною та раціональною, з точки зору швидкості загоєння вогнища запалення і витрати на лікування, є комбінація антимікробного препарату цефепіму та синього і червоного світлодіодного випромінювання на осередок запалення.

Дослідження термінів загоєння гнійно-запальних ран за лікування антибіотиками і електромагнітним випромінюванням проводили фахівці Саратівського державного медичного університету, які за допомогою панорамно-спектрометричного вимірювального комплексу застосовували електромагнітні коливання, що імітують структуру молекулярного спектра поглинання і випромінювання атмосферного кисню і оксиду азоту. Проведені експерименти свідчать, що опромінення на частоті молекулярного спектра поглинання і випромінювання оксиду азоту призводить до репарації тканин [109]. Але терміни загоєння вогнища запалення були надто довші, ніж при застосуванні запропонованої нами терапії. Треба відмітити той факт, що авторами спостерігався однаковий позитивний ефект при одночасному застосуванні електромагнітного випромінювання як з антибіотиком, що порушує синтез клітинної стінки (цефтазидим), так і з антибіотиком, інгібітором синтезу білка (амікацин). В нашому дослідженні здобуті результати з доведенням того, що світлодіодне випромінювання саме червоного спектра у комплексі з антимікробним засобом цефалоспоринового ряду значно прискорює елімінацію збудника з вогнища запалення та відновлення репаративних функцій за рахунок активації усіх ланок імунного статусу. Оцінку впливу локальної світлодіодної фототерапії на перебіг ранового процесу в експерименті було досліджено фахівцями Білоруського державного медичного університету [10], які показали у своїх

роботах, що локальне застосування неполяризованого світлодіодного випромінювання і лікарського засобу «мазь Фотолон» призводило до найбільш значимого зниження загального мікробного числа ранових біотопів в короткі терміни, а також завершення першої фази ранового процесу до 7 діб від початку експерименту. Використання локального фоторегуляторного впливу після закінчення фази запалення викликало стимуляцію ранових репаративних процесів з прискоренням контракції рани за рахунок активізації росту і дозрівання грануляційної тканини, а також посилення крайової епітелізації. Ними в умовах експерименту *in vivo* доведено, що використання локальної світлодіодної фототерапії з вибраними параметрами з урахуванням фази ранового процесу приводило до скорочення не менше ніж на 5 діб термінів загоєння гнійних ран, і ці дані, в основній концепції дослідження, узгоджуються з даними наших досліджень. Але нами показано, що саме комбінація червоного світлодіодного випромінювання з антисептичним препаратом пероксиду водню й синього спектра з хлоргексидином та системним введенням цефепіму призводить до ще більшого прискорення загоєння вогнища запалення, а саме на 7 діб.

Здобуті нами результати узгоджуються з даними колективу російських авторів, які спостерігали динаміку морфологічних показників за впливу електромагнітного випромінювання міліметрових хвиль, що відображає функціональні зміни в організмі лабораторних тварин. Вплив досліджуваного фактора сприяло активації компенсаторно-відновних процесів при загоєнні поверхні рани шкіри. У групі лабораторних тварин, яка піддавалася впливу власного відбитого випромінювання, спостерігалися виражені процеси епітелізації [3]. Але ці дослідження відрізняються експериментальними умовами дії фізичного фактору впливу та визначенням імунного стану та ферментативної активності. Авторами вивчено вплив електромагнітного випромінювання виключно на базофіли та на активність лужної фосфатази, стан та динаміку яких ми не досліджували.

Аналізуючи динаміку інтегральних показників фагоцитозу встановлено, що в групах піддослідних тварин, осередок запалення яких піддавали опроміненню синім світлодіодом показники практично не відрізнялися від групи тварин позитивного контролю. При комплексному впливі червоного та синього світлодіодного випромінювання на тлі лікування цефепімом – показники дорівнювали аналогічним групи інтактних тварин.

У відповідь на будь який антиген нейтрофіли активно формують у позаклітинному просторі сіткоподібні структури, що складаються з нуклеїнових кислот і ферментів і цей механізм захисту є альтернативним фагоцитозу. Даний феномен було досліджено групою вчених під керівництвом Долгушина І.І. [29]. Ними було виявлено механізм утворення нейтрофільних позаклітинних пасток та фактори, що стимулюють викид ДНК нейтрофілів в позаклітинне середовище, а також їх ролі в захисних реакціях. Авторами було розроблено та представлено оригінальні експрес-методи оцінки вмісту і антимікробної активності екстрацелюлярних пасток, утворених нейтрофілами в периферичній крові і мукозальних секретах. Ними представлені методи оцінки функціонального статусу нейтрофілів, нормативні показники стану нейтрофільної ланки периферичної крові і мукозальних секретів. Але ж вони не вивчали здатність до утворення NETs *in vivo* при локалізованому гнійно-запальному процесі та формування NETs за впливу різних спектрів світлодіодного випромінювання.

Тому вивчення впливу оптичного випромінювання синього та червоного спектрів на осередок запалення з визначенням активності фагоцитозу і процесу формування нейтрофільних позаклітинних пасток залишаються до кінця нез'ясованими і потребують подальшого дослідження.

При визначенні кількості антигенів в нейтрофілі та в NETs *in vivo*, було встановлено, що у інтактних тварин формування NETs не було зафіксовано. У групі інфікованих тварин виявлено зниження інтенсивності фагоцитарного процесу з різким підвищенням кількості антигенів в NETs. У групі інфікованих тварин, осередок запалення яких був опромінений синім

спектром світлодіодного випромінювання встановлено, що інтенсивність фагоцитозу й формування NETs достовірно не відрізнялося від групи інфікованих тварин. У групі інфікованих тварин, осередок запалення яких був опромінений червоним спектром світлодіодного випромінювання встановлено, що вміст антигенів в NETs підвищилась майже у 2 рази порівняно з групою інфікованих тварин. Самим оптимальним співвідношенням показників інтенсивності фагоцитарного процесу та активності утворення нейтрофільних пасток є група інфікованих тварин, лікування яких проводилося цефепімом, а осередок запалення яких був опромінений синім та червоним спектрами світлодіодного випромінювання у комбінації.

При вивченні стану імунітету було встановлено, що зміни клітинних факторів імунітету у інфікованих тварин відповідають процесам, характерним для гнійно-запальних процесів бактеріальної етіології в цілому: розвивається імунна відповідь, яка активована за гуморальною і супресована за клітинною ланкою.

Аналізуючи вплив комплексної терапії із застосуванням світлодіодного випромінювання слід зазначити, що в усіх групах з комплексною протимікробною терапією (6, 7 та 8 групи) зареєстровано відновлення клітинної ланки імунітету, найкращі показники фіксували у групах з опроміненням осередку запалення червоним та синім світлодіодами на тлі лікування цефепімом (8 група). Значне збільшення прозапальних цитокінів, що забезпечують мобілізацію імунної відповіді, обумовлено звільненням ендотоксину, це є важливим фактором розвитку запальної реакції. Різниця вмісту прозапальних інтерлейкінів, була достовірною в групах, де проводилася комплексна терапія із застосуванням цефепіму та червоного світлодіоду і цефепіму та червоного й синього світлодіоду. Таким чином, комплексне застосування синього й червоного світлодіодів з цефепімом купірують прозапальну реакцію й знімають антигенне навантаження.

При локалізованій гнійно-запальній протейній інфекції виявлено достовірне збільшення циркулюючих імунних комплексів в групі позитивного контролю та в групах з монотерапією і застосування світлодіодного випромінювання окремо. Паралельно з високим вмістом ЦК відмічалось зниження комплементарної активності, що може бути пов'язано з факторами агресії патогенів. Аналіз рівнів імуноглобулінів дозволив встановити, що показники сироваткового IgM та IgG були підвищені. При застосуванні комплексної терапії показники, що вивчалися дорівнювали таким групи негативного контролю (1 група).

Здобуті дані літератури показують різноспрямований вплив на фактори гуморальної відповіді й цитокінового балансу світлодіодного та лазерного випромінювання. Так, вплив низькоінтенсивного лазерного випромінювання на нейтрофіли і фактори мукозального імунітету було вивчено у дослідженнях Гизингер О.А. [22], де показано, що дія лазера низької інтенсивності з постійною і змінною генерацією імпульсу впливає на секреторний, бактерицидний і фагоцитарний потенціал нейтрофілів. Автором було виявлено односпрямований характер їх змін, які залежали від дози випромінювання і часу експозиції. Застосування внутрішньосудинного лазерного опромінення крові в комплексі з базисною антибіотикотерапією призводить до зниження абсолютного і відносного числа лейкоцитів, відновлення кількості і рецепторного пейзажу лімфоцитів, зниження лізосомальної активності, активності нейтрофілів по НСТ-тесту, зниження вмісту IgA, IgG, IgM і підвищення C1-C5 компонентів комплементу, підвищення концентрації ІЛ-1 β , ФНП- α і зниженні ІЛ-8.

Є кілька досліджень, які демонструють переваги малої потужності світлотерапії на загоєння ран [10, 11, 157, 182]. Однак використання світлодіодів як терапевтичного ресурсу залишається спірним та існують питання щодо рівності біологічних ефектів, які сприяють світлодіоди та лазери. Дослідниками Бразильського медичного федерального центру було проведено аналіз щодо прояву біологічних ефектів світлодіодів та лазера на

загоєння ран. Ними було встановлено, що світлодіодне та лазерне випромінювання сприяють подібним біологічним ефектам, таким як зменшення запальних клітин, посилення проліферації фібробластів, стимуляція ангиогенезу, формування грануляційної тканини і підвищення синтезу колагену. Параметри опромінення також подібні між LED і LASER. Ними було показано, що біологічні ефекти залежать від параметрів опромінення, переважно довжини хвилі і дози [157]. Наші результати щодо застосування світлодіодного випромінювання в комплексній антимікробній терапії локалізованої гнійно-запальної інфекції не суперечать твердженням бразильських вчених та розкривають важливість використання світлодіодного випромінювання у складі комбінованої з протимікробними засобами терапії.

Аналізуючи дані джерел літератури ми не знайшли жодної роботи щодо проведення імуноморфологічних досліджень за дії світлодіодного випромінювання, тому визначення імунного стану в органах імунної системи є актуальним. Здобуті результати щодо проведеного імуноморфологічного дослідження свідчать про розвиток гнійно-запальної інфекції, що підтверджується вираженими дистрофічними і дегенеративними змінами строми і паренхіми, поширеним інтерстиціальним запаленням з залученням паренхіматозних структур, альтеративно-продуктивними процесами в судинах внутрішніх органів. Відзначено внутрішньосудинну фіксацію CD18 нейтрофілів до поверхні. В периферичних органах імунної системи виявлено гіперплазію як Т- , так і В - зон на тлі вираженої макрофагальної реакції, посилену плазматизацію і значну активацію прозапальних інтерлейкінів.

Подібна закономірність з боку місцевої імунної реакції виявлена і в інтерстиції серця, нирок і печінки, де спостерігалася виражена макрофагальна реакція, посилена плазматизація і активована цитокінова прозапальна система. При застосуванні синього та червоного світлодіодного випромінювання морфологічні зміни у внутрішніх органах характеризуються зниженням ступеню вираженості запально-проліферативних процесів і

дисциркуляторних розладів у стромі і судинах, зменшенням вираженості альтеративних змін в паренхіматозних структурах, із збереженням гіперпластичних процесів в імунокомпетентних тканинах.

При комплексному використанні цефепіму та оптичного випромінювання комбінованого червоного і синього спектрів морфологічна картина в паренхіматозних органах характеризувалася значним зниженням ступеня вираженості запальних процесів в стромі паренхіматозних органів, зменшенням вираженості дистрофічних і дисциркуляторних порушень. В селезінці, як органі імунної системи, спостерігалися ознаки нормалізації її морфофункціонального стану. Отже, при наявності в організмі вогнищевого гнійного запалення запропонована комплексна терапія попереджає розвиток генералізації процесу, сприяє посиленню репаративних можливостей організму.

Таким чином, при локалізованій гнійно-запальній інфекції шкіри з метою підвищення ефективності лікувальної тактики доцільним є виділення збудника, встановлення рівня антибіотикочутливості, тестування ізолятів на здатність до біоплівкоутворення; адекватність антибактеріальної терапії: її режим і своєчасність.

З метою діагностики і оцінки імунного статусу доцільним є встановлення фагоцитарної активності нейтрофілів та функціональної активності екстрацелюлярних позаклітинних пасток, визначення основних показників клітинної й гуморальної ланок імунітету та цитокінового статусу.

Список опублікованих праць за розділом: [17].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено актуальну наукову задачу – доведено *in vitro* та *in vivo* чутливість збудників гнійно-запальних захворювань шкіри у планктонній і біоплівковій формі існування до комплексної дії антимікробних препаратів і світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів. Визначено домінуючі збудники гнійно-запальних захворювань шкіри, їх здатність утворювати біоплівки, а також показано множинний характер їх стійкості до антибіотиків. Визначено *in vitro* найбільш активні, щодо збудників гнійно-запальних захворювань шкіри, комбінації антимікробних препаратів із світлодіодним випромінюванням певного спектру. Доведено, із встановленням окремих механізмів дії, ефективність цих комбінацій *in vivo*.

1. Встановлено, що домінуючими збудниками гнійно-запальних захворювань шкіри у обстежених дітей були *S. aureus*, *E. coli* та *Proteus spp.*, доля яких складала 36,4, 17,4 та 14,7 % відповідно.
2. Показано, що 83,6 % досліджуваних штамів *S. aureus*, 76,2 % – *P. mirabilis* та 50,0 % – *E. coli* були резистентними до 4 і більше антибіотиків, що свідчить про множинний характер стійкості до антимікробних препаратів і необхідність розробки нових підходів до антимікробної терапії гнійно-запальних захворювань шкіри.
3. Встановлено, що 100 % досліджуваних штамів *in vitro* утворювали біоплівки, стійкі до дії антимікробних препаратів.
4. Розроблено спосіб визначення впливу світлодіодного випромінювання на планктонні та біоплівкові форми існування мікроорганізмів, що базується на вимірюванні оптичної щільності плівки, утвореної збудниками гнійно-запальних захворювань шкіри на поверхні полістиролової панелі, дозволяє підбирати дози випромінювання, спектр та експозицію для визначення оптимального ефекту дії на осередок запалення.

5. Встановлено, що найвищу антимікробну активність проявляють комбінації пероксиду водню й світлодіодного випромінювання червоного спектра, а також хлоргексидину й світлодіодного випромінювання синього спектра. Використання цих комбінацій призводить до пригнічення утворення планктонних клітин від 1,2 до 3 разів та формування біоплівки від 4,1 до 8,2 разів порівняно з використанням лише вказаних антисептиків.
6. Показано, що комплексне застосування світлодіодного випромінювання червоного та синього спектрів й цефепіму при локалізованій гнійно-запальній інфекції шкіри скорочує терміни загоювання осередку запалення на 7 діб порівняно із застосуванням тільки цефепіму, що опосередковано вказує на елімінацію збудників з вогнища інфекції і підтверджує ефективність такої комплексної протимікробної терапії.
7. Експериментально показано, що при розвитку локалізованої гнійно-запальної інфекції шкіри відбувається достовірне зниження кількості субпопуляцій Т-лімфоцитів з маркерами диференціації CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD11⁺, CD18⁺, підвищення кількості В-лімфоцитів CD22⁺, концентрації IL-1 β та TNF- α , як в сироватці крові, так й у тканинах; виявлено внутрішньосудинну фіксацію CD18 нейтрофілів до поверхні ендотелію судин, гіперплазію Т- і В - зон на тлі вираженої макрофагальної реакції в периферичних органах імунної системи. Після застосування запропонованої терапії встановлено відновлення імунних показників.
8. Доведено *in vivo*, що прискорення репаративних процесів некротичного осередку за комплексного впливу світлодіодного випромінювання червоного спектра пов'язано з підвищенням активації фагоцитозу у 1,9 рази й підвищенням кількості антигенів в нейтрофільних позаклітинних пастках у 1,6 рази, а за дії синього спектра – з пригніченням формування біоплівки мікроорганізмами.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Метод, заснований на опроміненні осередку запалення світлодіодним випромінюванням з довжиною хвилі від 440 до 480 нм (синій спектр) та від 620 до 740 нм (червоний спектр) показаний для застосування в практиці лікування поверхневих ГЗЗ шкіри.
2. Рекомендовано проводити лікування хворих з локалізованими ГЗЗ шкіри, використовуючи світлодіодне випромінювання синього та червоного спектрів у складі комплексної терапії місцево, дистанційно із проміжком між поверхнею матриці і рановою поверхнею до 10 мм, стабільно. Параметри випромінювання: потужність - 25 мВт/см; доза – 300 Дж/см; режим безперервний, час експозиції - 5 хв. на вогнище ураження.
3. Для загоєння осередку запалення рекомендується застосовувати:
 - антисептик хлоргексидин (обробити осередок запалення) з наступним опроміненням синім спектром світлодіодного випромінювання 5 хв.;
 - антисептик перексид водню з наступним опроміненням червоним спектром світлодіодного випромінювання 5 хв.;
4. Для прискорення процесів регенерації і більш повного і рівномірного загоєння вогнища запалення показано призначення світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів (по черзі) в поєднанні з антисептичними засобами та протимікробними препаратами (цефепімом).
5. Протипоказаннями до застосування світлодіодного випромінювання хворих на ГЗЗ шкіри є загальні протипоказання до застосування фізіотерапії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Автандилов Г. Г. Основы патологоанатомической практики. Изд. 2-е. М.: РМАПО, 1998. 543с.
2. Аметистов Е. В., Дмитриев А. С., Зродников В. С, Запорожцева З. В., Подсосонный В. А. Фотоинактивация бактерий монохроматическим синим светом. *Альманах клинической медицины*. 2006. №12. С.6.
3. Афанасев Р. В. Исследование влияния микроволн миллиметрового диапазона на заживление раневой поверхности экспериментальных животных: рабочие материалы о научно-исследовательской работе. МО РФ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины. М., 2009. 39 с.
4. Бабич Є. М., Калініченко С. В., Скляр М. І., Мироненко Л. Г., Перетятко О. Г., Рижкова Т. А. Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин. *Лабораторна діагностика*. 2007. №. 3 (41). С. 58-61.
5. Батраков А. В., Кирьянова В. В., Васильев А. В. Применение светодиодного излучения (470нм) в комплексном лечении больных фурункулами лица: уч. пос. СПб.: Человек, 2011. 32 с.
6. Біляєва О. О., Кароль І. В., Філоненко Г. В., Крижевський Є. Є. Особливості видового складу збудників гнійно-запальних захворювань м'яких тканин. *УКР. МЕД. ЧАСОПИС*, 10 травня 2017 URL: <https://www.umj.com.ua/>
7. Білько І. П. Вимоги до взяття та доставки матеріалу для мікробіологічних досліджень. *Сучасні інфекції*. 2001. № 3. С.106–109.
8. Булига Л. О., Черних В. П., Штриголь С. Ю., Мовчан Б. О., Бутко Я. О. Експериментальне дослідження ранозагоювальної дії гелю з наночастками срібла та глюкозаміном. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2015. № 2. С. 49-54.

9. Буравский А. В., Баранов Е. В., Скороход Г. А. Светодиодное излучение: результаты антимикробного фотодинамического воздействия в эксперименте *in vitro*. *Новые технологии в медицине*. 2014. № 4. С.80-86.
10. Буравский А. В., Баранов Е. В., Третьяк С. И., Недзьведь М. К. Оценка влияния локальной светодиодной фототерапии на лечение раневого процесса в эксперименте. *Новости хирургии*. 2015. Т. 23, № 6. С. 601-611.
11. Буравский А. В. Локальная светодиодная фототерапия в комплексном лечении пациентов с раневыми дефектами кожи и мягких тканей (экспериментально-клиническое исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.17. Минск, 2016. 24 с.
12. Бурковський М. І., Чорнопищук Р. М., Гончаренко О. В., Скальський С. С., Арженкова К. Б. Зміни цитологічної картини раневого вмісту на тлі місцевого застосування комбінації препаратів Ліастен та Левомеколь у хворих з гнійними ранами. *Український журнал малоінвазивної та ендоскопічної хірургії*. 2016. Vol. 20, № 1. С. 27-31.
13. Винник Ю. С., Маркелова Н. М., Тюрюмин В. С. Современные методы лечения гнойных ран. *Сибирский медицинский обозреватель*. 2013. С.18-24.
14. Владимиров Ю. А., Осипов Ю. А., Клебанов Г. И. Фотобиологические основы терапевтического применения лазерного облучения. *Биохимия*. 2004. Т.69. Вып.1. С.103-110.
15. Вознесенский Н. А. Биопленки – терапевтическая мишень при хронических инфекциях. *Пульмонология и аллергология*. 2008. №3. С.56-64.
16. Воробей Є. С., Воронкова О. С., Вінніков А. І. Вплив стафілококового бактеріофагу на біоплівки штамів *Staphylococcus aureus* чутливих і резистентних до цефотаксиму та азитроміцину залежно від хімічного складу їх матриксу. *Вісник проблем біології і медицини*. 2016. Вип. 1(1). С. 249-253.
17. Вплив світлодіодного випромінювання та протимікробних препаратів на мікроорганізми, збудники гнійно-запальних локалізованих процесів, і на стан фагоцитарної активності нейтрофілів: колективна монографія /М. М. Мішина, В. В. М'ясоєдов, Н. І. Філімонова, А. М. Коробов, М. М. Попов,

- О. С. Дубовик, С. Г. Маланчук, М. О. Ляпунов, О. В. Наумова. Харків: ХНМУ, 2014. 152 с.
18. Всемирная организация здравоохранения. Женева, 27 февраля 2017 г. URL: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/ru/>.
19. Галкін М. Б. Формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* за присутності вісмуткових комплексів порфіринів: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Національна академія наук України, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного. Київ, 2013. 20 с.
20. Галкін М. Б. Динаміка формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* PA01 за наявності вісмуткового комплексу мезо-тетра (4-п-метил-піридил) порфірину. *Вісник Львівського університету*. Серія біологічна. 2016. Вип. 71. С. 206-214.
21. Галкін М. Б., Іваниця В. О., Галкін Б. М., Філіпова Т. О. Матрикс біоплівки – хімічний склад, структура, властивості. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2016. № 4. С. 6-27
22. Гизингер О. А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы и факторы мукозального иммунитета: автореферат дис. ... д-ра. биол. наук: 14.03.09 / Челяб. гос. мед. акад. Челябинск, 2010. 39 с.
23. Гинюк В. А., Рычагов Г. П., Попков О. В., Новиков С. В., Бовтюк Н. Я. Применение светодиодной фоторегуляторной и фотодинамической терапии при лечении острого парапроктита. *Военная медицина*. Минск, 2015. № 3. С. 106-107.
24. Горчакова Н. А. Клиническая фармакология антибиотиков группы цефалоспоринов. *Український медичний вісник*. 2008. №5 (26): URL: <http://therapia.ua/therapia/2008/05/klinicheskaya-farmakologiya-antibiotikov-gruppy-tsefalosporinov>.
25. Грузина В.Д. Коммуникативные сигналы бактерий. *Антибиотики и химиотерапия*. 2003. №48 (10). С.32-39.

26. Данилов П. В., Жиганов К. В., Пронин А. В. Использование ионизирующих излучений в промышленности, медицине и других областях. *Молодой ученый*. 2016. №23. С.40-44. URL: <https://moluch.ru/archive/127/35037>
27. Дейнеко А.С., Вовк В.А., Олейник В.А. Применение аппарата «Фотонная матрица Коробова «Барва-Флекс» в условиях отделения интенсивной терапии. *Применение лазеров в медицине и биологии: материалы юбилейной XX Международной научно-практической конференции (Ялта, 8-11 октября 2003 г.)*. Харьков: НПМБК «Лазер и здоровье», 2003. С.20.
28. Деркач С. А. Мікробіологічні аспекти лікування гнійно-запальних захворювань. *Інфекційні хвороби*. 2015. № 4. С. 5-15. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/InfKhvor_2015_4_3.
29. Долгушин И. И., Андреева Ю. С., Савочкина А. Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов: монография: Москва: РАМН, 2009. 208 с.
30. Дубовик Е. С., Коробов А. М., Наумова О. В., Мишина М. М., Мозговая Ю. А., Мишин Ю. М. Морфологические особенности экспериментального гнойно-некротического локализованного процесса под воздействием синего и красного светодиодного излучения. *Научные Ведомости БелГУ. Медицина. Фармация*. Белгород, 2013. № 4 (147). Вып.21. С.128-133.
31. Дубовик О. С., Наумова О. В., Коробов А. М., М'ясоєдов В. В., Мішина М.М. Вплив світлодіодного випромінювання та протимікробних засобів на морфологічний стан тканин при локалізованому гнійно-запальному процесі. *Вісник проблем біології і медицини*. 2014. В.1 (106). С.246-251.
32. Дубовик О. С., Мішин Ю. М., Аус. з. Абд. Аль. Здатність до плівкоутворення ізолятів *Proteus spp.* під впливом електромагнітного випромінювання оптичного діапазону. *Медицина третього тисячоліття: тези доповідей міжвузівської конференції молодих вчених та студентів (Харків, 17-18 січня 2012 р.)*. Харків, 2012. С.7-8.

33. Дубовик О. С., Мішина М. М. Вплив світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів на імуноцитокіновий стан при гнійно-запальних процесах (експериментальне дослідження). *Український журнал медицини, біології та спорту*. Миколаїв, 2017. №4 (6). С.13-19.
34. Дубовик О. С., Сорокіна І. В., Мішина М. М., Наумова О. В. Імуноморфологічні особливості при експериментальному гнійно-запальному процесі, спричиненому *P.mirabilis*. XV з'їзд Товариства мікробіологів України ім.С.М.Виноградського (м. Одеса, 11-15 вер. 2017 р.). Одеса, 2017. С.190.
35. Дубовик О. С., Мішина М. М., Коробов А. М. Комбінована дія оптичного випромінювання синього й червоного спектрів та антисептичних препаратів на здатність до формування біоплівки ізолятами *Proteus mirabilis*. *Український журнал медицини, біології та спорту*. Миколаїв, 2018. Т.3, №1(10). С.253-257.
36. Дубовик О. С., Мішина М. М., Коробов А. М. Оцінка впливу світлодіодного випромінювання на чутливість збудників гнійно-запальних процесів до протимікробних препаратів. *Український журнал медицини, біології та спорту*. Миколаїв, 2018. Т.3, №2(11). С.232-236.
37. Дубовик О. С., Мішина М. М., Маланчук С. Г., Кузьменко А. М. Чутливість до антибактеріальних препаратів мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних процесів. *Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю* (м.Чернівці, 29 січня 2018 р.). Чернівці, 2018. С.43-45.
38. Журавлев В. А., Микулинский Н. А., Бондар В. Н. Светолечение в практике курортного врача. *Применение лазеров в медицине и биологии: материалы XXVII Международной научно-практической конференции* (г. Харьков, 18-21 апреля 2007 г.). Харьков: НПМБК «Лазер и здоровье», 2007. С.18-19.

39. Зеленый В. М., Гопций С. А., Колупаева Т. В. Опыт применения фототерапии в гастроэнтерологии и пульмонологии. *Применение лазеров в медицине и биологии: материалы XVII Международной научно-практической конференции* (г. Харьков, 21-23 мая 2002 г.). Харьков: НПМБК «Лазер и здоровье», 2002. С.32-33.
40. Земляная О. В., Кас И. В. Об использовании света на различных этапах восстановительного лечения. *Применение лазеров в медицине и биологии: материалы XXVII Международной научно-практической конференции* (г. Ялта, 12-16 октября 2004 г.). Харьков: НПМБК «Лазер и здоровье», 2007. С.18-19.
41. Іваниця В. О., Галкін М. Б. Сучасні уявлення щодо механізмів формування біоплівки. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2011. №2. С.8-22.
42. Именков А. Н. Гребенщикова Е. А., Журтанов Б. Е., Данилова Т. Н., Сиповская М.А., Власенко Н. В., Яковлев Ю. П. Свойства светодиодов на основе GaSb с сетчатыми омическими контактами. *Физика и техника полупроводников*. 2004. Т. 38. Вып. 2. С.1399–1407.
43. Иммунологические методы исследований. Швейцария. Базельский ин-т иммунологии/ ред. И. Лефковитса, П. Пернуса: пер. с англ. М.: Мир, 1988. 527 с.
44. Инюшин В. М. О некоторых причинах биологической эффективности монохроматического света лазера красной части спектра. *О биологическом действии монохроматического красного света*. Алма-Ата, 1967. С.93.
45. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов человека с помощью панели моноклональных антител. Филатов А.В., Багурин П.С., Маркова Н.А. [и др.]. *Гематология и трансфузиология*. 1990. №1. С. 16-19.
46. Ищук А. В., Леонович С. И. Использование фотодинамической терапии лазерным аппаратом «Родник-1» с фотосенсибилизатором «Хлорофиллипт» в лечении гнойных ран и трофических язв нижних конечностей. *Новости хирургии*. 2008. № 1. С. 44-54.

47. Кабанова А. А., Походенько-Чудакова И. О., Плотников Ф. В. Способы воздействия на микробные биопленки. Современное состояние вопроса. *Вісник проблем біології і медицини*. 2015. Вип. 4(2). С. 20-24. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vpbm_2015_4%282%29__5.
48. Калінін Є. С., Луньова В. А. Застосування низькоінтенсивного червоного випромінювання світлодіодів у комплексному лікуванні невралгії язичного нерва. *Фотобіологія та фотомедицина*. 2015. Т.12, №1,2. С.15-18.
49. Кащик О. О., Воронкова О. С., Вінніков А. І. Фагочутливість стафілококів у біоплівці. *Вісник проблем біології і медицини*. 2015. Вип. 4(2). С. 278-281.
50. Кенжекулов К. К. Новые подходы к лечению гнойных ран. *Современная медицина: актуальные вопросы*: материалы. LIV-LV междунар. науч.-практ. конф. № 4-5(49). Новосибирск: СибАК, 2016. С. 114-121.
51. Ковальчук В. П., Кондратюк В. М., Трофіменко Ю. Ю. Результати порівняльного дослідження чутливості до антисептиків плівкових та планктонних форм бактерій. *Biomedical and Biosocial Antropology*. 2014. №22. С. 82-85.
52. Кондратюк В. М., Ковальчук В. П., Безулий М. М., Фомін О. О. Характеристика здатності до утворення біоплівок мікрофлори вогнепальних та мінно-вибухових ран кінцівок. *Biomedical and biosocial anthropology*. 2016. №26. С. 20-23.
53. Корнева Э. Г. Применение полистироловых пластин при определении чувствительности бактерий к антибиотикам. *Лабораторное дело*. 1987. №9. С. 709 -710.
54. Коробов А. М. Новая техника для новейших технологий светотерапии. *Применение лазеров в медицине и биологии*: материалы юбилейной XX Международной научно-практической конференции (г. Ялта, 8-11 октября 2003 г.). Харьков: НПМБК «Лазер и здоровье», 2003. С.114-117.

55. Коробов А. М., Коробов В. А. Персональные аппараты для светолечения – новое направление в медицинской технике. *Проблемы физической биомедицины*. Саратов, 2003. С.53-65.
56. Коробов А. М., Коробов В. А., Лесная Т. А. Фототерапевтические аппараты Коробова серии «Барва». Харьков: ИПП «Контраст», 2008. 176 с.
57. Клименко Н. А., Перин В. А. Роль опиоидных к-рецепторов в реакции тучных клеток очага воспаления. *Експериментальна і клінічна медицина*. 2010. № 4. С. 10-13.
58. Краева Л. А., Григорьев О. В., Кунилова Е. С., Баулин Д. А. Изменение биологических свойств микроорганизмов под влиянием инфракрасного излучения низкой интенсивности. *Инфекция и иммунитет*. 2016. Т. 6., № 3. С.51.
59. Лаврушина Е. Е., Топурия Г. М. Применение светодиодного излучения для лечения термических ожогов. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2010. № 2 (26). С. 71-73.
60. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико – биологических исследованиях с использованием Excel. Киев: МОРИОН, 2000. 320 с.
61. Леонтьева А. В., Воронкова О. С., Вінніков А. І. Чутливість до антибіотиків грамнегативних бактерій – збудників ускладнень ранових поверхонь. *Вісник проблем біології і медицини*. 2016. Вип. 1(2). С. 163-167. URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vpbm_2016_1\(2\)__35](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vpbm_2016_1(2)__35).
62. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир, 1960. 648 с.
63. Маланчук С. Г. Вплив світлодіодного випромінювання з протимікробними препаратами на фактори патогенності *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli*: дис. ... канд.біол.наук: 03.00.07 / Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України. Київ, 2015. 188 с.

64. Марієвський В. Ф., Бубало В. О., Кролевецька Н. М., Рубан Н. М., Дяченко О.П., Матошко Г. В. До питання про чутливість: стійкість біоплівки сальмонел до дії дезінфектантів. *Запорожский медицинский журнал*. 2013. №5. С.80–83.
65. Марієвський В. Ф., Бубало В. О. Визначення чутливості сальмонел в біоплівках до дії хімічних дезінфектантів. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2013. Т. 13, Вип. 4. С. 133-136.
66. Маслакова Н. Д., Могилевец Э. В., Савосик А. Л. [и др.]. Результаты применения нового метода комбинированной и антимикробной фотодинамической терапии в хирургии гнойных ран. *Военная медицина*. 2016. № 3. С. 60-63.
67. Методика статистической обработки медицинской информации в научных исследованиях /В.П. Осипов, Е.М. Лукьянова, Ю.Г. Антипкин [и др.]. К.: планета людей, 2002. 200 с.
68. Методические указания по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинико-диагностических лабораториях / Приложение I к Приказу Министерства здравоохранения № 535 от 22 апреля 1985 г. 123 с.
69. Михайлова Е. С., Червинец Ю. В. Способность к формированию биопленок у микроорганизмов, выделенных из верхних отделов ЖКТ больных хроническим холециститом и ЖКБ. *Успехи современного естествознания*. 2009. №7. С. 5-9.
70. Мишина М. М. Комбинированное действие антимикробных средств и иммуномодуляторов при протейной инфекции (экспериментальное исследование): дис. ...канд. мед. наук:03.00.07 / Харьк. нац. мед. ун-т. Харьков, 2004. 240 с.
71. Мішина М. М. Визначення впливу світлодіодного випромінювання синього й фіолетового спектрів на біоплівки *pseudomonas aeruginosa*. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2015. Т. 15, Вип. 3(1). С. 204-207.

72. Мокиенко А. В. Биопленки госпитальных экосистем: от инфекции до бактериоциногении. *Профілактична медицина*. 2013. № 3-4. С. 102-108. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Pmed_2013_3-4_19.
73. Мошкевич И. Р. Микробные биопленки при смешанных инфекциях: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Гос. мед. ун-т им. акад. И. П. Павлова. Санкт-Петербург, 2007. 27 с.
74. Наказ МОЗ України № 167 від 05.04.2007 року «Про затвердження методичних вказівок "Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів"». 56с.
75. Наказ МОЗ України № 236 від 04.04.2012 року «Про організацію контролю та профілактики післяопераційних гнійно-запальних інфекцій, спричинених мікроорганізмами».
76. Назарчук О. А., Палій В. Г., Гончар О. О., Олійник Д. П., Назарчук Г. Г., Палій І. Г. Мікробіологічна оцінка ефективності сучасних антисептиків, антимікробних матеріалів. *Клінічна фармація*. 2014. Т. 18, № 4. С. 8-11.
77. Назарян Р. С., Філімонова Н. І., Спірідонова К. Ю. Фотодинамічна інактивація інфекційних агентів зубного нальоту. *Профілактична та дитяча стоматологія*. 2016. № 1. С. 4-7.
78. Огоновський Р. З. Можливість корекції експериментального інфікованого ранового процесу локальною терапією гелем композиційної суміші похідних γ -кроднолактону та Zn-карнозину. *Медицина транспорту України*. 2013. № 3. С. 22-28.
79. Овнанян К. О., Трчунян А. А. Ультраструктурная архитектура межклеточных контактов в биопленках бактерий *in vivo* и *in vitro*. *Национальная академия наук Армении*. 2009. № 1. С.78 – 85.
80. Павлов А. В. Изменчивость биологических свойств золотистого стафилококка под влиянием оптического излучения: дис. ... канд. биол. наук: 16.00.03 / Новосибирск, 2005. 168 с.
81. Пальчун В. Т. Лапченко А. С., Лапченко А. А. [и др.]. Современный взгляд на антимикробную фотодинамическую терапию. *Вестник*

оториноларингологии. 2007. № 3. С. 4-6.

82. Панас М. А. Вплив низькоінтенсивного лазерного випромінювання на умовно-патогенні мікробні симбіонти ротової порожнини: автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.00.07 / Вінниц. нац. мед. ун-т ім. М. І. Пирогова. Вінниця, 2015. 20 с.

83. Пантьо В. В. Коваль Г. М., Пантьо В. І. Вплив низькоінтенсивного лазерного випромінювання на антибіотикочутливість мікроорганізмів – збудників гнійно-запальних захворювань. *Biomedical and biosocial anthropology*. 2016. №26. С.33-37.

84. Паршиков В. В., Чеботарь И. В., Ходак В. А., Самсонов А. А. Исследование *in vitro* микробной биопленки на поверхности синтетических макропористых эндопротезов для пластики брюшной стенки. *Современные технологии медицине*. 2012. №1. С.15-20.

85. Пат. RU № 2316366, С2. Способ фотодинамической инактивации бактерий/ В. С. Зродников, З. В. Запорожцева, В. А. Подсосонный. Заявл.2006103639/14, 08.02.2006; опубл.10.02.2008, Бюл.№4.

86. Пат. UA № 62515, G09B23/28. Спосіб моделювання локалізованої нійно-некротичної протейної інфекції / А. Я. Циганенко, М. М. Мішина, П. В. Оветчин. Заявл.07.04.2003; опубл.15.12.2003. Бюл.№12.

87. Пат. UA № 47944, G09B 23/00. Спосіб відтворення біоплівок мікроорганізмів *in vitro* / А. Я. Циганенко, М. М. Мішина, Р. А. Курбанов. Заявл.12.10.2009, № u200910353; опубл. 25.02.2010, Бюл. № 4.

88. Пат. RU № 2018830, G01N 33/48. Способ диагностики эффективности фототерапии/ Т. А. Яхно; Н. Д. Гладкова, В. Ф. Новиков, М. Б. Шибалова. Заявл. 4744495/14 11.07.1989; опубл. 30.08.1994.

89. Пат. RU № 2457254, С12Q 1/04, С12N 13/00. Способ оценки эффективности антимикробного воздействия антибиотиков и ультразвукового излучения на патогенные бактерии, существующие в форме биопленки / И. С. Сазыкин, М. А.Сазыкина, В. А.Чистяков, В. С. Лысенко. Заявл: 2011106708/10, 22.02.2011 опубл. 27.07.2012.

90. Пат. UA 5464, МПК' А61М 5/00. Пристрій для екстракорпорального ультрафіолетового опромінення трансфузійних рідин / А. В. Дем'яненко, В. В. Дем'яненко, А. Д. Беденюк; заявник та патентовласник Тернопільська державна медична академія ім. І .Я. Горбачевського. №20040604730; заявл.16.06.2004; опубл. 15.03.2005, Бюл. № 3.
91. Пат. 2141532, МПК' С12Q 1/01, С12Q 1/24, С12N 13/00. Способ определения динамики изменчивости микроорганизмов / Н. Т. Понкратова, Н.М. Колычев № 98100383/13; заявл. 06.01.1998; опубл. 20.11.99, Бюл. №32.
92. Пат. 71826 Україна, МПК' А61В 17/00. Спосіб лікування ушкоджень гомілковостопних суглобів (варіанти) та пристрій для його виконання (варіанти) /Д.Д. Бітчук, О.В. Камінський, А.М. Коробов [та ін.]; №20031212947; заявл. 30.12.2003; опубл. 15.12.2004, Бюл.№12.
93. Пат. 2090224, МПК' А61N 5/06. Физиотерапевтический аппарат / В. Н. Дирин, В. П. Сушко. № 96123316/14; заявл. 16.12.1996; опубл. 20.09.1997.
94. Пат. UA № 80293 U, МПК' G09В 23/28, С12N 13/00, А61N 5/06. Спосіб визначення впливу випромінювання фотонної матриці Коробова на формування біоплівок мікроорганізмів *in vitro*/ А. М. Коробов, А. Я. Циганенко, М. М. Мішина, О. С. Дубовик; заявник та патентовласник ХНУ ім.В.Н.Каразіна. № u201212578; заявл.05.11.2012; опубл. 27.05.2013, Бюл. №10.
95. Пат. UA № 80355 U, МПК' С12N 13/00, А61N 5/06. Пристрій для впливу оптичного випромінювання *in vitro* на патогенні бактерії/ А.М.Коробов, А. Я. Циганенко, М. М.Мішина, О. С. Дубовик; заявник та патентовласник ХНУ ім.В.Н.Каразіна. - № u201213663; заявл.29.11.2012; опубл. 27.05.2013, Бюл. №10.
96. Першин Г. Н. Методы экспериментальной химиотерапии: практическое руководство. М.: Медицина, 1971. 539 с.
97. Петренко О.М. Роль біоплівок патогенних мікроорганізмів в хронізації ран при синдромі діабетичної стопи. Зб. наук. праць співробіт. НМАПО імені П.Л.Шупика. 2015. В. 24 (1). С.85-91.

98. Пертенко О. М., Безродний Б. Г., Бондарчук О. Л. Вивчення здатності збудників флегмон м'яких тканин до формування біоплівок. *Хірургія України*. 2016. №1. С.85-89
99. Пирс Э. Гистохимия (теоретическая и прикладная). М.: Иностранная литература, 1962. 962 с.
100. Покас О. В. Формування біоплівок клінічними штамами умовно-патогенних мікроорганізмів, виділених з різного біологічного матеріалу. Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика. 2013. Вип. 22 (2). С. 342-348.
101. Покас О. В. Поліщук О. І., Каневський В. О., Фільчаков І. В. Вплив лазерного опромінення на структуру біоплівки *Pseudomonas aeruginosa*. *Профілактична медицина*. 2012. № 2 (18). С.36-41.
102. Польовий В. П., Польовий В. П., Сидорчук Р. І., Білик І. І., Кнут Р. П., Харі П. Застосування фототерапії некогерентним світлом для санації очеревинної порожнини при гострому перитоніті. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія*. 2012. Т.11, №3. С.98-99.
103. Потапчук А.М., Рак Ю. В., Мельничук Н. І., Миня О. Й. Використання лазерного випромінювання для дезінфекції корневих каналів, інфікованих *Enterococcus faecalis*: стадія in vitro. *Новини стоматології*. 2015. № 1. С. 48-52.
104. Попов М. М., Мішина М. М., Маланчук С. Г., Козлов О. П. Комплексна дія світлодіодного випромінювання та антисептичних препаратів, що містять Динатрію едетат, на добові біоплівки клінічних штамів *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomedical and biosocial anthropology*. – 2016. №26. С. 37-41.
105. Попов М. М., Маланчук С. Г., Філімонова Н. І., Мішина М. М., Коробов А. М., Ляпунов М. О. Комплексна дія світлодіодного випромінювання та антисептиків, що містять динатрію едетат, на добові біоплівки *E. coli*. *Український біофармацевтичний журнал*. 2014. № 5. С. 74-78.

106. Попов М. М., Маланчук С. Г., Мішина М. М., Коробов А. М. Оцінка впливу оптичного випромінювання й антибактеріальних препаратів на здатність до формування біоплівки *S.aureus* та *E.coli*. *Фотобіологія та фотомедицина*. 2014. Т. 11, № 1-2. С. 81-85.
107. Попов М. М., Коробов А. М., Маланчук С. Г., Філімонова Н. І., Мішина М. М., Мішин Ю. М. Дія антимікробних препаратів і світлодіодного випромінювання на добові біоплівки *S. aureus* та *E. Coli*. *Клінічна фармація*. 2014. Т. 18, № 4. С. 52-57.
108. Попов М. М., Маланчук С. Г., Мішина М. М., Ляпунов М. О. Дія антисептичних препаратів з динатрієм едетатом на добові біоплівки й на здатність до формування біоплівки *S.aureus*. *Вісник проблем біології і медицини*. 2014. Вип. 3(3). С. 249-253.
109. Пронина Е. А., Райкова С. В., Швиденко И. Г., Шуб Г. М. Влияние электромагнитного излучения на течение экспериментальной раневой инфекции. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2010. Т.6, № 3. С. 500-503.
110. Протасова М. О., Лазарев В. Г., Козлова І. П. Дослідження структури біоплівки, сформованих бактеріями циклу сірки на металевих матрицях. *Мікробіологічний журнал*. 2006. Т.68, № 5. С.80-86.
111. Пуріш Л. М., Асауленко Л. Г. Динаміка сукцесійних змін у сульфідогенній мікробній асоціації за умов формування біоплівки на поверхні сталі. *Мікробіол. журнал*. 2007. Т.69, №6. С.19-25.
112. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва: «МедиаСфера». 2000. 312 с.
113. Русакова М. Ю. Утворення полівидової біоплівки молочнокислими бактеріями *Lactobacillus plantarum* P17630 та дріжджоподібними грибами *Candida albicans* ATCC 18804. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2016. № 2. С. 41-53.

114. Рыболовлев Ю. Р., Рыболовлев Р. С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности. Доклады АН СССР. 1979. № 6. С. 1513-1516.
115. Свіжак В. К., Дейнека С. Є. Антибіотикорезистентність: багатогранність проблеми. *Клінічна та експериментальна патологія*. 2014. Т. XIII, №2(48). С.222-224.
116. Сидашенко О. И., Воронкова О. С., Сирокваша Е. А., Винников А. И. Влияние цефтриаксона и тетрациклина на формирование биопленки штаммами *Staphylococcus epidermidis*. *Вісник Дніпропетровського університету. Серія: Біологія. Медицина*. 2014. Вип. 5(1). С. 7-11. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/vdubm_2014_5%281%29__4.
117. Сідашенко О. І., Воронкова О. С., Сірокваша О. А., Вінніков А. І. Біоплівка як особлива форма організації бактерій та її роль в інфекційних процесах. *Вісник проблем біології і медицини*. 2013. Вип. 3(2). С.36-41.
118. Сідашенко О. І., Шевченко Т. М., Воронкова О. С., Сірокваша О. А., Вінніков А. І. Вплив фторхінолонів на біоплівки *Staphylococcus epidermidis*. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2014. № 3. С. 77-85.
119. Сідашенко О. І., Воронкова О. С., Шевченко Т. М., Вінніков А. І. Вплив факторів середовища на формування біоплівки *Staphylococcus epidermidis*. *Вісник проблем біології медицини*. 2014. Вип.4, Т.2(114). С.213-216.
120. Сидоренко Д. В., Сідашенко О. І., Воронкова О. С., Вінніков А. І. Вивчення впливу фторхінолонів на формування біоплівки *S.epidermidis*. *Вісник проблем біології і медицини*. 2014. Вип. 1. С. 179-184.
121. Синетар Е.О. Вплив наночастинок срібла на формування біоплівки бактеріями *Enterococcus faecalis*. *Вісник проблем біології і медицини*. 2015. Вип. 4(1). С. 201-205.
122. Синетар Е. О., Покас О. В., Авдєєва Л. В. Вплив наноселену на біоплівкоутворення *E. faecalis* та *C. albicans* в асоціації. *Довкілля та здоров'я*. 2014. № 4. С. 42-45.

123. Тец В. В., Артеменко Н. К., Заславская Н. В., Тец Г. В. Биопленки возбудителей уроинфекций и использование фторхинолонов. *Рациональная фармакотерапия в урологии*. 2008. Т.10, №4. С.110-114.
124. Тец В. В., Кнорринг Г. Ю., Артеменко Н. К. Влияние экзогенных протеолитических ферментов на бактерии. *Антибиотики и химиотерапия*. 2004. Т.49, №12. С.9-13.
125. Тец В. В. Микроорганизмы и антибиотики. Инфекции кожи, мягких тканей, костей и суставов. Санкт-Петербург: КЛЕ-Т, 2006. 128 с.
126. Тец Г. В. Роль внеклеточной ДНК и липидов матрикса во взаимодействии бактерий биопленок с антибиотиками: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07/ СПб гос. мед. ун-т им. акад. И.П. Павлова. Санкт-Петербург, 2007. 24 с.
127. Тихомирова Е. И., Тучина Е. С., Рудик Д. В. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на цитокиновую активность макрофагов и нейтрофилов *in vitro* при фагоцитозе бактерий. *Медицинская иммунология*. 2007. Т. 9, № 2-3. С. 165.
128. Трофіменко Ю. Ю., Буркот В. М., Макац Є.Ф. Динаміка утворення біоплівок на поверхні ендотрахеальних інтубаційних трубок *Pseudomonas aeruginosa* та *Acinetobacter baumannii*. *Biomedical and biosocial anthropology*. 2016. №26. С. 23-26.
129. Трушин М. В. Роль видимого и инфракрасного света в регуляции роста *E.coli*: дисс. ...канд.биол.наук: 03.00.07 / Казанский ин-т биохимии и биофизики КНЦ РАН. Казань, 2003. 113 с.
130. Тучина Е. С. Оценка фотодинамического воздействия *in vitro* на бактерии из микробиоценозов ротовой полости и кожи человека: автореферат дис...к.б.н.: 03.00.16, 03.00.07/ Саратовский гос. ун-т имени Н.Г. Чернышевского. Саратов, 2008. 20 с.
131. Устойчивость к антимикробным препаратам. *Информационный бюллетень*. Сентябрь, 2016 г. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/ru/>

132. Хренов П. А., Честнова Т. В. Обзор методов борьбы с микробными биоплёнками при воспалительных заболеваниях. *Вестник новых медицинских технологий*. 2013. №1. URL: <http://medtsu.tula.ru>.
133. Циганенко А. Я., Мішина М. М., Курбанов Р. А., Дубовик О. С. Удосконалення способу відтворення біоплівки мікроорганізмів *in vitro*. Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи. В. 1 з проблеми «Вірусологія та мікробіологія». № 241. 2010. 4 с.
134. Циганенко А. Я., Мішина М. М., Дубовик О. С., Мішин Ю. М. Вивчення ефективності дії фторхінолонів та цефалоспоринів на експериментально відтворені моделі змішаних біоплівок мікроорганізмів, чинників гнійно-запальних інфекцій. *Актуальні проблеми сучасної медицини: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Медична наука – 2009»*. Потава, 2009. №4.1(36). С.234.
135. Циганенко А. Я., Мішина М. М., Дубовик О. С., Мішин Ю. М. Вплив світлодіодного випромінювання на біоплівки ізолятів *Streptococcus pyogenes*. *Проблеми та еволюція епідеміологічного процесу і паразитарних систем провідних інфекцій сучасності: тези XV з'їзду Українського науково-медичного товариства мікробіологів, епідеміологів та паразитологів ім. Д. К. Заболотного*. Харків, 2011. С.114.
136. Циганенко А. Я., Мішина М. М., Дубовик О. С., Мішин Ю. М. Застосування оптичного випромінювання при відтворенні біоплівок *S.aureus in vitro*. *Довкілля і здоров'я: матеріали науково-практичної конференції (м.Тернопіль, 27-28 квітня 2012 р.)*. Тернопіль, 2012. С.83-84.
137. Циганенко А. Я., Коробов А. М., Мішина М. М., Дубовик О. С., Глазунов А. В., Мішин Ю. М. Імуноморфологічний стан при експериментальному локалізованому гнійно-некротичному процесі та комбінованій терапії із застосуванням світлодіодного випромінювання. *Стратегія і тактика боротьби з інфекційними захворюваннями: тези доповідей*

науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів (м. Харків, 17-18 жовтня, 2012 р.). Харків, 2012. С.70.

138. Циганенко А. Я., Коробов А. М., Мішина М. М., Дубовик О. С., Глазунов А. В., Мішин Ю. М. Експериментальне обґрунтування комплексного застосування хіміотерапевтичних препаратів та світлодіодного випромінювання. *Стратегія і тактика боротьби з інфекційними захворюваннями: тези доповідей науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів (м. Харків, 17-18 жовтня, 2012 р.). Харків, 2012. С. 69-70.*

139. Федоров С. М. Сучасні погляди на магнітолазерну і фотоманітну терапію та їх застосування в неврологічній практиці. *Фотобіологія та фотомедицина*. 2016. Т. 12, № 1-2. С. 38-50.

140. Філімонова Н. І., Гейдеріх О. Г. Ефективність моно- та комбінованих антимікробних препаратів при експериментальній рановій інфекції. *Scientific journal "ScienceRise". Фармацевтичні науки*. 2015. №10/4(15). С.51-56.

141. Шабловская Т. А., Панченков Д. Н. Современные подходы к комплексному лечению гнойно-некротических заболеваний мягких тканей. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии*. 2013. Т. VI, № 4. С. 498–507.

142. Шапринський В. О., Скальський С. С. Спосіб лікування гнійної рани в умовах керованого підвищеного тиску аеродисперсною сумішшю. *Харківська хірургічна школа*. 2016. № 1. С. 48-50. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Khksh_2016_1_11

143. Шапринський В. О., Скальський С. С., Паламарчук С. В., Шапринський Є. В. Сучасні підходи до лікування гнійних ран. Невирішені проблеми. *Шпитальна хірургія*. 2015. № 3. С. 70-73.

144. Шкаруба А. Ю., Воронкова О. С., Вінніков А. І. Антибіотикочутливість та здатність до утворення біоплівки у стафілококів, виділених з різних біотопів. *Вісник проблем біології і медицини*. 2015. Вип.3, Т.1(122). С.287-290.

145. Шурыгина Е. П. Обоснование показаний к различным методам

- применения лазерного излучения в комплексном лечении острой гнойной хирургической инфекции мягких тканей. *Лазерная медицина*. 2005. Т. 9. Вып. 3. С. 18-23.
146. Щербакова Д. С. Действие антисептиков на бактериальные биопленки у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта: автореферат дис. ... к.мед.н.: 14.01.14/ С-П Гос. мед. ун-т им. ак. И.П. Павлова. Санкт-Петербург, 2012. 22 с.
147. Яненко О. П., Кузь І. В. Дослідження рівня опромінення пристрою світло терапії. *Вісник НТУУ «КПІ». Серія приладобудування*. 2017. Вип. 53(1). 109-113.
148. Яненко О. П., Михайленко С. В. Прилад для світлотерапії та опромінення акупунктурних точок. *Вісник Національного технічного університету України "Київський політехнічний інститут". Приладобудування*. 2014. Вип. 47. С. 168-173.
149. Abedon S. T. Ecology of anti-biofilm agents II: bacteriophage exploitation and biocontrol of biofilm bacteria. *Pharmaceuticals*. 2015. Vol. 8, No. 3. P. 559-589.
150. Antimicrobial Resistance. *World Health Organization*. URL: www.who.int/drugresistance/en
151. Betsy J., Prasanth C. S., Baiju K. V. [et al.] Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: A randomized controlled clinical trial. *J. Clin. Periodontol.* 2014. V.41. P.573–581.
152. Bryers J. D., Characklis W. G. Processes governing primary biofilm formation. *Biotechnol. bioeng.* 1982. Vol. 24. P. 2451-2476.
153. Bujdakova H., Didiasova M., Drahovska H., Cernakova L. Role of cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* biofilm. *Central Europ. J. Biol.* 2013. V.8. P.259–262
154. Characterization and Biofilm Formation of Pediatric *Staphylococcus aureus* Device-related Infection Isolates Compared with Skin and Soft-tissue infection Isolates from 2008 to 2016. Catherine Foster, MD Melissa Kok, BS student

- Edward O Mason, Jr., PhD, FIDSA Sheldon L Kaplan, MD, FIDSA Kristina G Hulten, PhD. *Open Forum Infectious Diseases*. 2017. Vol. 4. P. S630–S631. URL: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx163.1672>.
155. Carvalhais V., Cerveirac F., Vilanova M., Cerca N., Vitorinoa R. An immunoproteomic approach for characterization of dormancy with in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Molecular. Immunology*. 2015. No. 65. P. 429-435.
156. Chan B. K., Abedon S. T. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. *Current Pharmaceutical Design*. 2015. Vol. 21, № 1. P. 85-99.
157. Chaves M. E., Araújo A. R., Piancastelli A. C., Pinotti M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *An Bras Dermatol*. 2014. V.89, No. 4. P.616-23.
158. Danilevicius M., Juzėnienė A., Juzėnaitė-Karneckienė I., Veršėnina A. MRSA decontamination using octenidine-based products. *British Journal of Nursing*. 2015. Vol. 24. P.36.
159. Donlan, R. M., Costerton J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002. Vol. 15, No. 2. P. 167–193.
160. Dubovyk O. S., Mishyna M. M., Malanchuk S. G., Kuzmenko A. M., Kozlov O. P. Definition of antibiotic sensitivity etiological factors of purulent-inflammatory processes. *Georgian Medical News*. 2017. №10(271). P.133-137.
161. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg. Council Treaty Series. 1986. No.123. 52 p.
162. Garcia V. G., Longo M., Gualberto Junior E. C. et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J. Periodontal Res*. 2014. V. 49. P.584–594.
163. Garg T. Jain N. K., Rath G. et al. Nanotechnology-based photodynamic therapy: concepts, advances, and perspectives. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2015. V.32, No. 5. P.389-439.

164. Gil C. , Solano C., Burgui S., Latasa C., Garcia B., Toledo-Arana A., Lasa I., Valle J. Biofilm matrix exoproteins induce a protective immune response against *Staphylococcus aureus* biofilm infection. *Infection and Immunity*. 2014. T.82, No. 3. C.1017-1029.
165. Günther F., Scherrer M., Kaiser S. J., DeRosa A., Mutters N.T. Comparative testing of disinfectant efficacy on planktonic bacteria and bacterial biofilms using a new assay based on kinetic analysis of metabolic activity. *J Appl Microbiol*. 2017. Vol. 122 (3). P. 625-633. DOI: 10.1111/jam.13358. Epub 2016 Dec 29.
166. Gutiérrez D., Martínez B., Rodríguez A., García P. Genomic characterization of two *Staphylococcus epidermidis* bacteriophages with anti-biofilm potential. *BMC Genomics*. 2012. Vol. 13. P. 228.
167. Junker J. PE., Kamel R. A., Caterson E. J., Eriksson E. Clinical impact upon wound healing and inflammation in moist, wet, and dry environments. *Advances In Wound Care*. 2013. Vol. 2 (7). P. 348-354
168. May J. G. [et al.] Potential role of biofilms in deep cervical abscess. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*. 2014. No. 78 (1). P. 10-13.
169. Moreira A. L., Novaes A. B., Grisi M. F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical treatment of aggressive periodontitis: A split-mouth randomized controlled trial. *J. Periodontol*. 2015, Vol. 86. P. 376-386.
170. Mishina M., Myasoedov V., Davydenko V., Korobov A., Dubovik E., Mozgova Y., Mishin Y. LED effects on *E.coli*'s ability to form biofilms and on phagocytic activity of neutrophils with NETs production in experimental localized pyoinflammatory processes [Electronic resource]. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona (Spain), 10 May 2014.
171. Mitchison J. M., Vincent W. S. Preparation of synchronous cell cultures by sedimentation. *Nature (London)*. 1965. Vol. 205. P. 987-989.
172. Kikuchi T., Mogi M., Okabe I. et al. Adjunctive application of antimicrobial photodynamic therapy in nonsurgical periodontal treatment: a review of

- literature. *Int.J.Mol.Sci.* 2015. Vol.16. P. 24111-24126. URL: [dx.doi.org/10.3390/ijms161024111](https://doi.org/10.3390/ijms161024111)
173. Kim H., Makin I., Skiba J. et al. Antibacterial efficacy testing of a bioelectric wound dressing against clinical wound pathogens. *Open Microbiol J.* 2014. V.8. P.15-21.
174. Krasowska A., Sigler K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014, V.4. P.112.
175. Kyoung-Ho Lee, Su Jung Park, SunJu Choi, Young Uh, Joo Young Park, Kyoung-Hee Han. The influence of urinary catheter materials on forming biofilms of microorganisms. *J Bacteriol Virol.* 2017. V. 47(1). P. 32-40. DOI: doi.org/10.4167/jbv.2017.47.1.32.
176. Olson M. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res.* 2002. No. 66(2). P. 86-92.
177. O'Toole G.A., Kaplan H. B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Ann Rev Microbiol.* 2000. No. 54. P. 49-79.
178. Patmo A. S., Krijnen P., Tuinebreijer W. E., Breederveld R. S. The effect of vacuum-assisted closure on the bacterial load and type of bacteria: a systematic review. *Advances in Wound Care.* 2013. Vol. 3 (5). P. 383-389.
179. Popov M. M., Korobov A. M., Malanchuk S. G., Filimonova N. I., Mishyna M. M., Mishyn Yu. M. The action of antimicrobial agents and the led radiation on daily biofilms of *S.aureus* and *E.coli*. *Clinical pharmacy.* 2014. No. 4, Vol. 18.
180. Semenets A. S., Galkin M. B., Filipova T. O. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* strains with different levels of cyclic di-guanosine monophosphate biosynthesis. *Мікробіологія і біотехнологія.* 2016. № 1. С. 19-28.
181. Silva-Dias A., Miranda I. M., Branco J., Monteiro-Soares M., Pina-Vaz C., Rodrigues A. G. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Front Microbiol.* 2015. Mar 12. V. 6. DOI: [10.3389/fmicb.2015.00205](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00205).

182. Spitler R., Berns M. W. Comparison of laser and diode sources for acceleration of in vitro wound healing by low-level light therapy. *J Biomed Opt.* 2014. V.19, No. 3. DOI: 10.1117/1.JBO.19.3.038001.
183. Su J. P., Kyoung-hee H., Joo Young P. Influence of bacterial presence on biofilm formation. *Yonsei Med. j.* 2014. Vol. 55.P. 449–458.
184. Sunderkötter C., Becker K.. Frequent bacterial skin and soft tissue infections: diagnostic signs and treatment. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2015. V.13, No. 6. P.501–524.
185. Vohra F., Akram Z., Safi S. H. et al. Role of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of aggressive periodontitis: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2015. DOI:10.1016/j.pdpdt.2015.06.010.
186. Voos A.C., Kranz S., Tonndorf-Martini S. et al. Photodynamic antimicrobial effect of safranin O on an ex vivo periodontal biofilm. *Lasers Surg. Med.* 2014. V.46. P. 235-243.
187. Wolcott R. D., Rhoads D. D., Bennett M.E. et al. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *J. Wound Care.* 2010. Vol. 19, No. 2. DOI: 10.12968/jowc.2010.19.2.46966
188. Yamanaka T., Furukawa T., Yamane K. et al. Biofilm-Forming Capacity on Clinically Isolated *Streptococcus constellatus* from an Odontogenic Subperiosteal Abscess Lesion. *J. Bacteriol. Parasitol.* 2013. No. 4. P. 160.

ДОДАТОК А
до розділу 2

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
Український центр наукової медичної інформації
та патентно-ліцензійної роботи
(Укрмедпатентінформ)

ІНФОРМАЦІЙНИЙ ЛИСТ

ПРО НОВОВВЕДЕННЯ В СИСТЕМІ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я

№ 241 - 2010

Випуск 1 з проблеми
«Вірусологія та мікробіологія»
Підстава: Рішення ПК
«Вірусологія та мікробіологія»
Протокол №128 від 28.01. 2011 р.

ЗАВДУВАЧАМ НАУКОВО-ДОСЛІДНИХ
ЛАБОРАТОРІЙ ВИЩИХ МЕДИЧНИХ
(ФАРМАЦЕВТИЧНОГО) НАВЧАЛЬНИХ
ЗАКЛАДІВ, НАУКОВО-ДОСЛІДНИХ
УСТАНОВ

УДОСКОНАЛЕННЯ СПОСОБУ ВІДТВОРЕННЯ БІОПЛІВОК МІКРООРГАНІЗМІВ IN VITRO

УСТАНОВИ-РОЗРОБНИКИ:

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ МОЗ УКРАЇНИ

УКРМЕДПАТЕНТИНФОРМ
МОЗ УКРАЇНИ

А В Т О Р И:

д.мед.н., проф.
ЦИГАНЕНКО А.Я.,
к. мед.н., доц.. МІШИНА М.М.,
КУРБАНОВ Р.А.,
ДУБОВИК О.С.

м. Київ

Суть впровадження: спосіб відтворення біоплівки мікроорганізмів – збудників гнійно-запальних процесів.

Пропонується для впровадження в мікробіологічних лабораторіях лікувально-профілактичних установ практичної охорони здоров'я для визначення антибіотикочутливості мікроорганізмів у формі біоплівки.

Викладена методика з удосконалення способу відтворення біоплівки мікроорганізмів може бути використана в розробці моделі формування біоплівки мікроорганізмів для визначення дії протимікробних засобів й фізико-хімічних факторів на мікробні угруповання.

Основним недоліком відомих способів експериментального моделювання біоплівки мікроорганізмів є те, що в зазначених способах змив інокулюма проводиться дистильованою водою, а не суспензійними середовищами, які призначені для змиву ізолятів, і відомі способи не враховують первинний вміст мікроорганізмів за ступенем McFarland, завдяки чому можливо достовірно визначити кількість мікробних клітин.

Нами розроблена методика підвищення ефективності відтворення біоплівки мікроорганізмів шляхом заміни дистильованої води рідиною для змивання штамів, суспензійним середовищем для змивання інокулюма з подальшим вимірюванням концентрації мікробних клітин у мл на мутнометрі "Densi-La-Meter" з повторним вимірюванням оптичної щільності інокуляту на рідері до термостатування для підвищення точності вмісту бактеріальних клітин у інокулюмі.

Методика моделювання біоплівки мікроорганізмів включає такі етапи:

- первинна інкубація ізолятів;
- змив суспензійним середовищем або фізіологічним розчином інокуляту;
- розведення вихідної бактеріальної суспензії до необхідної концентрації мікроорганізмів в одиниці об'єму, що проводиться у два кроки: вимірювання оптичної щільності вихідної бактеріальної суспензії на "Densi-La-Meter" за ступенем McFarland, яка індивідуальна для кожної родини бактерій та інокуляція бактеріальної суспензії, що виміряна за ступенем McFarland, у

комірки полістиролового 96 коміркового планшету у 4-х повтореннях з негативним контролем й барієвими стандартами мутності із послідувачим вимірюванням мутності інокуляту на рідері «Multiskan EX 355» при довжині хвилі 540 нм для визначення точної кількості мікроорганізмів й при необхідності її корекція та повторне вимірювання на рідері.

- Після інокулювання проводиться інкубація бактеріальної суспензії з відомою концентрацією мікроорганізмів при 37⁰С протягом 24 годин у вологому контейнері.

Утворення біоплівки вивчали за допомогою визначення здатності штамів бактерій до адгезії на поверхні 96 коміркових полістиролових планшетів для імуноферментного аналізу. Штами вирощували за загальноприйнятими у мікробіології методами на рекомендованих для кожної родини бактерій середовищах та умовами культивування. Здобуті культури змивали суспензійними середовищами, які індивідуальні для кожної родини бактерій, або фізіологічним розчином. Вимірювали оптичну щільність вихідної (початкової) бактеріальної суспензії на «Densi-La-Meter» й доводили її концентрацію відповідно до ступеня за McFarland, який неоднаковий для різних родин мікроорганізмів (наприклад, для ентеробактерій - 1McF, для стрептококів - 3McF, для стафілококів, анаеробів й неферментерів - 2McF) за допомогою суспензійного середовища або фізіологічного розчину. Для більш точного вимірювання оптичної щільності та її корекції, бактеріальну суспензію, що відповідала певному ступеню за McFarland, інокулювали у комірки панелі дозатором по 200 мкл у 4-х повтореннях. У якості негативного контролю вносили 200 мкл поживного бульйону або суспензійного середовища. Стандарти мутності готували з BaCl₂·2H₂O й H₂SO₄ за методикою «Pliva-Lachema» та виробниками «Densi-La-Meter», що використовуються для контролю якості роботи приладу:

1 ступінь за McFarland – 0,1 мл 1% розчину BaCl₂·2H₂O й 9,9 мл 1% розчину H₂SO₄;

2 ступінь за McFarland – 0,2 мл 1% розчину BaCl₂·2H₂O й 9,9 мл 1% розчину H₂SO₄;

3 ступінь за McFarland – 0,3 мл 1% розчину BaCl₂·2H₂O й 9,9 мл 1% розчину H₂SO₄.

Кількість інокульованих планктонних клітин підраховували на фотометрі «Multiskan EX 355» при довжині хвилі 540 нм й виражали

в умовних одиницях оптичної щільності. Здобута середня математична оптична щільність (з 4-х комірок) не повинна відрізнятися від необхідної нам концентрації мікроорганізмів, більш ніж на 10%. Для корекції оптичної щільності мікроорганізмів у початковій бактеріальній суспензії необхідно користуватися суспензійним середовищем або фізіологічним розчином. Після одержання бактеріальної суспензії з необхідною концентрацією мікроорганізмів у комірки планшета інокулюється по 200 мкл зазначеної суспензії з відповідним поживним середовищем у 4-х повтореннях з подальшою інкубацією згідно з умовами для кожної родини бактерій у вологому контейнері під закритою кришкою планшета. Через 24 (48) години інкубації проводили підрахунок кількості клітин на рідері. З комірок панелі вилучали планктонні клітини й забарвлювали плівки. Для цього у комірку вносили 200 мкл фосфатного буфера (або дистильованої води) й 15 мкл 1% спиртового розчину кристалвіолету та інкубували 45 хвилин при кімнатній температурі. Після триразового промивання фосфатним буфером (або дистильованою водою) у комірки для екстракції фарби з плівки додавали 250 мкл 96% етилового спирту та інкубували ще 45 хвилин при кімнатній температурі й вимірювали оптичну щільність цього розчину при довжині хвилі 540 нм. Інтенсивність забарвлення вмісту комірок (спирту у комірках) відповідала ступеню плівкоутворення. Кількісним вираженням ступеня утворення біоплівки є значення оптичної щільності, що виміряні на спектрофотометрі при 540 нм.

За додатковою інформацією з проблеми звертатись до авторів листа: Харківський національний медичний університет, Циганенко А.Я., Мішина М.М., Курбанов Р.А., Дубовик О.С., тел. (057) 707-73-31.

Інформаційний лист складено за матеріалами галузевого ДІФ України

Відповідальний за випуск: проф. В.І. Чебан

Підписано до друку 31.01.2011. Друк. арк. 0,13. Обл.-вид. арк. 0,08. Тир. 100 прим.

Замовлення № 241 Фотоофсетна лаб. Укрмедпатентінформ МОЗ України, 04655, Київ, проспект Московський, 19 (4 поверх).

ДОДАТОК Б
до розділу 2



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **80355** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
C12N 13/00
A61N 5/06 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2012 13663</p> <p>(22) Дата подання заявки: 29.11.2012</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.05.2013</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.05.2013, Бюл.№ 10</p>	<p>(72) Винахідник(и): Коробов Анатолій Михайлович (UA), Циганенко Анатолій Якович (UA), Мішина Марина Митрофанівна (UA), Дубовик Олена Сергіївна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА, пл. Свободи, 4, м. Харків, 61022 (UA)</p>
--	--

(54) ПРИСТРІЙ ДЛЯ ВПЛИВУ ОПТИЧНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ IN VITRO НА ПАТОГЕННІ БАКТЕРІЇ

(57) Реферат:

Пристрій для впливу оптичного випромінювання in vitro на патогенні бактерії містить штатив з вузлами кріплення джерела оптичного випромінювання та підставки для розміщення оброблюваного матеріалу. Штатив містить стійку та опору, до якої у вигляді горизонтально розташованої робочої платформи жорстко закріплена підставка для розміщення 96-коміркового полістиролового плоскодонного планшета або чашки Петрі з інокульованими мікроорганізмами, а на стійці, над робочою платформою, паралельно їй, з можливістю пересування вздовж стійки закріплено джерело оптичного випромінювання у вигляді фотонної матриці Коробова, що містить 24 світловипромінюючі елементи, крім того, на верхній частині стійки, в боці, діаметрально протилежному розташуванню джерела оптичного випромінювання, жорстко закріплена з'єднана з комп'ютером відеокамера, оптична вісь якої розміщена паралельно осі стійки на відстані, що дорівнює відстані між віссю стійки та геометричною віссю джерела оптичного випромінювання, причому стійка встановлена з можливістю повертання навколо своєї осі на 180°.

UA 80355 U

Корисна модель належить до експериментальної медицини та біотехнології, а саме експериментального обладнання, і може бути використана для визначення оптимальних схем комплексної терапії гнійно-запальних процесів фармацевтичними протимікробними засобами та низькоінтенсивним світлом видимого діапазону, наприклад від фотонної матриці Коробова, в умовах доклінічного експерименту.

На сьогоднішній день фахівці у своїй практиці використовують пристрої для фототерапії при різних захворюваннях, в тому числі й при гнійно-запальних процесах.

Відомий фізіотерапевтичний апарат [1] в одному корпусі поєднує блок живлення, без трансформаторного виконання, зі світлодіодною матрицею. Світлодіодна матриця апарата являє собою послідовно з'єднані 21 червоний і 16 інфрачервоних світлодіодів з технічними характеристиками: світлодіоди генерують випромінювання: червоне довжиною хвилі - 650 нм (щільність випромінювання - 0,8 мВт/см²) та інфрачервоне - 920 нм (щільність випромінювання - 1,5 мВт/см²). Зазначений пристрій має технічні властивості, що передбачають його використання для широкого спектра фізіотерапевтичного впливу в клінічних та домашніх умовах, але не забезпечують умов для проведення досліджень впливу оптичного випромінювання на мікроорганізми - збудники гнійно-запальних процесів *in vitro*.

Відомий пристрій для лікування ушкоджень гомілковостопних суглобів [2] містить шину для фіксації в місці ушкодження гомілковостопного суглоба, в якій у спеціально сформованих отворах вмонтовані світлодіоди потужністю не менше 1 мВт в інфрачервоному діапазоні і яскравістю не менше 500 мКд в видимому діапазоні спектра. Світлодіоди видимого та інфрачервоного діапазонів спектра розташовані в отворах шини по черговою еквідистантно з кроком не більше 3 см. Засоби для світлотерапії також можуть бути виконані в вигляді світлодіодних лінійок, які сформовані з світлодіодів видимого і інфрачервоного діапазонів спектра. Світлодіодні лінійки розташовані в отворах шини по черговою і еквідистантно з кроком не більш 3 см, а отвори для світлодіодних лінійок в шинах розташовані один від одного на відстані не більше 3 см. Засоби для світлотерапії виконані у вигляді світлодіодів, які випромінюють в видимому діапазоні спектра 620-660 нм та в інфрачервоному діапазоні спектра 840-940 нм.

Зазначений пристрій також не забезпечує можливості використання його в експериментах *in vitro* для визначення впливу світла на мікроорганізми.

Відомий спосіб визначення динаміки мінливості мікроорганізмів *in vitro* [3], заснований на впливі низькоенергетичного лазерного випромінювання при енергетичних експозиціях від 0,05 до 0,5 Дж/см², магнітною індукцією поля 60 мТл впродовж 60 с на мікробну клітину в біологічному середовищі з наступною фіксацією бактеріальних клітин тушшю або азур-еозином. Дводобову культуру коринебактерій вносять до біологічного середовища на предметне скло і дивляться під мікроскопом. Обладнання, що використовують у зазначеному способі, не дозволяє вирішувати поставлених технічних завдань корисної моделі, що заявляється.

Найближчим аналогом до запропонованої корисної моделі вибрано пристрій для екстракорпорального ультрафіолетового опромінення трансфузійних рідин [4], що містить штатив з вузлами кріплення джерела оптичного випромінювання та підставки для розміщення оброблюваного матеріалу.

Зазначений пристрій передбачає розміщення на штативі принаймні одного встановленого вертикально джерела ультрафіолетового випромінювання, у верхньому краю якого встановлені принаймні два гакоподібні тримачі для кювет із стерильним трансфузійним розчином.

Відомий пристрій не забезпечує експериментального вивчення дії світлодіодного випромінювання на мікроорганізми - збудники гнійно-запальних процесів.

В основу корисної моделі поставлена задача створення пристрою для визначення впливу оптичного випромінювання фотонної матриці Коробова *in vitro* на мікроорганізми, збудники гнійно-запальних процесів. Технічним завданням при виготовленні пристрою також є низька собівартість, надійний спосіб фіксації кронштейна на стійці, мінімум деталей та вузлів, з котрих складається штатив, та зручність при використанні.

Поставлена задача вирішується тим, що у пристрої [4], прийнятому за найближчий аналог, що містить штатив з вузлами кріплення джерела оптичного випромінювання та підставки для розміщення оброблюваного матеріалу, згідно з корисною моделлю, штатив містить стійку та опору, до якої у вигляді горизонтально розташованої робочої платформи жорстко закріплена підставка для розміщення 96-коміркового полістиролового плоскодонного планшета або чашки Петрі з інокульованими мікроорганізмами, а на стійці, над робочою платформою, паралельно їй, з можливістю пересування вздовж стійки закріплено джерело оптичного випромінювання у вигляді фотонної матриці Коробова, що містить 24 світловипромінюючі елементи, крім того, на верхній частині стійки, в боці, діаметрально протилежному розташуванню джерела оптичного випромінювання, жорстко закріплена з'єднана з комп'ютером відеокамера, оптична вісь якої

UA 80355 U

розміщена паралельно осі стійки на відстані, що дорівнює відстані між віссю стійки та геометричною віссю джерела оптичного випромінювання, причому стійка встановлена з можливістю повертання навколо своєї осі на 180°.

5 Крім того, як світловипромінюючі елементи використані світлодіоди з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 470 нм.

Крім того, як світловипромінюючі елементи використані світлодіоди з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 627 нм.

10 Крім того, вузол кріплення джерела оптичного випромінювання виконаний з можливістю пересування вздовж стійки та фіксування джерела оптичного випромінювання в п'яти положеннях відносно робочої платформи.

Пристрій дозволить відпрацьовувати оптимальну технологію лікування бактеріальних інфекцій. Виготовлення пристрою не потребує великих капітальних затрат, а ефективність його використання очевидна.

15 Наведено креслення пристрою як приклада виконання корисної моделі. Пристрій складається з робочої платформи 1, на якій розміщений 96 комірковий полістироловий плоскодонний планшет або чашка Петрі з інокульованими мікроорганізмами 2, вертикального штатива 3, фотонної матриці Коробова 4, вузлів кріплення 5, відеокамери 6 та комп'ютера 7.

Пристрій працює наступним чином.

20 На робочу платформу 1 встановлюють 96 комірковий полістироловий плоскодонний планшет або чашку Петрі з досліджуваними інокульованими мікроорганізмами 2 та опромінюють з потрібною експозицією за допомогою фотонної матриці Коробова 4, складеної з 24 штук суперлюмінесцентних світлодіодів з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 470 нм або з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 627 нм.

25 З метою дослідження дії випромінювання різної щільності на мікроорганізми джерело випромінювання 4 переміщується та фіксується на п'яти різних рівнях від робочої платформи 1.

Після опромінення проводять добуву інкубацію й визначають здатність опромінених планктонних клітин формувати біоплівки та здатність сформованих біоплівок продукувати планктонні клітини за оптичною щільністю, яку реєструють на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм.

30 Крім того, за допомогою відеокамери 6, з'єданого з персональним комп'ютером 7, фіксують, запам'ятовують та обробляють одержані зображення.

Суть роботи пристрою пояснюється прикладом досліджування комплексного впливу хіміотерапевтичних препаратів та оптичного випромінювання на формування біоплівок наступних штамів *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* та *S. aureus*.

35 Відразу після інокуляції ізолятів до комірок планшета (у 4-х повторях) їх опромінювали протягом 15 хвилин за допомогою фотонної матриці Коробова, складеної з 24 штук суперлюмінесцентних світлодіодів з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 470 нм, а потім з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 627 нм, і вимірювали оптичну щільність. Потім після 18 годинного термостатування проводили повторне вимірювання оптичної щільності.

40 Контрольний, 1 планшет, не опромінювали, 2 планшет опромінювали червоним світлом, 3 планшет - синім. Визначення здатності штамів бактерій до адгезії на поверхні 96 коміркової полістиролових планшетів для імуноферментного аналізу. Вимірювали оптичну щільність вихідної бактеріальної суспензії на "Densi-La-Meter" й довели її концентрацію відповідно до ступенів за McFarland за допомогою суспензійного середовища. Для більш точного вимірювання

45 оптичної щільності та її корекції бактеріальну суспензію, що відповідала певному ступеню за McFarland, інокульовали у комірки панелі дозатором по 200 мкл у 4 повтореннях. Як негативний контроль вносили 200 мкл поживного бульйону. Кількість інокульованих планктонних клітин підраховували на фотометрі "Multiskan EX 355" при довжині хвилі 540 нм й виражали в умовних одиницях оптичної щільності. Після одержання бактеріальної суспензії з необхідною

50 концентрацією мікроорганізмів у комірки планшета інокульовалась по 200 мкл даної суспензії з відповідним поживним середовищем у 4 повтореннях з подальшою інкубацією згідно з умовами для кожної родини бактерій у вологому контейнері під закритою кришкою планшета. Після інкубації проводили підрахунок кількості клітин на ридері. З комірок панелі вилучали планктонні клітини й забарвлювали плівки. Для цього у комірку вносили 200 мкл фосфатного буферу й

55 15 мкл 1% спиртового розчину кристалвіолету та інкубували 45 хвилин при кімнатній температурі. Після триразового промивання фосфатним буфером у комірки для екстракції фарби з плівки додавали 250 мкл 96% етилового спирту та інкубували ще 45 хвилин при кімнатній температурі й вимірювали оптичну щільність цього розчину при довжині хвилі 540 нм. Інтенсивність забарвлення вмісту комірок (спирту у комірках) відповідала ступеню

60 плівкоутворення. Кількісним вираженням ступеня утворення біоплівки є значення оптичної

UA 80355 U

щільності, що виміряно на спектрофотометрі при 540 нм. Результат визначається в умовних одиницях оптичної щільності (од. оц.) біоплівкоутворення мікроорганізмами.

За умов комплексного впливу фотонного випромінювання й хіміотерапевтичних препаратів на суспензійну культуру *P. mirabilis* було встановлено, що тільки у 6,2 % випадків ізоляти були чутливі до хіміотерапевтичних препаратів цефалоспоринового ряду під впливом синього світла порівняно з комплексною дією червоного світла та контролем.

Аналіз результатів впливу світлодіодного випромінювання й хіміотерапевтичних препаратів на ізоляти *K. pneumoniae* показав, що при комбінованому застосуванні синього світла й цефатоксиму та цефтриаксону у концентрації 64 мкг/мл; цефтазидиму та цефепіму у концентрації 32 мкг/мл; ципрофлоксацину у концентрації 4 мкг/мл відбувається пригнічення росту й розмноження ізолятів.

Що стосується впливу хіміотерапевтичних препаратів й фотонного випромінювання та ізоляти *E. coli*, то слід відмітити той факт, що усі ізоляти були активно чутливі до препаратів цефалоспоринового ряду (8 мкг/мл) й ципрофлоксацину (1 мкг/мл), а до амікацину при дії концентрацій 32 мкг/мл.

Оцінка впливу фотонного випромінювання й протимікробних препаратів на *P. aeruginosa*, показала, що ізоляти були полірезистентні, але у 87,5 % випадків до цефепіму (32 мкг/мл), і у 23,4 % випадків до гентаміцину (8 мкг/мл), 12,3 % випадків до амікацину (32 мкг/мл) й у 47,2 % - до ципрофлоксацину (4 мкг/мл) під впливом синього світла ізоляти виявляли чутливість.

При застосуванні даного методу для визначення антибіотикочутливості ізолятів *S. aureus* під впливом червоного світла та хіміотерапевтичних препаратів було виявлено, що більшість штамів були резистентні до доксицикліну, а саме від 69 до 88 %, - у комірках мікропланшетів як з більшою, так й з меншою концентрацією антибактеріальних препаратів був наявний ріст культури. Під впливом як синього, так й червоного світла та хіміотерапевтичних препаратів до ципрофлоксацину й ванкомицину штами *S. aureus* були чутливі. До інших хіміотерапевтичних препаратів ізоляти проявили варіабельну активність. Отримані дані свідчать про наявність вираженого впливу різних видів оптичного випромінювання на швидкість росту *S. aureus*. Вплив червоного світла викликає уповільнення зростання оптичної щільності, при впливі синього випромінювання відмічено зниження швидкості зростання оптичної щільності, а саме вплив синього випромінювання викликав затримку зростання оптичної щільності на 10,7 %.

Джерела інформації:

1. Патент RU № 2090224, A61N5/06, опубл. 20.09.1997.
2. Патент UA № 71826, A61B17/00, опубл. 15.12.2004.
3. Патент RU № 2141532, C12Q1/01, C12Q1/24, C12N13/00, опубл. 20.11.99, Бюл. № 32.
4. Патент UA № 5464, A61M5/00, опубл. 15.03.2005, Бюл. № 3.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

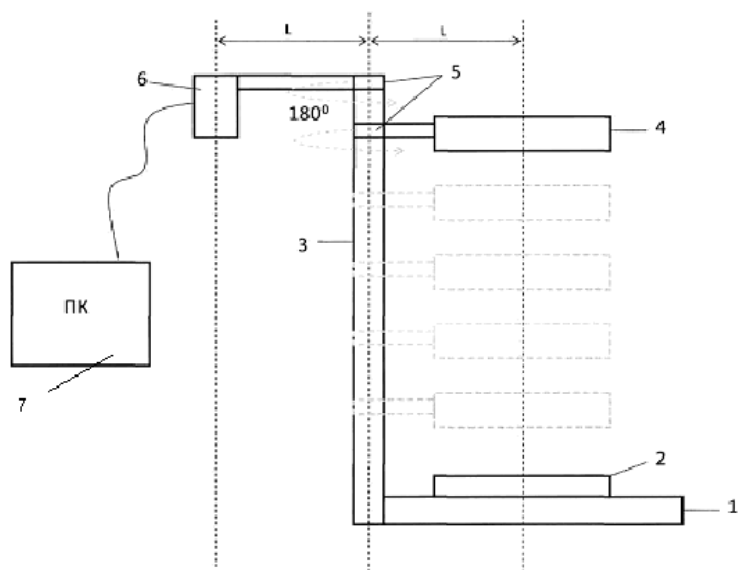
1. Пристрій для впливу оптичного випромінювання *in vitro* на патогенні бактерії, що містить штатив з вузлами кріплення джерела оптичного випромінювання та підставки для розміщення оброблюваного матеріалу, який **відрізняється** тим, що штатив містить стійку та опору, до якої у вигляді горизонтально розташованої робочої платформи жорстко закріплена підставка для розміщення 96-коміркового полістиролового плоскодонного планшета або чашки Петрі з інокульованими мікроорганізмами, а на стійці, над робочою платформою, паралельно їй, з можливістю пересування вздовж стійки, закріплено джерело оптичного випромінювання у вигляді фотонної матриці Коробова, що містить 24 світловипромінюючі елементи, крім того, на верхній частині стійки, в боці, діаметрально протилежному розташуванню джерела оптичного випромінювання, жорстко закріплена з'єднана з комп'ютером відеокамера, оптична вісь якої розміщена паралельно осі стійки на відстані, що дорівнює відстані між віссю стійки та геометричною віссю джерела оптичного випромінювання, причому стійка встановлена з можливістю повертання навколо своєї осі на 180°.

2. Пристрій за п. 1, який **відрізняється** тим, що як світловипромінюючі елементи використані світлодіоди з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 470 нм.

3. Пристрій за п. 1, який **відрізняється** тим, що як світловипромінюючі елементи використані світлодіоди з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 627 нм.

4. Пристрій за п. 2 або п. 3, який **відрізняється** тим, що вузол кріплення джерела оптичного випромінювання виконаний з можливістю пересування вздовж стійки і фіксування джерела оптичного випромінювання в п'яти положеннях відносно робочої платформи.

UA 80355 U



Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

ДОДОТОК В
до розділу 3



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **80293** (13) **U**

(51) МПК (2013.01)

G09B 23/28 (2006.01)

C12N 13/00

A61N 5/06 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 12578**

(22) Дата подання заявки: **05.11.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **27.05.2013**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **27.05.2013, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):
**Коробов Анатолій Михайлович (UA),
Циганенко Анатолій Якович (UA),
Мішина Марина Митрофанівна (UA),
Дубовик Олена Сергіївна (UA)**

(73) Власник(и):
**ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА,
пл. Свободи, 4, м. Харків, 61022 (UA)**

**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ ВИПРОМІНЮВАННЯ ФОТОННОЇ МАТРИЦІ КОРОБОВА НА
ЗДАТНІСТЬ ДО ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК МІКРООРГАНІЗМАМИ IN VITRO**

(57) Реферат:

Спосіб визначення впливу випромінювання фотонної матриці Коробова на здатність до формування біоплівки мікроорганізмами in vitro, що включає вимірювання оптичної щільності плівки, утвореної мікроорганізмами, збудниками гнійно-запальних процесів, на поверхні комірок полістиролової панелі після інкубації інокуляту впродовж 18-24 години, крім того, перед інкубацією інокульовані дослідні ізоляти розміщують у зону дії фотонної матриці Коробова та опромінюють протягом не менш ніж 15 хвилин, а потім за порівнянням оптичної щільності дослідних та контрольних сформованих біоплівок роблять висновок про ступінь плівкоутворення.

UA 80293 U

UA 80293 U

Корисна модель належить до експериментальної медицини, а саме до мікробіології, і може бути використана для визначення впливу оптичного випромінювання, зокрема, при гнійно-запальних процесах, на здатність ізолятів - збудників гнійно-запальних процесів, до формування біоплівки.

5 Протягом останніх десятиріч накопичилася достатня кількість експериментальних даних, які свідчать про складну організацію мікробних спільнот у природних умовах проживання. На зміну концепції єдиного мікробного збудника інфекційних захворювань прийшли теорії асоціації мікробних спільнот - біоплівок [1].

10 У теперішній час проведені багаточисленні дослідження фахівцями різних країн щодо вивчення формування біоплівок мікроорганізмів та впливу на них фізико-біологічних факторів, які зможуть блокувати здатність до формування біоплівки. Так, цілий напрямок досліджень з приводу впливу на біоплівки мікроорганізмів було проведено у Санкт-Петербурзькому державному медичному університеті ім. І.П. Павлова. Фахівцями було вивчено роль позаклітинної ДНК й ліпідів матриксу у взаємодії бактерій біоплівок з антибіотиками. Було встановлено, що оболонка й зовнішній матрикс біоплівок вивчених штамів містить велику кількість ліпідів аналогічних таким, що знаходиться у мембранах мікроорганізмів спілки, причому 15 максимально стабільним є кардіоліпін. У роботі доведено, що дія ДНКаз на етапі формування й на вже сформовані мікробні спільноти призводить до порушення їх утворення, зменшення біомаси й зниження кількості КУО [2].

20 Другим напрямом дослідників цієї наукової роботи було вивчення впливу екзогенних протеолітичних ферментів на бактерії [3]. Були отримані результати, що характеризувалися особливостями, а саме: зареєстровано зниження виживання бактерій у біоплівках у присутності антибіотиків й ферментів, узятих у концентраціях, при яких вони окремо не змінювали КУО в угрупованні. У присутності папаїну КУО у біоплівках при дії різних антибіотиків знижувалось у 2-4 рази, а у присутності вобензиму - у 2-10 разів. Було вивчено й здатність формування біоплівок збудників урологічних інфекцій й доведено, що біомаса бактерій - збудників урологічних інфекцій знижується при введенні у комірочки фторхінолонів (левофлоксацину) й показано, що вони є антибіотиками, які здатні долати стабільні ліпіди біоматриксу й впливати на біомасу вже існуючої біоплівки.

30 Фахівцями Тверської державної медичної академії було вивчено здатність до формування біоплівок у мікроорганізмів, що є чинниками інфекційних процесів. Було встановлено, що концепція біоплівок торкається інфекційних уражень більшості органів й практично усіх штучних імплантів [4].

35 Отже, багатьма дослідниками доведено, що 80 % ізолятів здатні формувати біоплівку й колонізувати поверхні органів й тканин, насамперед легень й ран та викликати хронічну шпитальну інфекцію. Біоплівка утворюється і на медичних приладах, обладнанні та формує вогнища інфекції, боротьба з яким ускладнюється. Процеси формування біоплівок бактерій на слизовій оболонці порожнин організму людини та у зовнішньому середовищі є одним з актуальних питань екології мікроорганізмів й має велике медико-біологічне значення. Ці процеси є не менш цінними для розвитку нанобіології й розробки нових біотехнологій.

40 Багато питань механізмів формоутворення міжклітинних контактів залишалися невирішеними й тільки застосування сучасної електронної мікроскопії відкрило можливість більш детального вивчення молекулярної організації структурних компонентів бактеріальної клітини й колоній, при цьому на достатньо великих поверхнях близько розташованих клітин, що формують біоплівки певних структур.

45 В інституті молекулярної біології Єреванського державного університету протягом багатьох років проводяться дослідження з метою вивчення ультраструктурної архітектоники міжклітинних контактів у біоплівках *in vitro* й *in vivo*. При дослідженні впливу бактерій на еукаріотичні клітини було встановлено різновид міжклітинних контактів у системі прокариот - еукаріот, який проявляється адгезією й формоутворенням біоплівок бактерій на глікокаліксі поверхні епітелія слизової оболонки. Таким чином, виявлені ультраструктурні особливості міжклітинних контактів дозволяють вважати, що процес формування біоплівок у мікроорганізмів залежить як від структурної цитоархітектоники поверхні мікроорганізмів, так і від функціонально-морфологічних показників субстрату [5].

55 Незважаючи на велику кількість робіт з дослідження функціонування біоплівок, на сьогодні залишається практично не вивченим питання утворення біоплівок на метали, що є вкрай важливим. Тому провідними дослідниками інституту мікробіології й вірусології НАН України було проведено багато експериментів з приводу вивчення формування біоплівок мікроорганізмів. Так, групою фахівців було вивчено динаміку сукцесійних змін у мікробній асоціації за умов 60 формування біоплівки на поверхні сталі. Було доведено, що у процесі формування на поверхні

UA 80293 U

сталі біоплівки в мікробному угрупованні відбуваються сукцесійні зміни. Домінування певної фізіологічної групи створює оптимальні умови для функціонування наступного виду мікроорганізмів, якій змінює попередній: першими поверхню колонізують гетеротрофні бактерії, що синтезують екзополімери, які сприяють формуванню структури біоплівки [6].

5 У теперішній час головною метою багатьох досліджень є боротьба з інфекційними чинниками захворювань, руйнування біоплівок мікроорганізмів та здатність впливати на формування їх в організмі. Зараз не викликає сумнівів необхідність перегляду концепції патогенезу різних інфекційних захворювань, зокрема гнійно-запальних процесів. У практичному відношенні це потребує використання новітніх методів діагностики й лікування.

10 Особливу цікавість представляє визначення впливу оптичного випромінювання на суспензійну культуру мікроорганізмів - збудників гнійно-запальних процесів з метою визначення здатності формувати біоплівки *in vitro*.

В клінічній та експериментальній практиці встановлена перспективність використання фотонної матриці для попередження та лікування багатьох різноманітних захворювань, зокрема гнійно-запальних.

15 Відомий спосіб оцінки ефективності антимікробного впливу антибіотиків та ультразвукового випромінювання на патогенні бактерії, що існують у формі біоплівки [7], що полягає у створенні моделі бактеріальної біоплівки, вирощеної з біолюмінесцентних бактерій *Vibrio fischeri*, підборі доз впливу антибіотиків та ультразвукового випромінювання на бактеріальну біоплівку, реєстрації та оцінюванні антимікробного ефекту. Причому реєстрацію антимікробного ефекту проводять шляхом визначення інтенсивності світіння біолюмінесцентних бактерій *Vibrio fischeri*, а антимікробний ефект оцінюють за ступенем пригнічення інтенсивності світіння у порівнянні з контролем. Недоліками способу є визначення дії фізико-біологічних факторів на сформовану біоплівку, планктонні клітини не підлягали випромінюванню. Ступінь оцінки впливу фізико-біологічних факторів за біолюмінесценцією є обмеженим й потребує спеціального обладнання.

20 Відомий спосіб фотодинамічної дії червоного (625 нм) й інфрачервоного (805 нм) випромінювання на бактерії *P. Acnes*, які оброблені фотосенсибілізаторами [8], що включає вивчення впливу оптичного випромінювання на адаптацію бактерій за життєздатністю, чисельністю популяції бактерій, морфологію колоній і особливості росту на живильних середовищах. Для аналізу морфології бактеріальних клітин через 24-72 години після опромінення готували мікропрепарати і забарвлювали за методом Грама; переглядали препарати шляхом світлової мікроскопії з об'єктивом $\times 90$ під масляною імерсією, а також за допомогою цифрової мікрофотокамери ScopeTek. Але цей спосіб не передбачав вивчення впливу фотодинамічної дії червоного (625 нм) й інфрачервоного (805 нм) випромінювання на здатність до формування біоплівок бактеріями.

25 Відомий спосіб діагностики ефективності фототерапії *in vitro* [9], що дозволяє обирати режими фотонного впливу залежно від індивідуальних особливостей реактивності хворого при соматичних захворюваннях. Для цього перед сеансом фототерапії у хворого беруть кров, ділять її на дві серії, одну з яких опромінюють дозою $102-104 \text{ Дж/м}^2$, після чого проби інкубують впродовж 1 години у темряві, центрифугують, плазму відділяють від кліткових елементів, розбавляють фізіологічним розчином до об'ємного співвідношення 1:40, фотометрують на довжинах хвиль 370 и 410 нм, розраховують величину K_s , при $K_s=1$ роблять висновок про відсутність реакції крові на випромінювання та можливості припинення фототерапії, при $K_s<1$ продовжують лікування з очікуванням позитивного ефекту, при $K_s>1$ очікують загострення процесу після опромінювання хворого. Зазначений спосіб не враховує вилучення етіологічного чинника захворювання й передбачає наявність центрифуги та спектрофотометру і проводиться в клінічній лабораторії.

Відомі способи не забезпечують експериментального дослідження впливу оптичного випромінювання на здатність мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних процесів, до формування біоплівок, як захисної форми їх існування. Вивчення цього аспекту *in vitro* є актуальною задачею для визначення дозування терапевтичного впливу оптичного випромінювання, насамперед, при гнійно-запальних процесах.

30 Найбільш близьким до корисної моделі аналогом за сукупністю ознак є спосіб [10], в якому процес формування біоплівок, утворених мікроорганізмами, збудниками гнійно-запальних процесів, вивчають за допомогою визначення здатності штамів бактерій до адгезії на поверхні 96-коміркової полістиролової панелі, шляхом вимірювання оптичної щільності плівки, утвореної на поверхні комірок після інкубації інокуляту впродовж 18-24 години. Вимірювання оптичної щільності початкової бактеріальної суспензії - на "Densi-La-Meter" й доведення концентрації відповідно до ступенів за McFarland за допомогою суспензійного середовища. Для більш точного вимірювання оптичної щільності та її корекції бактеріальна суспензія, що відповідала

UA 80293 U

певному рівню за McFarland, інокулювалася у комірці панелі дозатором по 200 мкл у 4-х повтореннях. У якості негативного контролю вносилося 200 мкл поживного бульйону й суспензійного середовища. Кількість інокульованих планктонних клітин підраховувалося на фотометрі "Multiskan EX 355" при довжині хвилі 540 нм й виражалося в умовних одиницях оптичної щільності.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення способу, у якому за рахунок нової сукупності ознак, була б досягнута можливість досліджування впливу оптичного випромінювання фотонної матриці Коробова *in vitro* на формування біоплівки мікроорганізмами, збудниками гнійно-запальних процесів, для визначення ефективних засобів лікування хронічних інфекційних захворювань.

Для вирішення поставленої задачі у способі, вибраному за найближчий аналог, що включає вимірювання оптичної щільності плівки, утвореної мікроорганізмами, збудниками гнійно-запальних процесів, на поверхні комірок полістиролової панелі після інкубації інокуляту протягом 18-24 годин, згідно з корисною моделлю, перед інкубацією інокульовані дослідні ізоляти розміщують у зону дії фотонної матриці Коробова та опромінують протягом не менш ніж 15 хвилин, а потім за порівнянням оптичної щільності дослідних та контрольних сформованих біоплівок роблять висновок про ступінь плівкоутворення.

Найкращого результату досягають, коли для опромінення використовують фотонну матрицю Коробова, що містить 24 світловипромінюючих елементів.

Найкраще, коли інкубацію бактеріальної суспензії проводять протягом 18 годин з термостатуванням при температурі 37 °C у вологій камері.

Як варіант, для опромінення використовують світлодіоди з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 470 нм.

Як варіант, для опромінення використовують світлодіоди з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 627 нм.

Здатність до формування біоплівок ізолятами під впливом оптичного випромінювання реєструють за зміною оптичної щільності порівняно з контрольними неопроміненими культурами.

Спосіб здійснюють таким чином.

Відразу після інокуляції ізолятів до комірок планшета (у 4-х повторях) їх опромінювали протягом 15 хвилин за допомогою фотонної матриці Коробова, складеної з 24 штук суперлюмінесцентних світлодіодів з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 470 нм, а потім з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 627 нм, і вимірювали оптичну щільність. Потім після 18 годинного термостатування проводили повторне вимірювання оптичної щільності. Контрольний, 1 планшет, не опромінювали, 2 планшет опромінювали червоним світлом, 3 планшет - синім. Визначення здатності штамів бактерій до адгезії на поверхні 96 коміркової полістиролової планшети для імуноферментного аналізу. Вимірювали оптичну щільність вихідної бактеріальної суспензії на "Densi-La-Meter" й доводили її концентрацію відповідно до ступенів за McFarland за допомогою суспензійного середовища. Для більш точного вимірювання оптичної щільності та її корекції бактеріальну суспензію, що відповідала певному ступеню. Як негативний контроль вносили 200 мкл поживного бульйону. Кількість інокульованих планктонних клітин підраховували на фотометрі "Multiskan EX 355" при довжині хвилі 540 нм й виражали в умовних одиницях оптичної щільності. Після одержання бактеріальної суспензії з необхідною концентрацією мікроорганізмів у комірці планшета інокулюється по 200 мкл даної суспензії з відповідним поживним середовищем у 4 повтореннях з подальшою інкубацією згідно з умовами для кожної родини бактерій у вологому контейнері під закритою кришкою планшета. Після інкубації проводили підрахунок кількості клітин на рідері. З комірок панелі вилучали планктонні клітини й забарвлювали плівки. Для цього у комірку вносили 200 мкл фосфатного буферу й 15 мкл 1 % спиртового розчину кристалвіолету та інкубували 45 хвилин при кімнатній температурі. Після триразового промивання фосфатним буфером у комірці для екстракції фарби з плівки додавали 250 мкл 96 % етилового спирту та інкубували ще 45 хвилин при кімнатній температурі й вимірювали оптичну щільність цього розчину при довжині хвилі 540 нм. Інтенсивність забарвлення вмісту комірок (спирту у комірках) відповідала ступеню плівкоутворення. Кількісним вираженням ступеня утворення біоплівки є значення оптичної щільності, що виміряно на спектрофотометрі при 540 нм. Результат визначається в умовних одиницях оптичної щільності біоплівкоутворення мікроорганізмами.

Суть запропонованої корисної моделі пояснюється прикладами.

Приклад 1. Дослідження впливу оптичного випромінювання фотонної матриці Коробова *in vitro* на формування біоплівок наступних штамів *P.vulgaris*, *P.mirabilis*, *S. pyogenes*, та *S.aureus*. У результаті проведених досліджень було встановлено, що усі досліджувані мікроорганізми

варіабельно реагували на опромінення синіми та червоними світлодіодами. Так, після інкубації в продовж 24 годин й опромінення впродовж 15 хвилин синіми та червоними світлодіодами було встановлено, що здатність до формування біоплівки у протеїв різнилась: у ізолятів *P.vulgaris*, що опромінені червоними світлодіодами при оптичній щільності 1,03-1,15 одиниць здатність до формування біоплівки була вище, ніж при опроміненні синіми світлодіодами у 1,2 рази та порівняно з контролем при оптичній щільності 0,99-1,07 й 0,85-1,73 одиниць. Однак, стосовно здатності сформованої біоплівки продукувати планктонні клітини, було встановлено, що після опромінення червоними та синіми світлодіодами здатність до продукції планктонних клітин біоплівками *P.vulgaris* майже не різнилась між собою й позитивним контролем при оптичній щільності 0,95-1,03; 0,92-0,10 й 0,61-1,37 одиниць, відповідно.

Зареєстровані результати свідчать про те, що через добу здатність до формування продукованими планктонними клітинами до утворення вторинних біоплівок суттєво різнилась. Так планктонні клітини *P.vulgaris*, що не опромінені (контроль) утворювали біоплівку щільністю 2,07-2,25 одиниць, а у планктонних клітин *P.vulgaris*, що були продуковані біоплівкою після опромінення червоними світлодіодами, здатність до формування щільної біоплівки знижувалась, порівняно із таким після опромінення синіми світлодіодами 1,12-1,22 й 1,25-1,41 одиниць оптичної щільності, відповідно, й порівняно з контролем відповідно у 1,9 й 1,6 рази, що говорить про втрату здатності до формування щільної біоплівки планктонними клітинами *P.vulgaris*, що були продуковані сформованими біоплівками після опромінення початкової суспензії культури *P.vulgaris*.

Пригнічення здатності до формування біоплівок планктонними клітинами, що були продуковані сформованими біоплівками після опромінення інокуляту *P.vulgaris* червоними або синіми світлодіодами, було викликано зі зниженням здатності до адгезії *P.vulgaris* до субстрату.

Що стосується здатності до біоплівкоутворення *P.mirabilis* після опромінення як червоними, так й синіми світлодіодами, істотної різниці між щільністю утворених біоплівок, відповідно 1,08-1,20 та 1,08-1,18 одиниць оптичної щільності, не було виявлено. Також щільність сформованих біоплівок не відрізнялись від контролю, що дорівнювала 1,05-1,17 одиниць оптичної щільності.

Однак здатність сформованих біоплівок виділяти планктонні клітини достовірно різнилась. Так, кількість планктонних клітин, що продуковані біоплівкою, сформованою після опромінення штамів *P.mirabilis* червоними світлодіодами, була у 1,5 рази вище, ніж після опромінення синіми світлодіодами, кількість яких дорівнювала контрольних значень.

Інша картина спостерігалась при досліджах із *S.pyogenes*. Так при опроміненні червоними світлодіодами щільність біоплівки дорівнювала 0,87-1,47 одиниць, як й у контролі, а при опроміненні синіми світлодіодами, щільність біоплівки знижується, але ця різниця не достовірна.

Цей факт заслуговує особливої уваги тому, що, на перший погляд, різниці до здатності у формуванні біоплівок майже немає, але здатність продукувати планктонні клітини достовірно відрізняється. При опроміненні червоними світлодіодами здатність виділяти планктонні клітини пригнічується у 1,6 разу, а при опроміненні синіми світлодіодами у 2,2 разу, порівняно з контролем, що є дуже важливим при призначенні адекватної терапії й розрахунку дози протимікробних засобів.

При досліджах на штамів *S.aureus* було виявлено, що при опроміненні червоними світлодіодами здатність до плівкоутворення достовірно знижувалась порівняно з контролем, відповідно оптична щільність складала 0,51-0,67 та 0,81-0,87 одиниць, а при опроміненні синіми світлодіодами різниці між контролем не встановлено, відповідно 0,77-0,89 та 0,81-0,87 одиниць оптичної щільності. Надалі в обох випадках, сформовані після опромінення суспензійної культури біоплівки активно продукували планктонні клітини. Причому, після опромінення червоними світлодіодами активність вилучення планктонних клітин підвищувалась у 2,7 рази порівняно з контролем при оптичній щільності, відповідно, 1,883-2,437 та 0,115-1,315 одиниць, а після опромінення синіми світлодіодами вилучення планктонних клітин підвищувалась у 1,7 рази, тобто 0,52-1,92 одиниць оптичної щільності, що сприяло утворенню більш щільної вторинної біоплівки. Це може бути пов'язано з факторами, що захищають *S.aureus*, таких як: пігменти, плазмідні, індуктивні ферменти, тощо.

Приклад 2. Дослідження комплексного впливу хіміотерапевтичних препаратів та оптичного випромінювання фотонної матриці Коробова *in vitro* на формування біоплівок клінічних та референтних штамів *P.mirabilis*, *K.pneumoniae*, *E.coli*, *P.aeruginosa* та *S.aureus*.

За умов комплексного впливу світлодіодного випромінювання й хіміотерапевтичних препаратів на суспензійну культуру *P.mirabilis* було встановлено, що тільки у 6,2 % випадків ізоляти були чутливі до хіміотерапевтичних препаратів цефалоспоринового ряду під впливом синього світла порівняно з комплексною дією червоного світла та контролем.

UA 80293 U

- Аналіз результатів впливу світлодіодного випромінювання й хіміотерапевтичних препаратів на ізоляти *K.pneumoniae* показав, що при комбінованому застосуванні синього світла й цефатоксиму та цефтриаксону у концентрації 64 мкг/мл; цефтазидиму та цефепіму у концентрації 32 мкг/мл; ципрофлоксацину у концентрації 4 мкг/мл відбувається пригнічення росту й розмноження ізолятів.
- Що стосується впливу хіміотерапевтичних препаратів й світлодіодного випромінювання на ізоляти *E.coli*, то слід відмітити той факт, що усі ізоляти були активно чутливі до препаратів цефалоспориного ряду (8 мкг/мл) й ципрофлоксацину (1 мкг/мл), а до амікацину - при дії концентрації 32 мкг/мл.
- Оцінка впливу світлодіодного випромінювання й протимікробних препаратів на *P.aeruginosa*, показала, що ізоляти були полірезистентні, але у 87,5 % випадків до цефепіму (32 мкг/мл), і у 23,4 % випадків до гентаміцину (8 мкг/мл), 12,3 % випадків до амікацину (32 мкг/мл) й у 47,2 % - до ципрофлоксацину (4 мкг/мл) під впливом синього світла ізоляти виявляли чутливість.
- При застосуванні даного методу для визначення антибіотикочутливості ізолятів *S.aureus* під впливом червоного світла та хіміотерапевтичних препаратів було виявлено, що більшість штамів були резистентні до доксицикліну, а саме від 69 до 88 %. Під впливом як синього, так й червоного світла та хіміотерапевтичних препаратів до ципрофлоксацину й ванкомицину штами *S.aureus* були чутливі. До інших хіміотерапевтичних препаратів ізоляти проявили варіабельну активність. Отримані дані свідчать про наявність вираженого впливу різних видів оптичного випромінювання на швидкість росту *S.aureus*. Вплив червоного світла викликає уповільнення зростання оптичної щільності, при впливі синього випромінювання відмічено зниження швидкості зростання оптичної щільності, а саме вплив синього випромінювання викликає затримку зростання оптичної щільності на 10,7 %.
- Запропонований спосіб може бути використаний для визначення оптимальних схем комплексної терапії гнійно-запальних процесів із застосуванням фотонної матриці Коробова й протимікробних засобів в умовах моделювання в доклінічних експериментах.
- Джерела інформації:
- Пуріш Л.М. Динаміка сукцесійних змін у сульфидогенній мікробній асоціації за умов формування біоплівки на поверхні сталі / Л.М. Пуріш, Л.Г. Асауленко // Мікробіол. журнал. - 2007. - Т. 69, № 6. - С. 19-25; Olson M. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics / M. Olson // Can J Vet Res. - 2002. - № 66(2). - P. 86-92.
 - Тец В.В. Бактериальные сообщества. В кн.: Клеточные сообщества под ред. В. Теца. Санкт-Петербург: Изд-во СПбГМУ, 1998. - С. 15-73; Тец Г.В. Роль внеклеточной ДНК и липидов матрикса во взаимодействии бактерий биопленок с антибиотиками: автореф. дис. на соискание науч. степени канд. мед. наук: спец.03.00.07 "Микробиология" / Г.В. Тец. - Санкт-Петербург, 2007. - 22, [1] с; O'Toole G.A. Biofilm formation as microbial development / G.A. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter // Ann Rev Microbiol. - 2000. - № 54. - P. 49-79.
 - Тец В.В. Влияние экзогенных протеолитических ферментов на бактерии [Електронний ресурс]: бібліотека і доступність інформації у сучасному світі: електронні ресурси науці, культури та освіти / В.В. Тец, Г.Ю. Кнорринг, Н.К. Артеменко // Біохімічні основи ензімотерапії. - 2009. - С. 6-15. - Режим доступу до журн.: <http://solvay-pharma.ru>.
 - Михайлова Е.С. Способность к формированию биопленок у микроорганизмов, выделенных их верхних отделов ЖКТ больных хроническим холециститом и ЖКБ / Е.С. Михайлова, Ю.В. Червинец // Успехи современного естествознания. - 2009. - № 7. - С. 5-9.
 - Овнанян К.О. Ультраструктурная архитектура межклеточных контактов в биопленках бактерий in vivo и in vitro / К.О. Овнанян, А.А. Трчунян // Национальная академия Армении. - 2009. - № 1. - С. 78-85.
 - Протасова М.О. Дослідження структури біоплівок, сформованих бактеріями циклу сірки на металевих матрицях / М.О. Протасова, В.Г. Лазарев, І.П. Козлова // Мікробіологічний журнал. - 2006. - Т.68, № 5. - С. 80-86.
 - Пат. RU № 2457254, С12Q 1/04, С12N 13/00, опубл. 27.07.2012. - Способ оценки эффективности антимикробного воздействия антибиотиков и ультразвукового излучения на патогенные бактерии, существующие в форме биопленки / Южный федеральный университет.
 - Тучина Е.С. Оценка фотодинамического воздействия in vitro на бактерии из микробиоценозов ротовой полости и кожи человека: автореф. дис. на соискание уч.спец. к.б.н.: спец. 03.00.16 "Экология"; 03.00.07 "Микробиология" / Е.С.Тучина. - Саратов, 2008 - 20 с.
 - Патент RU № 2018830, G01N 33/48, опубл. 30.08.1994. - Способ диагностики эффективности фототерапии / Горьковский медицинский институт им. С.М. Киров, Нижегородский государственный медицинский институт.

UA 80293 U

10. Патент UA № 47944, G09B 23/00, опубл. 25.02.2010, Бюл. № 4. - Спосіб відтворення біоплівки мікроорганізмів in vitro/ Харківський національний медичний університет.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5
1. Спосіб визначення впливу випромінювання фотонної матриці Коробова на здатність до формування біоплівки мікроорганізмами in vitro, що включає вимірювання оптичної щільності плівки, утвореної мікроорганізмами, збудниками гнійно-запальних процесів, на поверхні комірок полістиролової панелі після інкубації інокуляту впродовж 18-24 години, який **відрізняється** тим, що перед інкубацією інокульовані дослідні ізоляти розміщують у зону дії фотонної матриці
- 10
- Коробова та опромінюють протягом не менш ніж 15 хвилин, а потім за порівнянням оптичної щільності дослідних та контрольних сформованих біоплівок роблять висновок про ступінь плівкоутворення.
- 15
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для опромінення використовують фотонну матрицю Коробова, що містить 24 світловипромінюючі елементи.
3. Спосіб за п. 1 або п. 2, який **відрізняється** тим, що для опромінення використовують світлодіоди з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 470 нм.
4. Спосіб за п. 1 або п. 2, який **відрізняється** тим, що для опромінення використовують світлодіоди з довжиною хвилі випромінювання в діапазоні 627 нм.
- 20
5. Спосіб за п. 3 або п. 4, який **відрізняється** тим, що інкубацію бактеріальної суспензії проводять протягом 18 годин з термостатуванням при температурі 37 °С у вологій камері.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

ДОДАТОК Г
до розділу 5

Мікроскопічне дослідження тканин інтактної групи лабораторних тварин

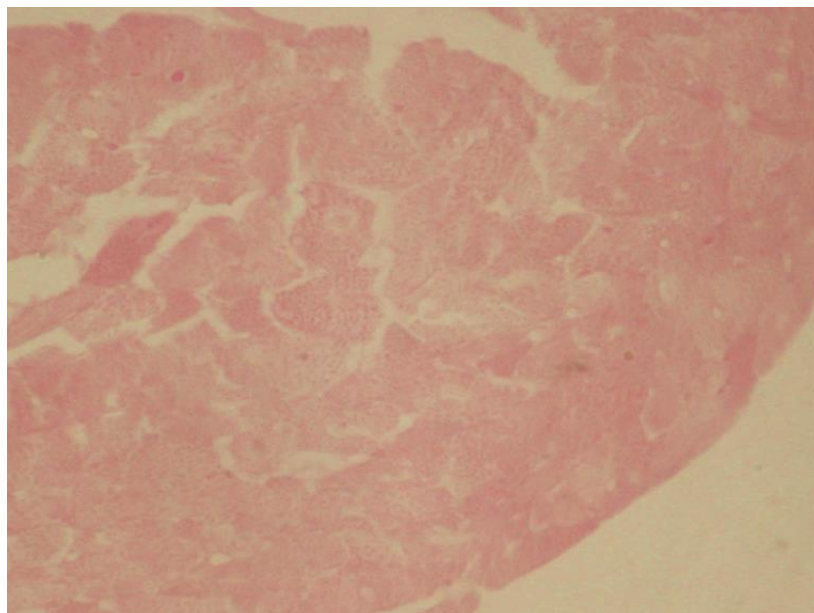


Рис. 5.8 Включення глікогену в цитоплазмі кардіоміоцитів. Група 1.

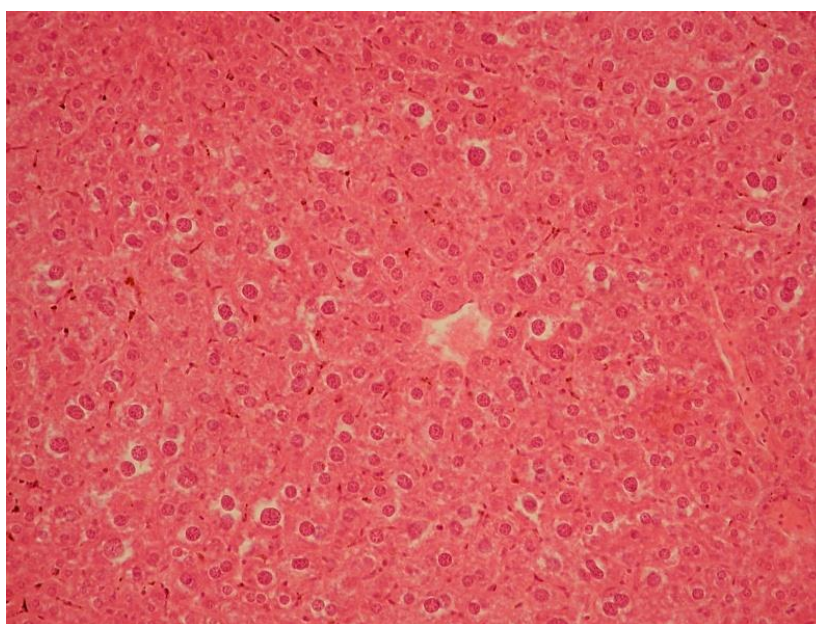


Рис. 5.9 Печінкова долька. Балочна будова. Група 1.

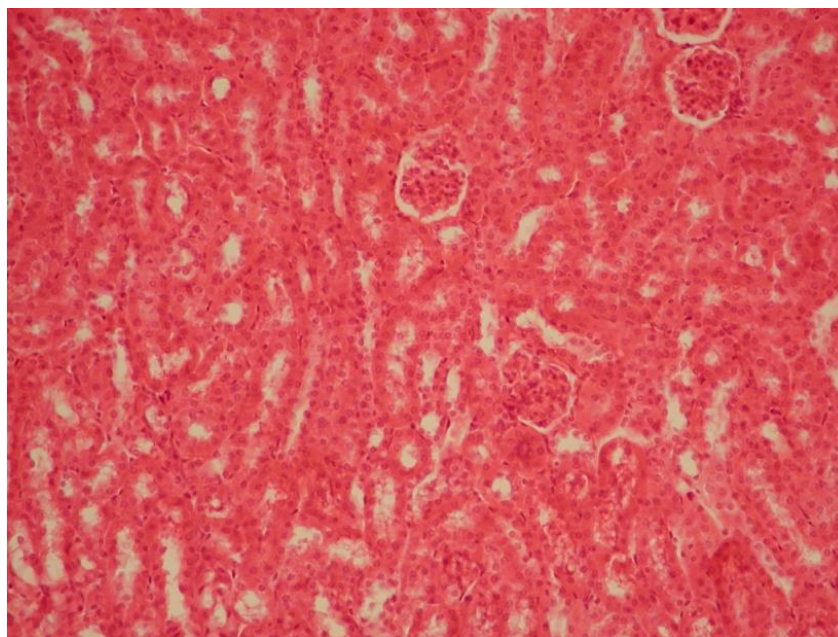


Рис. 5.10 Кортикний шар нирки. Група 1.

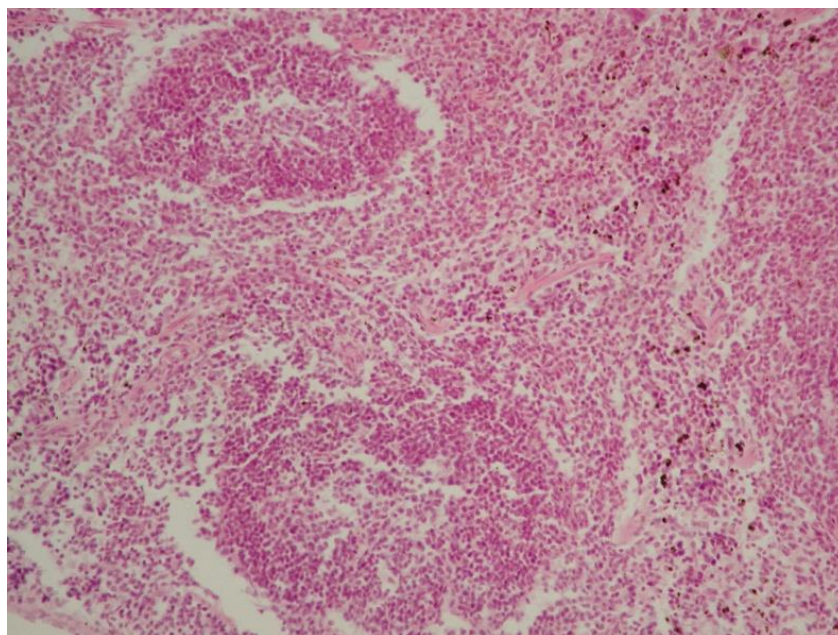


Рис. 5.11 Лімфоїдні фолікули селезінки з поділом на зони (періартеріальна, світлий центр розмноження, мантийна і крайова). Група 1.

Морфологічні зміни тканин групи лабораторних тварин з гнійно-запальною протейною інфекцією

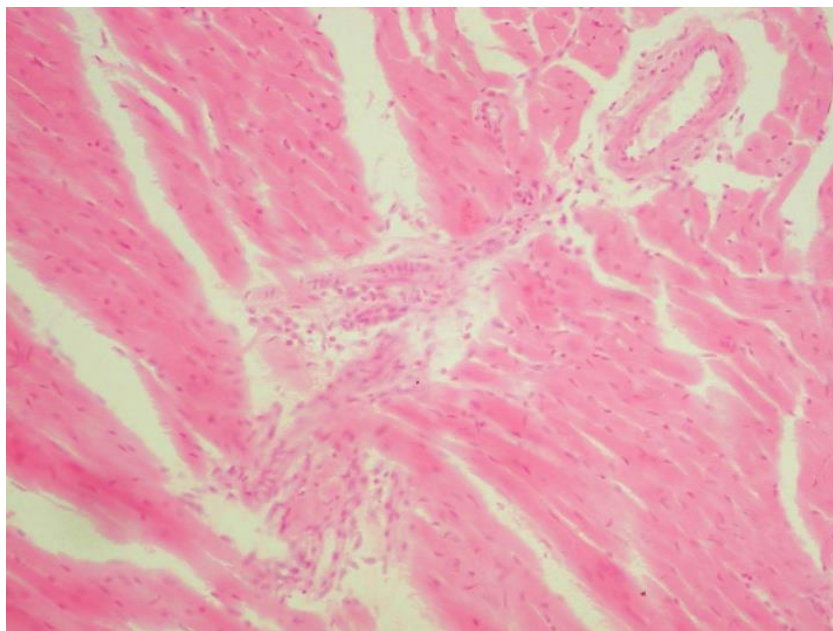


Рис. 5.12 Виражений набряк інтерстицію міокарда, периваскулярні лімфогістіоцитарні інфільтрати. Група 2.

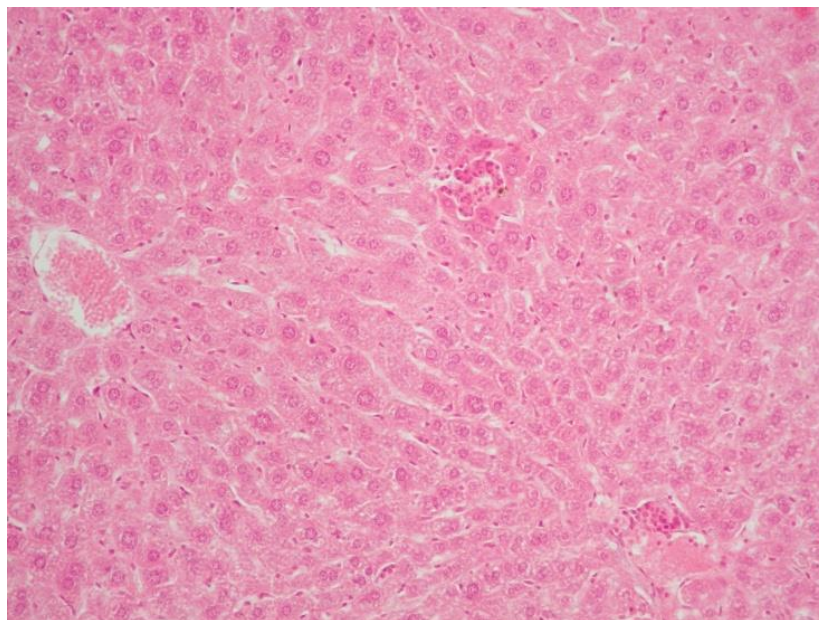


Рис. 5.13 Повнокров'я центральної вени дольки та вени портального тракту; дрібновогнищеві лімфогістіоцитарні інфільтрати портальних зон. Паренхіматозна дистрофія гепатоцитів. Група 2.

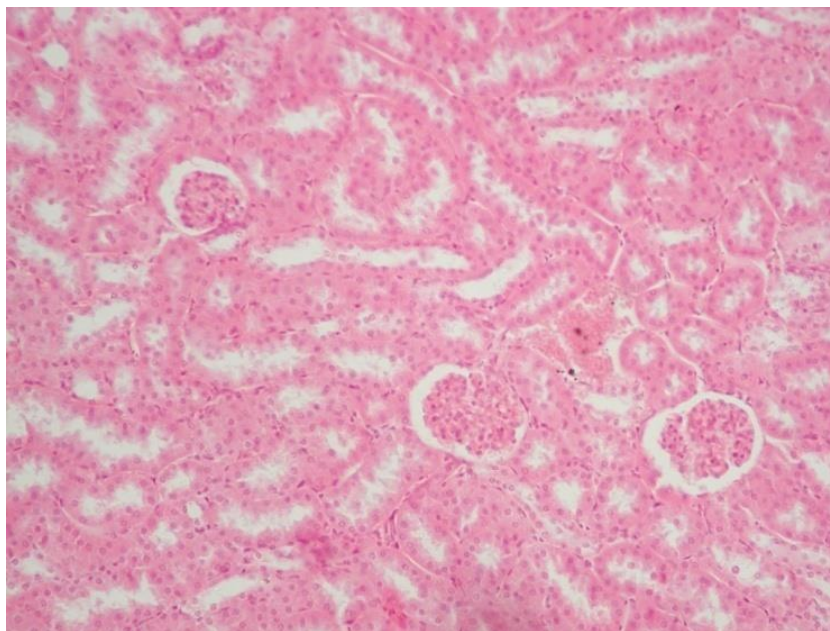


Рис. 5.14 Повнокров'я судин нирки; паренхіматозна дистрофія епітелію проксимальних канальців. Група 2.

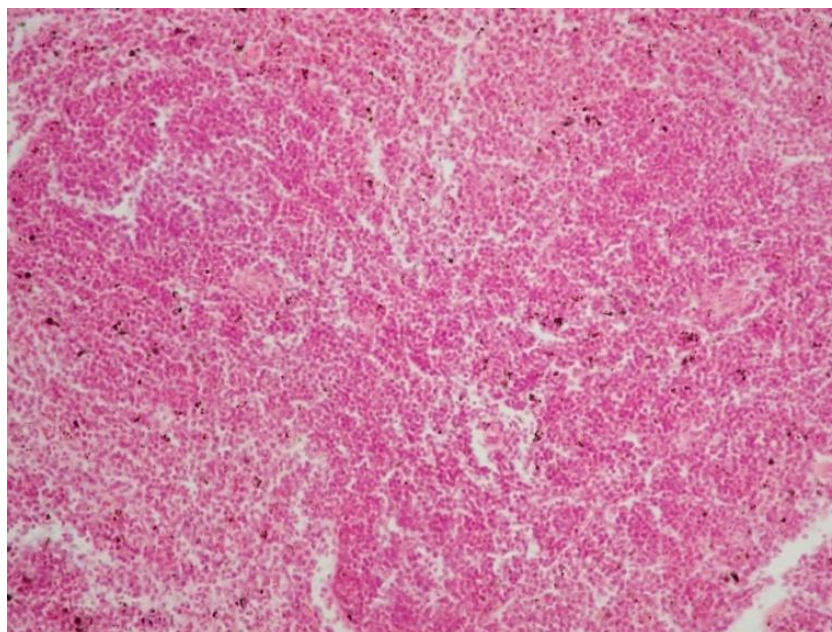


Рис. 5.15 Гіперплазія лімфоїдних фолікулів селезінки з плазмобластною трансформацією В-зон лімфоїдної тканини. Група 2.

Мікроскопічне дослідження тканин групи інфікованих тварин за дії синього спектра світлодіодного випромінювання на осередок запалення

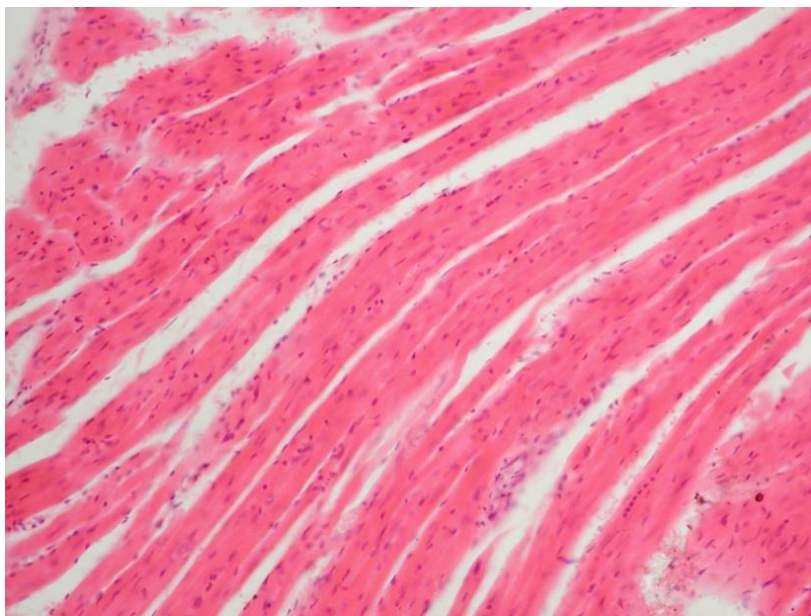


Рис. 5.16 Набряк стромы. Дрібновогнищевий периваскулярний інфільтрат. Група 3.

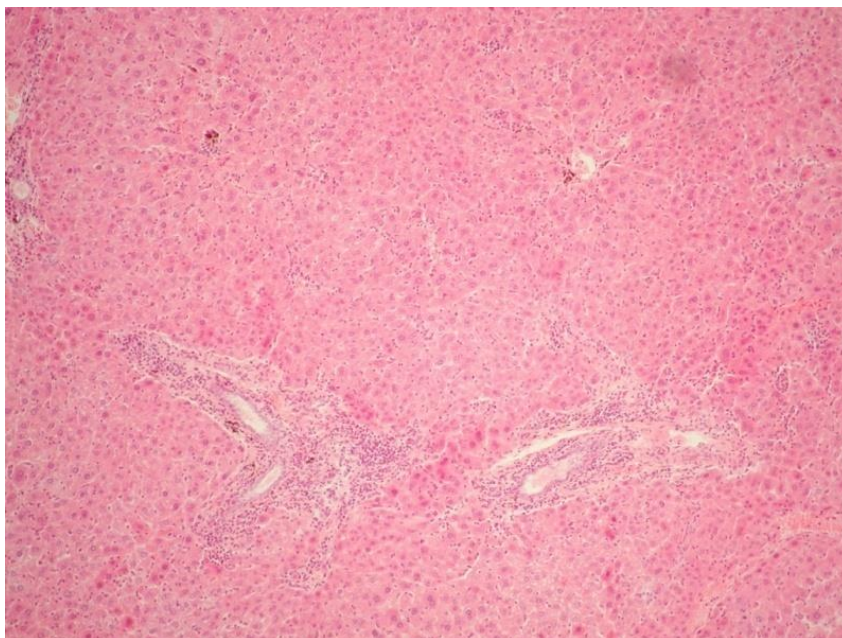


Рис. 5.17 Виражена запальна інфільтрація портальних трактів з поширенням на міждолькову строму. Дифузна гніздова проліферація купферовських клітин. Група 3.

Морфологічні зміни тканин групи лабораторних тварин з локалізованою гнійно-запальною протейною інфекцією за дії світлодіодного випромінювання червоного спектра

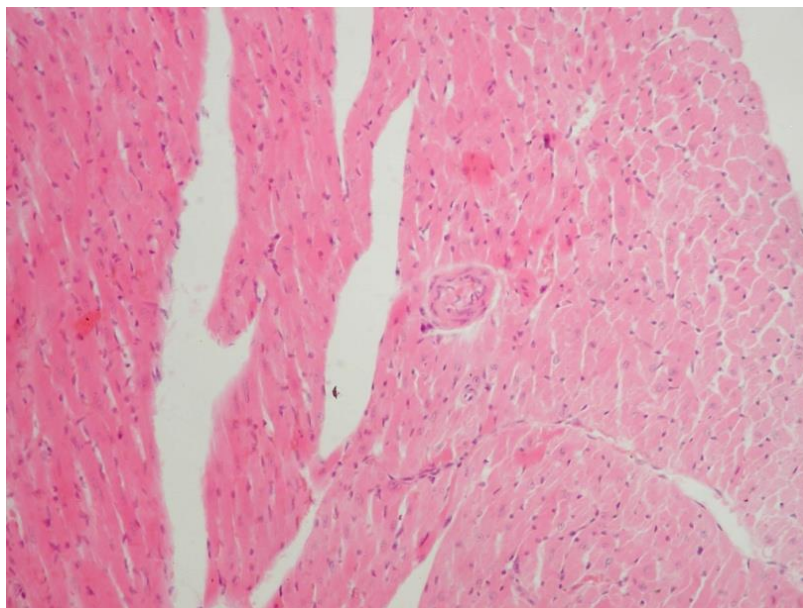


Рис. 5.18 набряк строми міокарда; вогнищева проліферація і десквамація ендотелію інтрамуральної артерії. Група 4.

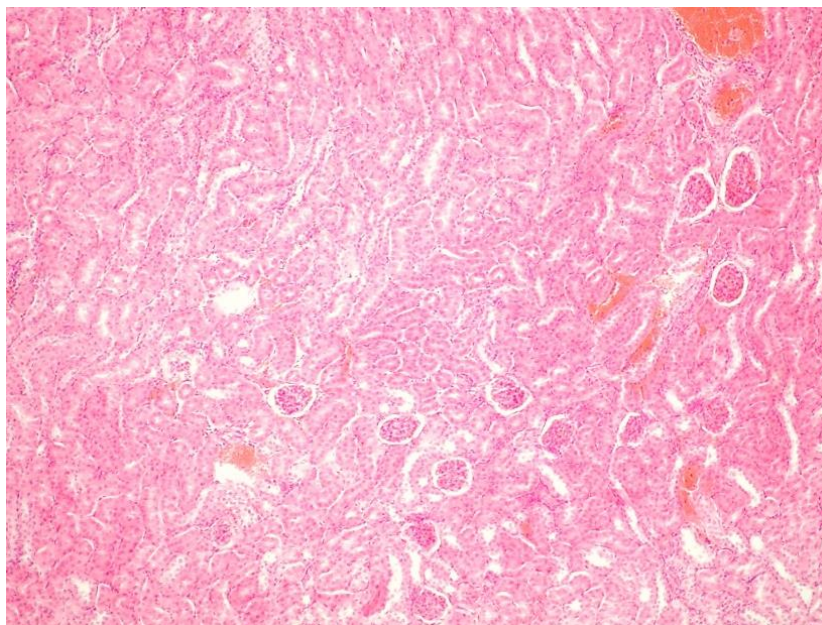


Рис. 5.19 Повнокров'я судин інтермедіарної зони, дрібновогнищеві лімфогістіоцитарні інфільтрати навколо судин. Група 4.

Морфологічні зміни тканин групи лабораторних тварин з локалізованою гнійно-запальною інфекцією з наступною терапією цефепімом

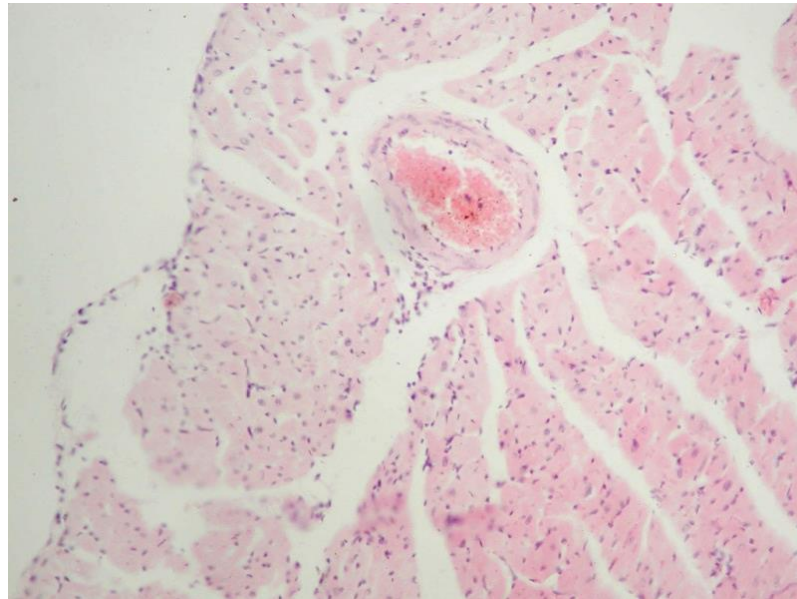


Рис. 5.20 Паренхіматозна дистрофія кардіоміоцитів; повнокров'я інтрамуральної артерії з дрібновогнищевим лімфогістіоцитарним інфільтратом в периваскулярній набряклій стромі. Група 5.

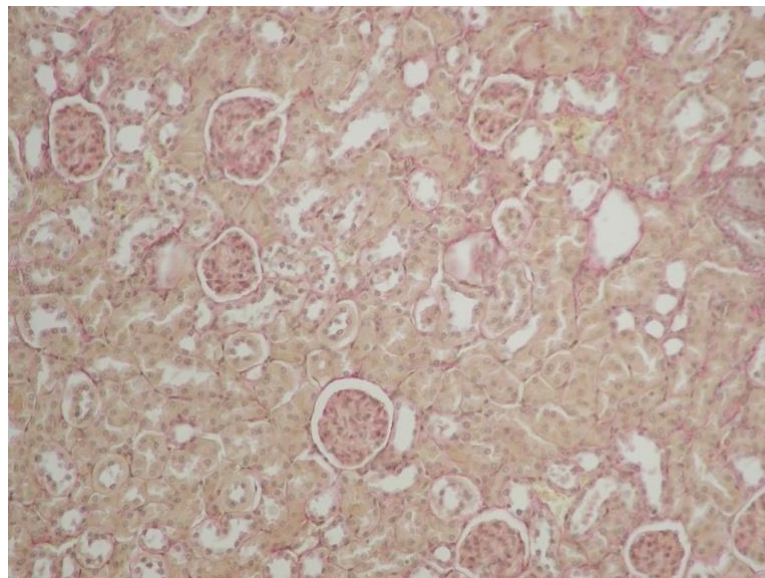


Рис. 5.21 Помірно фуксинофільні базальні мембрани капілярів клубочків, нефротелію капсул клубочків і каналців. Група 5.

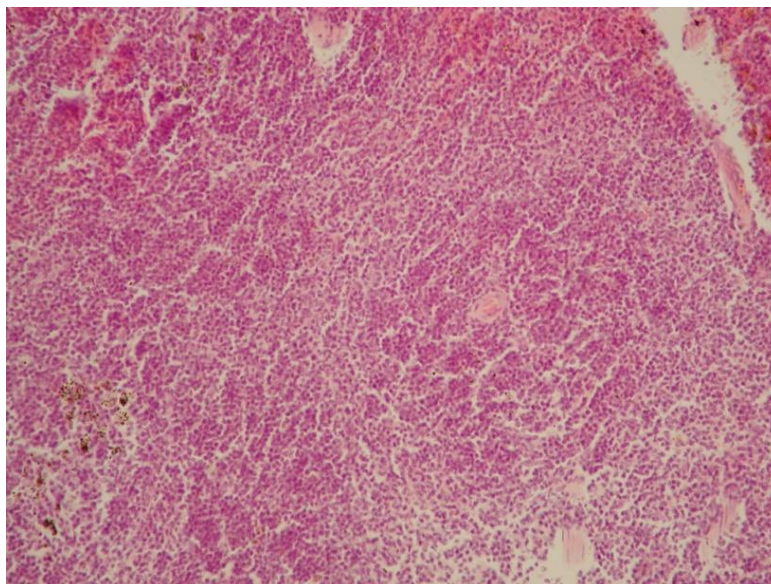


Рис. 5.22 Гіперпластичні процеси в В- і Т-залежних зонах лімфатичних фолікулів селезінки. Група 5.

Мікропрепарати тканин групи інфікованих тварин з комплексною терапією цефепімом й опроміненням осередку запалення синім світлодіодом

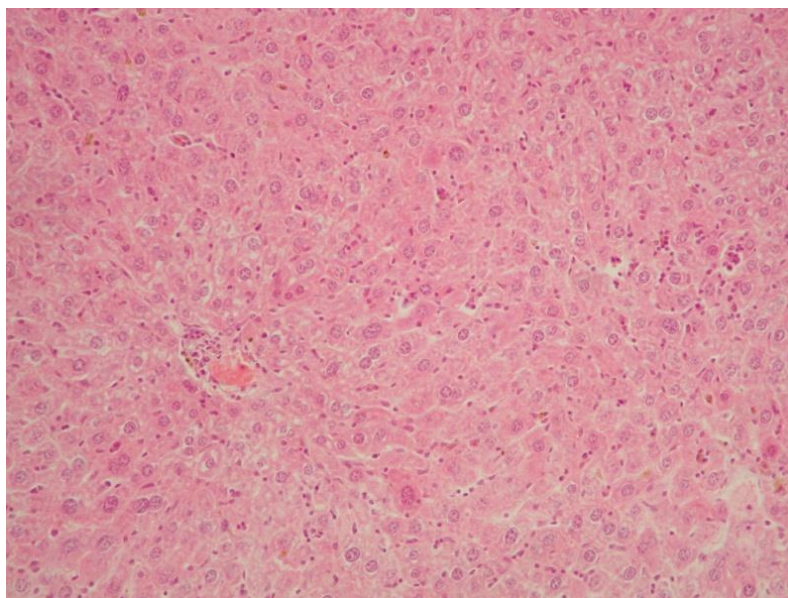


Рис. 5.23 Дрібновогнищевий периваскулярний лімфогістіоцитарний інфільтрат портального тракту. Гніздова проліферація купферовських клітин. Двоядерні гепатоцити. Група 6.

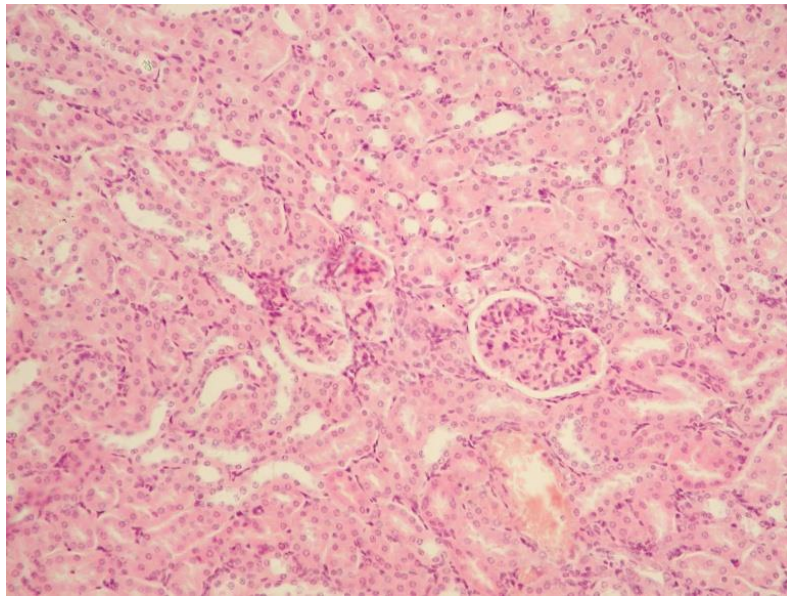


Рис. 5.24 Дрібновогнищеві лімфогістіоцитарні інфільтрати нирок. Паренхіматозна дистрофія епітелію проксимальних канальців. Група 6.

Мікропрепарати тканин групи інфікованих тварин з комплексною терапією цефепімом й опроміненням осередку запалення червоним світлом діодом

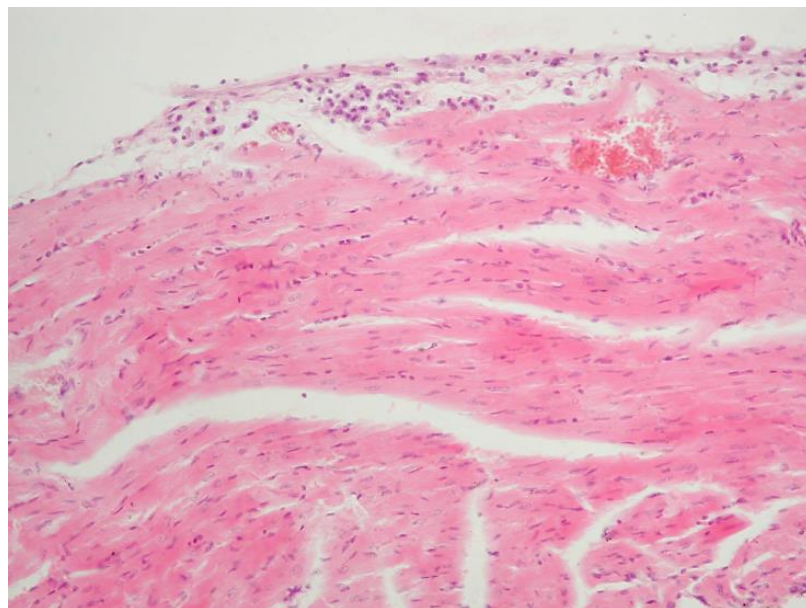


Рис. 5.25 Набряк стромы міокарда і епікарда, повнокров'я судин субепікардіальної зони; дрібновогнищева лімфо-макрофагальна інфільтрація епікарда. Група 7.

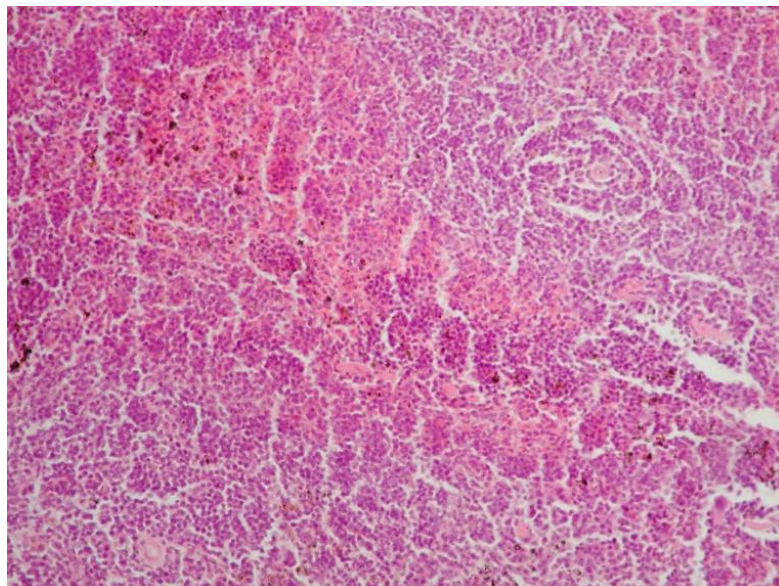


Рис. 5.26 Гіперплазія і плазмобластно-макрофагальна трансформація лімфоїдної тканини селезінки; повнокров'я червоної пульпи. Група 7.

Мікропрепарати тканин групи інфікованих тварин з комплексною терапією цефепімом й опроміненням осередку запалення синім та червоним світлодіодами

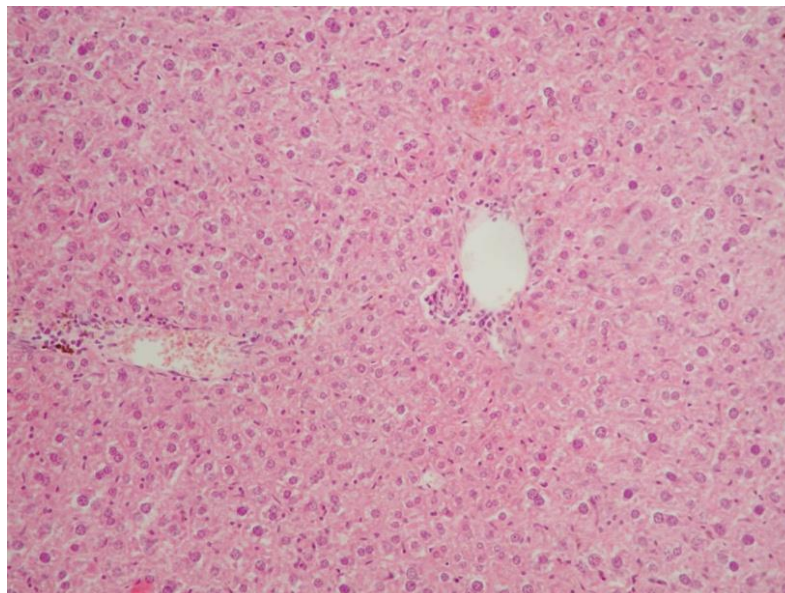


Рис. 5.27 Повнокров'я центральної вени дольки. Безліч двоядерних гепатоцитів. Група 8.

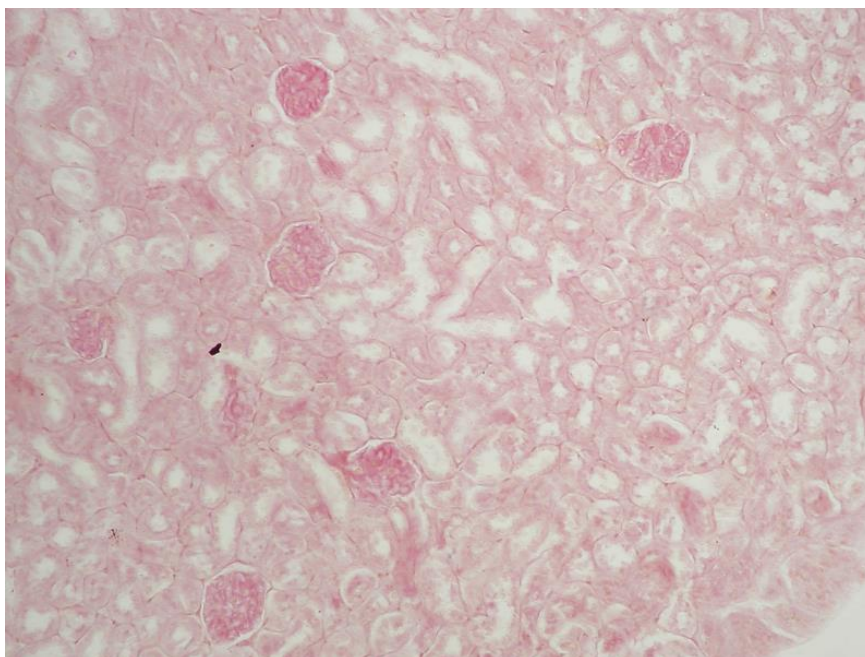


Рис. 5.28 Базальні мембрани капілярів клубочків, канальців. Група 8.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

(* - особистий внесок здобувача)

Монографія

1. Вплив світлодіодного випромінювання та протимікробних препаратів на мікроорганізми, збудники гнійно-запальних локалізованих процесів, і на стан фагоцитарної активності нейтрофілів: колективна монографія /М. М. Мішина, В. В. М'ясоєдов, Н. І. Філімонова, А. М. Коробов, М. М. Попов, О. С. Дубовик, С. Г. Маланчук, М. О. Ляпунов, О. В. Наумова. Харків: ХНМУ, 2014. 152 с. (* проведено дослідження щодо створення експериментальних моделей біоплівки мікроорганізмів; проведено дослідження щодо визначення впливу світлодіодного випромінювання та протимікробних препаратів на планктонні форми та біоплівки мікроорганізмів, збудників ГЗЗ; проведено дослідження з визначення інтегральних показників фагоцитозу у тварин; визначено утворення позаклітинних пасток під впливом оптичного випромінювання синього та червоного спектрів).

Статті у фахових виданнях

2. Дубовик О. С. Наумова О. В., Коробов А. М., М'ясоєдов В. В., Мішина М. М. Вплив світлодіодного випромінювання та протимікробних засобів на морфологічний стан тканин при локалізованому гнійно-запальному процесі. *Вісник проблем біології і медицини*. 2014. В.1 (106). С.246-251. (*досліджено морфологічний стан тканин експериментальних тварин при локалізованому гнійно-запальному процесі під дією світлодіодного випромінювання та антимікробних препаратів).

3. Дубовик О. С., Мішина М. М. Вплив світлодіодного випромінювання синього та червоного спектрів на імунітокіновий стан при гнійно-запальних процесах (експериментальне дослідження). *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2017. №4(6). С.13-19. (*досліджено особливості імунного та цитокінового стану під дією світлодіодного випромінювання та комплексного застосування із антимікробними препаратами при локалізованому гнійно-запальному процесі.)

4. Dubovyk O. S., Mishyna M. M., Malanchuk S. G., Kuzmenko A. M., Kozlov O.P. Definition of etiological antibiotic sensitivity factors in purulent-inflammatory processes. *Georgian Medical News*. 2017. No.10 (271). P.133-137 (*визначено антибіотикочутливість збудників у планктонній формі та формі біоплівки).

5. Дубовик О. С., Мішина М. М., Коробов А. М. Комбінована дія оптичного випромінювання синього й червоного спектрів та антисептичних препаратів на здатність до формування біоплівки ізолятами *Proteus mirabilis*. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2018. Т.3, №1 (10). С.253-257. (*визначено вплив оптичного випромінювання та антисептичних препаратів на ізоляти *Proteus mirabilis*).

6. Дубовик О. С., Мішина М. М., Коробов А. М. Оцінка впливу світлодіодного випромінювання на чутливість збудників гнійно-запальних процесів до протимікробних препаратів. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2018. Т.3, №2(11). С.232-236. (* визначено антибіотикочутливість збудників гнійно-запальних процесів).

Тези доповідей

7. Циганенко А. Я., Мішина М. М., Дубовик О. С., Мішин Ю. М. Вивчення ефективності дії фторхінолонів та цефалоспоринових на експериментально відтворені моделі змішаних біоплівок мікроорганізмів,

чинників гнійно-запальних інфекцій. *Актуальні проблеми сучасної медицини: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Медична наука – 2009»*. Полтава, 2009. №4.1(36). С. 234. (заочна участь).

8. Циганенко А. Я., Мішина М. М., Дубовик О. С., Мішин Ю. М. Вплив світлодіодного випромінювання на біоплівки ізолятів *Streptococcus pyogenes*. *Проблеми та еволюція епідеміологічного процесу і паразитарних систем провідних інфекцій сучасності: тези XV з'їзду Українського науково-медичного товариства мікробіологів, епідеміологів та паразитологів ім. Д.К. Заболотного*. Харків, 2011. С.114. (заочна участь).

9. Дубовик О. С., Мішин Ю. М., Аус.з.Абд.Аль. Здатність до плівкоутворення ізолятів *Proteus spp.* під впливом електромагнітного випромінювання оптичного діапазону. *Медицина третього тисячоліття: тези доповідей міжвузівської конференції молодих вчених та студентів (м. Харків, 17-18 січ. 2012 р.)*. Харків, 2012. С.7-8. (заочна участь).

10. Циганенко А. Я., Мішина М. М., Дубовик О. С., Мішин Ю. М. Застосування оптичного випромінювання при відтворенні біоплівок *S.aureus in vitro*. *Довкілля і здоров'я: матеріали науково-практичної конференції (м.Тернопіль, 27-28 квіт. 2012 р.)*. Тернопіль, 2012. С.83-84. (заочна участь).

11. Циганенко А. Я., Коробов А. М., Мішина М. М., Дубовик О. С., Глазунов А. В., Мішин Ю. М. Імуноморфологічний стан при експериментальному локалізованому гнійно-некротичному процесі та комбінованій терапії із застосуванням світлодіодного випромінювання. *Стратегія і тактика боротьби з інфекційними захворюваннями: тези доповідей науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів (м. Харків, 17-18 жов. 2012 р.)*. Харків, 2012. С.70. (заочна участь).

12. Циганенко А. Я., Коробов А. М., Мішина М. М., Дубовик О. С., Глазунов А. В., Мішин Ю. М. Експериментальне обґрунтування комплексного застосування хіміотерапевтичних препаратів та світлодіодного випромінювання. *Стратегія і тактика боротьби з інфекційними*

захворюваннями: тези доповідей науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів (м. Харків, 17-18 жов. 2012 р.). Харків, 2012. С. 69-70. (заочна участь).

13. Mishina M., Myasoedov V., Davydenko V., Korobov A., Dubovik E., Mozgova Y., Mishin Y. LED effects on *E.coli*'s ability to form biofilms and on phagocytic activity of neutrophils with NETs production in experimental localized pyoinflammatory processes [Electronic resource] 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Barcelona (Spain), 10 May 2014. (очна участь).

14. Дубовик О. С., Сорокіна І. В., Мішина М. М., Наумова О. В. Імуноморфологічні особливості при експериментальному гнійно-запальному процесі, спричиненому *P.mirabilis*. XV з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (м. Одеса, 11-15 вер. 2017 р.). Одеса, 2017. С. 190. (очна участь).

15. Дубовик О. С., Мішина М. М., Маланчук С. Г., Кузьменко А. М. Чутливість до антибактеріальних препаратів мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних процесів. *Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності*: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (м. Чернівці, 29 січ. 2018 р.). Чернівці, 2018. С.43-45. (очна участь).

Патенти України на корисну модель

16. Пат. UA № 80293 U, МПК' G09B 23/28, C12N 13/00, A61N 5/06. Спосіб визначення впливу випромінювання фотонної матриці Коробова на формування біоплівки мікроорганізмів *in vitro* /А. М. Коробов, А. Я. Циганенко, М. М. Мішина, О. С. Дубовик; заявник та патентовласник ХНУ ім.В.Н.Каразіна. № u201212578; заявл.05.11.2012; опубл. 27.05.2013, Бюл. №10.

17. Пат. UA № 80355 U, МПК' C12N 13/00, A61N 5/06. Пристрій для впливу оптичного випромінювання *in vitro* на патогенні бактерії/ А. М. Коробов, А. Я. Циганенко, М. М. Мішина, О. С. Дубовик; заявник та патентовласник ХНУ ім.В.Н.Каразіна. № u201213663; заявл.29.11.2012; опубл. 27.05.2013, Бюл. №10.

Інформаційний лист

18. Циганенко А. Я., Мішина М. М., Курбанов Р. А., Дубовик О. С. Удосконалення способу відтворення біоплівки мікроорганізмів *in vitro*. Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи. В.1 з проблеми «Вірусологія та мікробіологія». № 241. 2010. 4 с.