

ВИЗНАЧЕННЯ ВПЛИВУ СВІТЛОДІОДНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ СИНЬОГО Й ФІОЛЕТОВОГО СПЕКТРІВ НА БІОПЛІВКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Харківський національний медичний університет

Протягом тривалого часу проводяться дослідження щодо пошуку засобів, які зможуть блокувати формування біоплівок збудників нозокоміальних гнійно-запальних процесів та попередження формування вторинних біоплівок як фактора колонізації полірезистентних штамів *Pseudomonas aeruginosa*. Особливого значення надають впливу світлодіодного випромінювання на руйнування біоплівок та попередження формування біоплівок мікроорганізмами *in vitro*. Метою даного дослідження є вивчення впливу світлодіодного випромінювання синього та фіолетового спектрів на добові біоплівки *P. aeruginosa*. Здатність утворювати біоплівки визначали в полістиролових планшетах з попередньою синхронізацією періодичної культури штамів, що досліджувались. Оптичну щільність біоплівок вимірювали на спектрофотометрі «Multiskan EX 355», виражали в одиницях оптичної щільності (од.ощ.). Опромінення *in vitro* проводилось світлодіодними джерелами синього (450 - 480 нм) й фіолетового (380 - 430 нм) випромінювання фотонної матриці апарата Коробова «Барва-Флекс». При обробці результатів використовували статистичні програми «Statistica» і «Biostat». Проведено вивчення дії світлодіодного випромінювання синього та фіолетового спектрів на ізоляти *Pseudomonas aeruginosa*. Встановлено, що під впливом світлодіодного випромінювання спостерігається руйнування добових біоплівок з пригніченням здатності утворення планктонних клітин. При визначенні здатності до біоплівкоутворення планктонними клітинами *P. aeruginosa* після дії світлодіодного випромінювання фіолетового та синього спектрів встановлено, що вилучені планктонні клітини не здатні формувати щільні біоплівки, що є важливим фактом запобігання колонізації *P. aeruginosa* й для призначення адекватної комбінованої протимікробної терапії. Встановлено біодеструктивний вплив світлодіодного випромінювання 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.

Ключові слова: біоплівки, *Pseudomonas aeruginosa*, світлодіодне випромінювання синього та фіолетового спектрів.

Робота є фрагментом планової науково-дослідної тематики Харківського національного медичного університету кафедри мікробіології, вірусології та імунології: «Експериментальне мікробіологічне обґрунтування протимікробної терапії гнійно-запальних захворювань», № державної реєстрації 0114U003390.

Вступ

Протягом тривалого часу проводяться дослідження щодо пошуку засобів, які зможуть блокувати формування біоплівок збудників нозокоміальних гнійно-запальних процесів та попередження формування вторинних біоплівок як фактора колонізації полірезистентних штамів *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) [1, 3]. В даний час вплив на здатність до утворення біоплівок мікроорганізмами та на сформовані добові біоплівки розглядається як нова перспективна стратегія антимікробної терапії. У великій кількості лабораторій проводиться пошук методів і вивчення впливу різноманітних фізичних факторів, що пригнічують утворення біоплівок [2, 4]. Особливого значення надають впливу світлодіодного випромінювання на руйнування біоплівок та попередження формування біоплівок мікроорганізмами *in vitro*. Встановлено, що ефект впливу світла синього та фіолетового спектрів на біомакромолекули полягає у їх деградації з пригніченням біокаталітичної активності [5]. Але на сьогодні відсутні відомості впливу світлодіодного

випромінювання синього й фіолетового спектрів на біоплівки внутрішньолікарняних полірезистентних штамів *P. aeruginosa* із визначенням здатності планктонних клітин формувати нові біоплівки, як фактор колонізації та персистенції збудника гнійно-запального процесу.

Мета дослідження

Вивчення впливу світлодіодного випромінювання синього та фіолетового спектрів на добові біоплівки *P. aeruginosa*.

Об'єкт і методи дослідження

Здатність утворювати біоплівки визначали в полістиролових планшетах з попередньою синхронізацією періодичної культури штамів, що досліджувались. Синхронізація бактеріальної культури проводилася після встановлення кінетики росту асинхронної культури, шляхом селекції за методом Мітчисона і Вінсента. Оптичну щільність біоплівок вимірювали на спектрофотометрі «Multiskan EX 355», виражали в одиницях оптичної щільності (од.ощ.) [8]. Опромінення *in vitro* проводилось світлодіодними джерелами

синього (450 - 480 нм) й фіолетового (380 - 430 нм) випромінювання фотонної матриці апарата Коробова «Барва-Флекс», що містить світлодіодну матрицю з суперлюмінісцентними світлодіодами (24 шт.) й блок живлення [6]. При обробці результатів використовували статистичні програми «Statistica» й «Biostat» [7, 9].

Результати досліджень та їх обговорення

У результаті проведення дослідження впливу фіолетового та синього випромінювання на біоплівку після опромінення

aeruginosa протягом 10 хвилин спостерігається зниження оптичної щільності біоплівки у 3,8 рази порівняно з оптичною щільністю біоплівки *P. aeruginosa* до опромінення ($0,74 \pm 0,03$ й $2,81 \pm 0,46$ од.ощ. відповідно).

Аналогічні дані здобуті при вивченні дії світлодіодного випромінювання синього спектру протягом 10 хвилин на сформовані добові біоплівки *P. aeruginosa*: зафіксовано зниження показника оптичної щільності у 3,3 рази порівняно з таким до опромінення

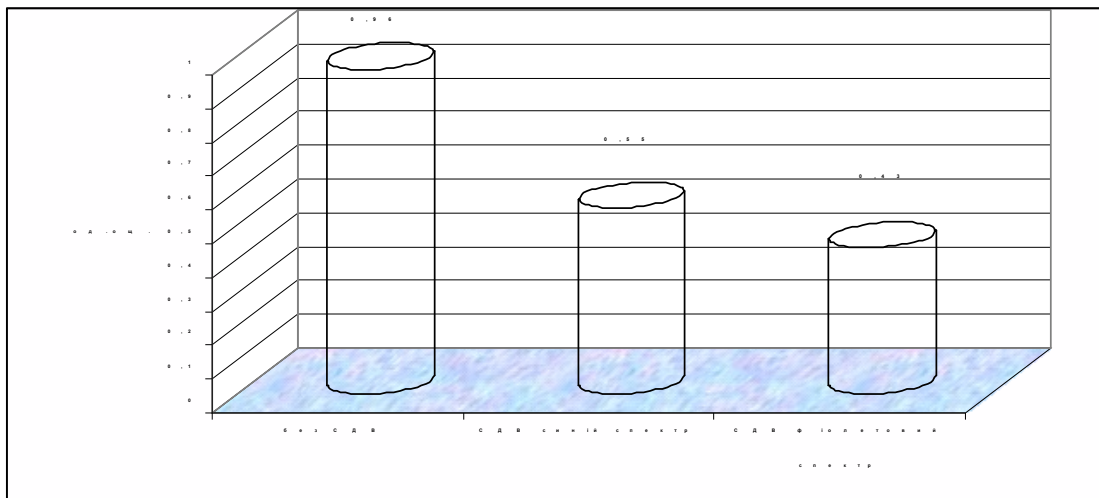
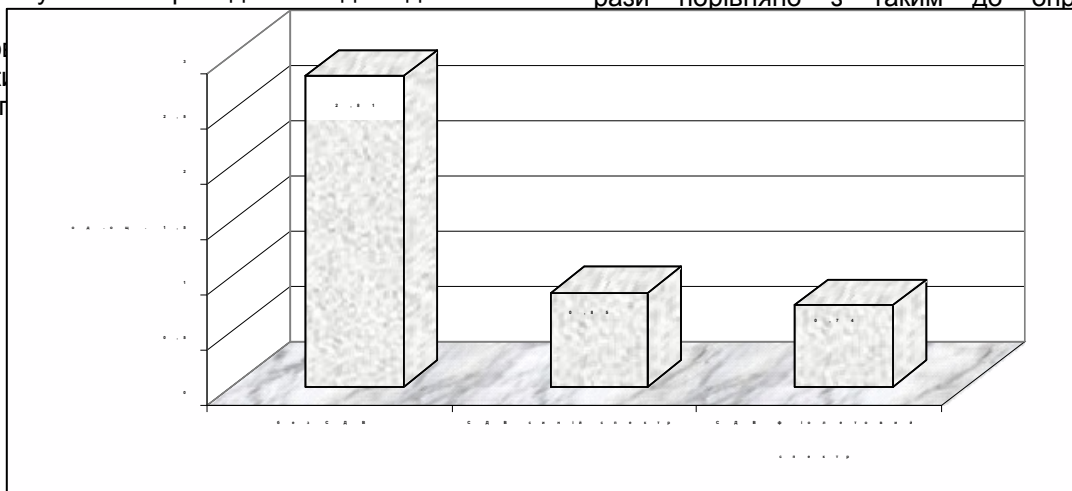


Рис. 2. Утворення планктонних клітин добовою біоплівкою *P. aeruginosa* за впливу світлодіодного випромінювання фіолетового та синього спектрів.

Як видно з рис. 2, вплив світлодіодного випромінювання фіолетового та синього спектрів призвів до пригнічення утворення планктонних клітин *P. aeruginosa*: $0,43 \pm 0,04$ од.ощ. і $0,55 \pm 0,03$ од.ощ. відповідно порівняно з контролем (без опромінення - $0,96 \pm 0,08$ од.ощ.).

При визначенні здатності до біоплівкоутворення планктонними клітинами *P. aeruginosa* після дії світлодіодного

випромінювання фіолетового та синього спектрів протягом 10 хвилин встановлено, що вилучені планктонні клітини не здатні формувати щільні біоплівки: $0,68 \pm 0,09$ й $0,89 \pm 0,06$ од.ощ. відповідно порівняно з контролем (без опромінення - $2,98 \pm 0,16$ од.ощ.), що є дуже важливим фактом запобігання колонізації *P. aeruginosa* й для призначення адекватної комбінованої протимікробної терапії (рис. 3).

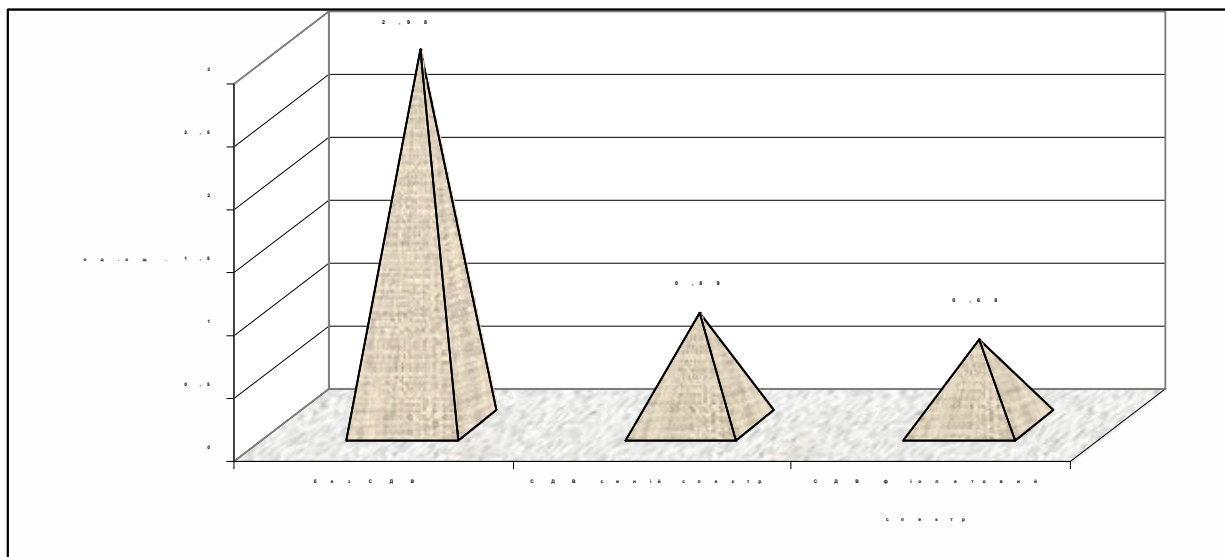


Рис. 3. Здатність до формування нових біоплівки планктонними клітинами за вплив світлодіодного випромінювання фіолетового та синього спектрів на добову біоплівку полірезистентних клінічних штамів *P. aeruginosa*.

Висновок

Встановлено біодеструктивний вплив світлодіодного випромінювання 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 проведення експериментальних досліджень визначення впливу світлодіодного випромінювання та протимікробних препаратів на добові біоплівки мікроорганізмів з розробкою схем комплексної терапії гнійно-запальних процесів.

Література

1. Балко О.Б. Вплив температурного фактора на особливості формування біоплівки бактеріями виду *Pseudomonas aeruginosa* / О.Б. Балко, Л.В. Авдєєва // Медицина сьогодні і завтра. – 2009. – № 3-4. – С. 23-27.
2. Батраков А.В. Клинико-лабораторное обоснование применения светодиодного излучения длиной волны 470nm в комплексном лечении больных : автореф. дис. на соискание научной степени канд. мед. наук : спец. 14.01.14 «Стоматология», 14.03.11 «Восстановительная медицина, спортивная медицина, лечебная физкультура, курортология и физиотерапия» / Батраков Андрей Владимирович. – Санкт-Петербург, 2011. – 27 с.
3. Белобородова Н.В. Влияние комбинации кларитромицина с имипенемом на формирование микробной биопленки *Pseudomonas Aeruginosa* / Н.В. Белобородова, И.Т. Байрамов, Д.О. Миленин // Инфекции в хирургии. – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 71–74.
4. Буравский А.В. Светодиодное излучение: результаты антимикробного фотодинамического воздействия в эксперименте in vitro / А.В. Буравский, Е.В. Баранов, Г.А. Скороход // Новые технологии в медицине. – 2014. – № 4. – С. 80 – 86.
5. Гейниц А.В. Фотодинамическая терапия. История создания метода и ее механизмы / А.В. Гейниц // Лазерная медицина. – 2007. – Т. 11, Вып. 3. – С. 42-46.

6. Коробов А.М. Фототерапевтические аппараты Коробова серии «Барва» / А.М. Коробов, В.А. Коробов, Т.А. Лесная. – Харьков : ИПП «Контраст», 2006. – 176 с.
7. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К. : МОРИОН, 2000. – 320 с.
8. Патент UA № 47944, G09B 23/00. Циганенко А.Я., Мишина М.М., Курбанов Р.А. Способ видтворення біоплівок мікроорганізмів in vitro. Патент на корисну модель № 47944, МПК G09B23/00, ХНМУ, Заявл.12.10.2009, № u200910353; Опубл. 25.02.2010, Бюл. № 4, 2010.
9. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – Москва : МедиаСфера, 2003. – 312 с.

References

1. Balko O.B. Vpliv temperaturnogo faktora na osoblivosti formuvannya bioplivki bakterijami vidu *Pseudomonas aeruginosa* / O.B. Balko, L.V. Avdeeva // Medicina s'ogodni i zavtra. – 2009. – № 3-4. – С. 23-27.
2. Batrakov A.V. Kliniko-laboratornoe obosnovanie primeneniya svetodiodnogo izlucheniya dlinoj volny 470nm v kompleksnom lechenii bol'nyh : avtoref. dis. na soiskanie nauchnoj stepeni kand. med. nauk : spec. 14.01.14 «Stomatologija», 14.03.11 «Vosstanovitel'naja medicina, sportivnaja medicina, lecebnaia fizkul'tura, kurortologija i fizioterapija» / Batrakov Andrej Vladimirovich. – Sankt-Peterburg, 2011. – 27 s.
3. Beloborodova N.V. Vlijanie kombinacii klaritromicina s imipenemom na formirovanie mикробnoj bioplénki *Pseudomonas Aeruginosa* / N.V. Beloborodova, I.T. Bajramov, D.O. Milenin // Infekcii v hirurгии. – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 71–74.
4. Buravskij A.V. Svetodiodnoe izluchenie: rezul'taty antimikrobnogo fotodinamicheskogo vozdejstvija v jekspirimente in vitro / A.V. Buravskij, E.V. Baranov, G.A. Skorohod // Novye tehnologii v medicине. – 2014. – № 4. – С. 80 – 86.
5. Gejnic A.V. Fotodinamicheskaja terapija. Istorija sozdanija metoda i ee mehanizmy / A.V. Gejnic // Lazernaja medicina. – 2007. – Т. 11, Вып. 3. – С. 42-46.
6. Korobov A.M. Fototerapevticheskie apparaty Korobova serii «Barva» / A.M. Korobov, V.A. Korobov, T.A. Lesnaja. – Har'kov : IPP «Kontrast», 2006. – 176 s.
7. Lapach S.N. Statisticheskie metody v mediko-biologicheskij issledovanijah s ispol'zovaniem Excel / S.N. Lapach, A.V. Chubenko, P.N. Babich. – K. : MORION, 2000. – 320 s.
8. Patent UA № 47944, G09V 23/00. Ciganenko A.Ja., Mishina M.M., Kurbanov R.A. Sposib vidtvorennya bioplivok mikroorganizmiv in vitro. Patent na korisnu model' № 47944, MPK G09B23/00, HNМУ, Zajavl.12.10.2009, № u200910353; Opubl. 25.02.2010, Bjuł. № 4, 2010.
9. Rebrova O.Ju. Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh programm STATISTICA / O.Ju. Rebrova. – Moskva : MediaSfera, 2003. – 312 s.

Реферат

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СВЕТОДИОДНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ СИНЕГО И ФИОЛЕТОВОГО СПЕКТРОВ НА БИОПЛЕНКИ PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Мишина М.М.

Ключевые слова: биопленки, *Pseudomonas aeruginosa*, светодиодное излучение синего и фиолетового спектров.

В течение длительного времени проводятся исследования по поиску средств, которые смогли бы блокировать формирование биопленок возбудителей нозокомиальных гнойно-воспалительных процессов и предупреждать формирование вторичных биопленок как фактора колонизации полирезистентных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. Особое значение придается влиянию светодиодного излучения на разрушение биопленок и предупреждению формирования биопленок микроорганизмами *in vitro*. Целью данного исследования явилось изучение влияния светодиодного излучения синего и фиолетового спектров на суточные биопленки *P. aeruginosa*. Способность образовывать биопленки определяли в полистироловых планшетах с предыдущей синхронизацией периодических культур исследуемых штаммов. Оптическую плотность биопленок измеряли на спектрофотометре «Multiskan EX 355», выражали в единицах оптической плотности. Облучение *in vitro* проводили светодиодными источниками синего (450 - 480 нм) и фиолетового (380 - 430 нм) излучения фотонной матрицы аппарата Коробова «Барва-Флекс». При обработке результатов использовали статистические программы «Statistica» и «Biostat». Проведено изучение действия светодиодного излучения синего и фиолетового спектров на изоляты *Pseudomonas aeruginosa*. Установлено, что под влиянием светодиодного излучения наблюдается разрушение суточных биопленок с угнетением способности образования планктонных клеток. При определении способности к биопленкообразованию планктонными клетками *P. aeruginosa* после воздействия светодиодного излучения фиолетового и синего спектров установлено, что извлеченные планктонные клетки не способны формировать плотные биопленки, что является важным фактом предотвращения колонизации *P. aeruginosa* и для назначения адекватной комбинированной противомикробной терапии. Установлено биодеструктивное влияние светодиодного излучения на плотные биопленки полирезистентных штаммов *P. aeruginosa*. На основании проведенного исследования предложено применение светодиодного излучения синего и фиолетового спектров в составе комплексной противомикробной терапии гнойно-воспалительных процессов в целях предупреждения колонизации *P. aeruginosa* и распространения нозокомиальных инфекций.

Summary

DETERMINING OF BLUE AND VIOLET LIGHT-EMISSION RADIATION ON PSEUDOMONAS AERUGINOSA BIOFILMS

Mishyna M.M.

Key words: biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, blue and violet LED emission.

Numerous researches have been aimed at searching for treatment which would enable to block the formation of biofilms in nosocomial pathogens of pyo-inflammatory processes and prevent the occurrence of secondary biofilms as a site for colonization with multi-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. The role of LED radiation in destructing biofilms and in preventing their formation deserves of particular attention. The aim of the present research is to study the influence of blue and violet LED radiation on *P. aeruginosa* daily biofilms. Materials and methods. The ability to form biofilms was studied in polystyrene plates with the previous culture synchronization. Optical density of biofilms was measured by a spectrophotometer «Multiskan EX 355" and calculated in units of optical density. Irradiation *in vitro* was conducted with LED sources of blue (450 - 480 nm) and violet (380 - 430 nm) radiation in Korobov photonic device matrix «Barva-Flex". Statistic processing of obtained results was performed by «Statistica» and «Biostat» programs. Results. The study of the action produced by blue and violet LED emission on *Pseudomonas aeruginosa* isolates showed that after LED exposure there was destruction of daily biofilms together with inhibition of planktonic cells development. Evaluating the ability of *P.aeruginosa* planktonic cells to form biofilms after exposure of blue and violet LED emission, we found the planktonic cells were unable to form dense biofilms, and this was an important fact for preventing *P.aeruginosa* colonization and admitting an adequate antimicrobial therapy. Conclusions. Biodestructive effect of LED emission on dense biofilms of *P. aeruginosa* of multi-resistant strains has been proved. Blue and violet LED combined with antimicrobial therapy of pyo-inflammatory processes enables to prevent *P. aeruginosa* colonization and spread of nosocomial infections.