

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ім. І.І. МЕЧНИКОВА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»**

САРКІС-ІВАНОВА ВЛАДИСЛАВА ВАДИМІВНА

УДК 579.841.11:579.262: 615.281(043.3)

**АНТИМІКРОБНА ДІЯ ХІМІОТЕРАПЕВТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА
ФІЗИЧНИХ ЧИННИКІВ НА РІЗНІ ФОРМИ ІСНУВАННЯ ПОПУЛЯЦІЇ
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

03.00.07 – мікробіологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Харків – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Державній установі «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України».

Науковий керівник: кандидат медичних наук, старший науковий співробітник **Скляр Надія Іванівна**, Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України», заступник директора з наукової роботи

Офіційний опонент: доктор медичних наук, професор **Філімонова Наталія Ігорівна**, Національний фармацевтичний університет МОЗ України, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології;

Офіційний опонент: доктор медичних наук, професор **Кременчуцький Геннадій Миколайович**, ДЗ "Дніпропетровська медична академія МОЗ України", професор кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології.

Захист відбудеться « 22 » квітня 2020 року о « 14.00 » годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» за адресою: 61057, м. Харків, вул. Пушкінська, 14-16.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (61057, м. Харків, вул. Пушкінська, 14-16).

Автореферат розісланий « 20 » березня 2020 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01,
кандидат медичних наук



І.А. Воронкіна

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Боротьба з інфекціями, етіологічним чинником яких є *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), і досі не втратила своєї актуальності. Адаптація та виживання бактерії, природна стійкість до різних класів антибіотиків несуть у собі небезпеку для життя хворих і розглядаються у світі як загроза громадському здоров'ю (Moradali M.F., 2017; Thaden J.T. et al., 2017). Вивчення етіологічної структури гнійно-запальних захворювань, післяопераційних ускладнень, шпитальних інфекцій та ін. за результатами останніх міжнародних багатоцентрових досліджень показало провідну роль грамнегативних бактерій, зокрема, *P. aeruginosa* (Agodi A. et al., 2018; Gomila A. et al., 2018; Venkataraman R. et al., 2018). Клінічно важливою особливістю вказаних бактерій є висока швидкість розвитку резистентності до різноманітних класів протимікробних засобів. В останнє десятиріччя процент мультиантибіотикорезистентних штамів невпинно зростає (Салманов А.Г., 2017). Кризовий стан монотерапії антисиньогнійними препаратами спонукає розглядати комбіновану антибіотикотерапію як один з ефективних методів боротьби з цією патологією.

P. aeruginosa є бактеріями з убіквітарним розповсюдженням, що здатні вегетувати навіть у оліготрофних умовах. Потрапивши в умови закритого приміщення, наприклад лікарняного стаціонару, вони не тільки добре зберігаються, але можуть навіть розмножуватися в будь-яких вологих місцях, контамінувати найрізноманітніші розчини (в тому числі й дезінфектанти), обладнання (в тих місцях, де можливий застій рідини) і поверхні (Peleg A.Y., Hooper D.C., 2010).

Важливою особливістю штамів *P. aeruginosa* є надзвичайно висока здатність до формування біоплівки, структура та фізіологічні властивості якої забезпечують оптимальні умови для вивільнення патогенного та колонізаційного потенціалу бактерій. Стан біоплівки сприяє збереженню метаболічно неактивної частини популяції, що має дуже низький рівень чутливості до впливу більшості антибіотиків (O'Toole G., 2000; Tolker-Nielsen T., 2014; Flemming H.C. et al., 2016).

Процес утворення біоплівок є підґрунтям багатьох затяжних і хронічних бактеріальних інфекцій, адже відбувається знищення імунних ефекторних механізмів господаря, що дозволяє патогенам виживати у несприятливих середовищах, розмножуватись і колонізувати нові ніші. Нещодавно навіть введено новий термін для означення захворювань, пов'язаних з біоплівками – «*biofilm-related disease*» (Del Pozo J.L., 2018). Як правило, має високу здатність до утворення біоплівок нозокоміальна мікрофлора, що відіграє провідну роль у патогенезі післяопераційних інфекційних ускладнень та будь-яких інфекцій, пов'язаних з наданням медичної допомоги.

Наведене обґрунтовує доцільність пошуку засобів контролю процесу утворення біоплівок в культурах *P. aeruginosa*, що можуть бути використані для підвищення ефективності антибіотикотерапії при синьогнійній інфекції та/або деконтамінації медичного обладнання й інших об'єктів шпитального середовища. Актуальним є розробка і впровадження нових технологій, здатних

як гальмувати процес біоплівкоутворення, так і руйнувати сформовані біоплівки. У цьому плані зростає інтерес до застосування комбінацій чинників, зокрема фізичних та хімічних. Окрему увагу заслуговує електронно-пучкова обробка контамінованих мікроорганізмами матеріалів. Цей напрям наукових досліджень стрімко розвивається завдяки ряду переваг перед традиційними технологіями – миттєвість дії, відсутність витратних матеріалів, безпечність, низькі енерговитрати, універсальність, відсутність теплового ефекту, тощо. В Україні у попередні роки не виконувались наукові дослідження щодо вивчення післядії потоку релятивістських електронів на мікроорганізми, що підтверджує пріоритетність та актуальність роботи.

Ефективних засобів, що впливають на процес утворення біоплівок *P. aeruginosa*, та руйнують сформовані біоплівки, нині не існує. Тому пошук фармацевтичних засобів, що окрім протимікробних властивостей володіють біоплівкоруйнуючими властивостями, є нині актуальною проблемою, що потребує нагального вирішення. У цьому сенсі перспективним є вивчення комбінацій хіміотерапевтичних засобів, фотосенсибілізаторів та опромінення, тощо.

Таким чином, вивчення біологічних властивостей, чутливості до хіміотерапевтичних препаратів, дослідження засобів та способів, що впливають на процеси біоплівкоутворення ізолятів *P. aeruginosa*, обґрунтовує актуальність обраної теми дисертації.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідних робіт (НДР) Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України: «Дослідження особливостей взаємодій антимікробних пептидів з мішенями» № держреєстрації 0113U001516; «Вивчення біологічних ефектів дії потоку релятивістських електронів», № держреєстрації 0116U000865. Дисертант є співавтором та виконавцем визначених тем НДР. Проаналізовано наукову літературу, організовано та проведено лабораторні дослідження. Проведено систематизацію та статистичну обробку отриманих результатів.

Мета і задачі дослідження. Мета: підвищення ефективності лікування синьогнійної інфекції та знезараження контамінованих її збудником поверхонь на основі мікробіологічного обґрунтування відбору і застосування хіміотерапевтичних препаратів, фізичних чинників та їх комбінацій з найбільшою здатністю пригнічення біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa*.

Задачі дослідження:

1. Вивчити біологічні та біоплівкоутворюючі властивості циркулюючих штамів *P. aeruginosa*, вилучених з різних екотопів;
2. Дослідити антибіотикочутливість вилучених штамів *P. aeruginosa* у різних формах існування популяції;
3. Експериментально визначити протимікробну ефективність комбінацій антисиньогнійних препаратів та їх вплив на біоплівкоутворення штамів *P. aeruginosa*;

4. Охарактеризувати ефекти комбінованої дії хіміотерапевтичного препарату та фізичних чинників (фотодинамічний вплив) на біологічні властивості штамів *P. aeruginosa*;
5. Експериментально дослідити ефективність фотодинамічної терапії (ФДТ) при лікуванні змодельованих променевиx ушкоджень шкіри, інфікованих штамами *P. aeruginosa*;
6. Вивчити вплив окремих фізичних факторів (потокy релятивістських електронів) на біологічні властивості штамів *P. aeruginosa*.

Об'єкт дослідження: життєздатність, біологічні властивості та біоплівкоутворююча здатність штамів *P. aeruginosa*.

Предмет дослідження: протимікробний та біоплівкопригнічуючий ефект хіміотерапевтичних препаратів, фізичних чинників та їх комбінацій.

Методи дослідження: мікробіологічні (визначення ростових, культуральних, біохімічних властивостей; чутливість до антибіотиків та комбінацій антисиньогнійних препаратів у різних формах існування популяції *P. aeruginosa* - планктонна форма, стан формування біоплівки, сформовані біоплівки; *in vitro* та *in vivo*), біологічні (вірулентність тест-штамів за впливу фізико-хімічних чинників на моделі інфікованої променевої виразки шкіри лабораторних щурів), фізико-хімічні (фотодинамічний вплив на біоплівки штамів *P. aeruginosa in vitro* та *in vivo*), фізичні (вплив потокy релятивістських електронів на біологічні властивості тест-штамів *P. aeruginosa*), математико-статистичні (статистичний аналіз отриманих результатів).

Наукова новизна одержаних результатів. Отримані нові наукові дані щодо антибіотикочутливості циркулюючих штамів *P. aeruginosa* у планктонній формі, стані формування біоплівки та сформованої біоплівки. Встановлено, що мінімальна інгібуюча концентрація антибіотиків щодо бактерій у стані формування біоплівки підвищувалась у 8-16 разів у порівнянні з такою, визначеною для планктонних форм тест-штамів. Ефективно вплинути на сформовані біоплівки не вдалося при підвищенні концентрацій діючих речовин у 128-1024 разів.

Вперше, з урахуванням даних про молекулярний механізм дії, визначені комбінації антибіотиків та катіонних поліпептидів, що мають синергійний протимікробний ефект та запобігають утворенню біоплівок штамів *P. aeruginosa*.

Вперше показано пригнічення здатності до утворення біоплівок штамами *P. aeruginosa* комбінованою дією фотосенсибілізатора (метиленового синього) і немонохроматичного фотодіодного опромінення. Встановлені параметри бактерицидної дії складових ФДТ щодо референтного та циркулюючих штамів синьогнійної палички – використання 0,1 % водного розчину метиленового синього та опромінення світлодіодним червоним світлом ($\lambda = 630-650$ нм) при експозиції 30 хвилин.

Отримані *in vitro* результати було підтверджено на моделі інфікованої штамами *P. aeruginosa* променевої виразки шкіри лабораторних щурів. Так, вперше експериментальним шляхом встановлено, що ФДТ є ефективною проти полірезистентних штамів синьогнійної палички з високою здатністю до

біоплівкоутворення. Визначено, що антибактеріальна ефективність ФДТ залежить від ступеню вірулентності мікроорганізмів.

Отримано нові наукові дані щодо чутливості тест-штамів *P. aeruginosa* за впливу різних поглинутих доз релятивістських електронів. Встановлено практично лінійну залежність між дозою опромінення та зниженням кількості життєздатних бактерій. Показано, що бактеріостатична післядія електронного пучка спостерігалась при енергетичних навантаженнях від 0,8 до 3,8 кГр. Бактерицидний ефект спостерігався після опромінення тест-штамів дозами, починаючи з 4,0 кГр.

Вперше з'ясовано вектор та силу змін біологічних властивостей штамів *P. aeruginosa* за впливу сублетальних доз потоку релятивістських електронів. Вперше *in vitro* та *in vivo* показано зниження вірулентних властивостей тест-штамів, що отримали сублетальну дозу опромінення потоком релятивістських електронів. За впливу сублетальних доз фізичного чинника визначено пригнічення біоплівкоутворюючої здатності тест-штамів синьогнійних паличок у 1,7 – 6,6 рази.

Практичне значення отриманих результатів. Запропонована протимікробна композиція для інгібування біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa* (патент України на корисну модель № 82743). Застосування антибіотика, який в сублетальних концентраціях руйнує зовнішню мембрану бактерії, в комбінації з антибіотиком, який через резистентність сам по собі не є ефективним, розширює терапевтичні можливості і підвищують терапевтичну ефективність обох антибіотиків.

Вперше запропоновано доступну, безпечну та дієву технологію лікування інфікованих місцевих променевиких виразок шкіри, де етіологічним чинником виступають антибіотикорезистентні, з високою здатністю до біоплівкоутворення штами синьогнійної палички. Вплив оптичного опромінення та фотосенсибілізатора на інфіковану ділянку шкіри створює бактерицидний ефект, активує репаративні процеси в опроміненій ділянці та зменшує місцеве запалення, що призводить до загоювання виразки. Визначені параметри застосування ФДТ, що складається із двох етапів. На першому етапі на поверхню інфікованої променевої виразки наносять шар фотосенсибілізатора метиленового синього з експозицією 30 хв, після чого опромінюють фотонним випроміненням при довжині хвилі 630 нм протягом 30 хв. Другий етап здійснюється на 6-ту добу після першого сеансу ФДТ у разі відсутності повної елімінації мікроорганізмів після одного сеансу опромінення.

Вперше визначено режими роботи електронного прискорювача, які забезпечують бактеріостатичний та бактерицидний ефект щодо тест-штамів *Pseudomonas aeruginosa* у модельних зразках. Підтверджено екологічну безпечність електронно-пучкової обробки контамінованих синьогнійною паличкою об'єктів.

Результати дослідження впроваджено у науково-педагогічний процес на кафедрах Харківського національного медичного університету (акти впровадження від 24.10.2018 р.; 20.11.2018 р.; 19.12.2018 р. та 18.12.2018 р.), ДУ «Дніпропетровська медична академія України» (акт впровадження від

14.03.2018 р.); Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (акт впровадження від 20.03.2018 р.); ВДНЗ «Українська медична стоматологічна академія» (акт впровадження від 28.08.2018 р.); Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця (акт впровадження від 14.09.2018 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертантом було самостійно проаналізовано та узагальнено дані літератури за темою дисертації та виконано патентно-інформаційний пошук. Разом із науковим керівником к. мед. н., с. н. с. Н. І. Скляр сформульовано тему, мету та завдання, було розроблено методологічну структуру ходу виконання роботи. Особисто здобувачем ідентифіковані та досліджені на чутливість до антибактеріальних препаратів штами *P.aeruginosa*; вивчена їх здатність до біоплівкоутворення за впливу хіміотерапевтичних препаратів та фізичних чинників. Здобувачем особисто відібрано та упорядковано до зберігання в колекціях 116 клінічних штамів *P.aeruginosa* із різними профілями антибіотикорезистентності.

Сумісно зі співробітниками лабораторії патофізіології та експериментальної терапії радіаційних уражень Державної установи «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва Національної академії медичних наук України» (ДУ «ІМР НАМН») проведено моделювання променевої виразки шкіри у лабораторних щурів. Автор висловлює подяку за допомогу у виконанні робіт з вивчення фотодинамічного впливу на тест-штами *P.aeruginosa* д. мед. н., професору Л. І. Сімоновій-Пушкар.

Автором здійснено аналіз та узагальнення результатів проведених досліджень, виконана статистична обробка отриманих результатів дослідження за допомогою методів математичної статистики. Здобувачем визначено основні практичні та теоретичні положення, надано практичні рекомендації та висновки, впроваджено матеріали дослідження в педагогічний процес.

Персональний внесок автора у всіх опублікованих зі співавторами працях наведено за текстом дисертації та в авторефераті у списку публікацій.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи обговорювалися та доповідалися на: науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів «Стратегія і тактика боротьби з інфекційними захворюваннями» (Харків, 2012); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасний стан і проблеми інфекційної захворюваності в Україні», присвяченої 125-річчю з дня народження академіка Л. В. Громашевського (Київ, 2012); науково-практичній конференції молодих вчених Національної академії медичних наук України, присвяченій 20-літтю створення Академії (Київ, 2013); XIII та XV з'їздах Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (Ялта, 2013; Одеса, 2017); міжвузівських конференціях молодих вчених та студентів «Медицина третього тисячоліття» (Харків, 2017, 2019); науково-практичній конференції, присвяченій пам'яті академіка Л.В. Громашевського та 120-річчю ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України» «Інфекційні хвороби сучасності. Біологічна безпека та біозахист» (Київ, 2016); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Екологічні та гігієнічні

проблеми сфери життєдіяльності людини» (Київ, 2019); науково-практичній конференції з міжнародною участю "Перший національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів, паразитологів" (Харків, 2019).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 20 наукових праць (3 одноосібно), серед них розділ у зарубіжній колективній монографії, 6 статей (5 – у фахових виданнях України, 1 – у міжнародному виданні, 5 включено до наукометричних баз), 1 патент на корисну модель, 1 галузеве нововведення у сфері охорони здоров'я та 11 тез доповідей у матеріалах міжнародних науково-практичних конференцій та з'їздів.

Структура й обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 155 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, практичних рекомендацій та додатків. Робота містить 20 таблиць і 7 рисунків. Список використаних джерел складається зі 255 робіт кирилицею та латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У огляді літератури, який складається з 4 підрозділів розглянуто основні дані щодо етіологічної значимості та антибіотикорезистентності актуальних штамів *P. aeruginosa*. Освітлено питання щодо процесу утворення мікроорганізмами біоплівки та охарактеризовано способи та засоби боротьби з процесом біоплівкоутворення *P. aeruginosa*.

Матеріали і методи. Для виконання задач дослідження використано референтний штам *P. aeruginosa* ATCC 27854 та 116 циркулюючих штамів, з яких 96 культур ізольовано з клінічного матеріалу від хворих на гнійно-запальні захворювання, госпіталізованих з вперше встановленим діагнозом та підтвердженою етіологічною роллю вказаних бактерій; 20 штамів вилучено з об'єктів госпітального середовища. Виділення та ідентифікацію штамів *P. aeruginosa* проводили за морфологічними, тінкторіальними, культуральними, біохімічними властивостями загальноприйнятими методами. Для ідентифікації вилучених культур використовували набори та окремі тести виробництва PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехія та bioMerieux, Франція.

Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин проводили з використанням електронного приладу Densi-Lambda Meter (PLIVA-Lachema a.s., Чехія) за шкалою McFarland згідно з інструкцією до приладу та Інформаційним листом «Стандартизація приготування мікробних суспензій», Київ, 2006.

Дослідження здатності до формування біоплівки мікроорганізмами проводили планшетним методом згідно з методикою O'Toole G., 1999. Як рідке поживне середовище використовували триптиказо-соевий бульйон, виробництва bioMerieux, Франція. Для візуалізації біоплівки використовували 0,1 % спиртовий розчин барвнику кристал віолету. Оптичну щільність вмісту лунок вимірювали на фотометрі StatFax 303 Plus при довжині хвилі 630 нм. Результати фіксували в одиницях оптичної щільності (OD₆₃₀).

Визначення чутливості тест-штамів до протимікробних препаратів проводили диско-дифузійним методом Bauer-Kirby на середовищі Мюллера-Хінтона з використанням готових комерційних дисків, відповідно до рекомендацій EUCAST, версія 2.0. Метод серійних розведень в агарі та у бульйоні використовували для визначення мінімальних інгібуючих концентрацій (МІК) поліміксинів та комбінацій протимікробних препаратів. Для зважування субстанцій використовували електронні лабораторні терези ANG 200 S 2 кл, Польща.

Визначення профілів антибіотикорезистентності ізолятів проведено за допомогою комп'ютерної програми WHONET 5.6.

Дослідження ефективності комбінацій антисиньогнійних препаратів та їх вплив на біоплівкоутворення штамів *P. aeruginosa* проведено з визначенням індексу FIC (fractional inhibitory concentration). При $FIC \leq 0,5$ ефект розцінювали як виражений синергійний, при $FIC \leq 0,9$ – синергійний, при $FIC = 1,0$ – адитивний, при $FIC > 1,0$ – антагоністичний.

Ефект впливу фізичних та хімічних чинників на біоплівки визначали за Stepanovic S. et al., 2007. Розраховували індекс інгібування біоплівок за формулою: $[(OD_{630} \text{ позитивного контролю} - OD_{630} \text{ дослідне}) / OD_{630} \text{ позитивного контролю}] \times 100\%$. Позитивним ефектом (пригнічення біоплівкоутворення) вважалось зниження значення OD_{630} в досліді щодо OD_{630} позитивного контролю, більш ніж на 25%.

Фотодинамічний вплив на біоплівки штамів *P. aeruginosa* вивчали *in vitro* та *in vivo* з застосуванням розчину фотосенсибілізатору метиленового синього - (*Methylenum coeruleum* – $C_{16}H_{18}C_1N_3S \cdot 3H_2O$) у сполученні з заданими параметрами світлодіодного випромінювання. Як джерело світла використовували фотонний апарат «Барва-LED / 630».

Променеву альтерацію шкіри моделювали на 60 щурах самцях лінії Вістар шляхом локального рентгенівського опромінення шкіри стегнової ділянки правої кінцівки тварин в дозі 85,0 Гр за допомогою рентген-терапевтичного апарату TUR-60 на базі ДУ «ІМР НАМН» Умови утримання тварин відповідали гігієнічним вимогам і забезпечували задовільний стан здоров'я піддослідних. Всі маніпуляції проводилося компетентною особою відповідно до вимог нормативних документів. Інфікування місцевих променевих ушкоджень шкіри у тварин проводили при появі ознак променевої виразки на 7 день після локального опромінення. Як тест-штами для інфікування було використано референтний штам *P. aeruginosa* ATCC 27853 та антибіотикорезистентний з високою здатністю до біоплівкоутворення штам *P. aeruginosa* № 420. Протимікробний ефект ФДТ оцінювали за результатами мікробіологічних досліджень матеріалу з поверхні променевого ушкодження шкіри до терапії та в динаміці.

Фізична частина роботи (опромінення об'єктів потоком релятивістських електронів) проведена на базі Наукового національного центру "Харківський фізико-технічний Інститут" Національної академії наук України. Було використано лінійний резонансний імпульсний прискорювач електронів з вимірюючою системою параметрів пучка, на хвилі, що біжить з частотою 2850

МГц, зібраний за традиційною схемою. Параметри формуючого ним пучка такі: енергія пучка електронів – від 3 до 5 МеВ; імпульс струму електронів - 0,5 А; тривалість струмового імпульса - 2 мкс, кут розходження пучка 10-120; діаметр пучка 1,5 см; частота імпульсів від 2 до 5 Гц. Опромінення модельних об'єктів потоком релятивістських електронів проводилось на відстані до 30 см від випускного вікна прискорювача.

Досліди проводили в трьох повторах. Одержані результати статистично обробляли загальноприйнятими методами непараметричної статистики за допомогою пакету програм «Statistica v. 8.0». Відмінності вважались достовірними при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх аналіз. Результати власних досліджень та їх аналіз викладено в третьому – шостому розділах.

Усі вилучені штами *P. aeruginosa* характеризувались типовими морфологічними, культуральними, біохімічними властивостями та володіли здатністю до утворення біоплівки. 54 % штамів, вилучених з клінічного матеріалу, мали високу біоплівкоутворюючу здатність. У протизагу більшість ізолятів із зовнішнього середовища (47 %) характеризувались середньою активністю (рис. 1).

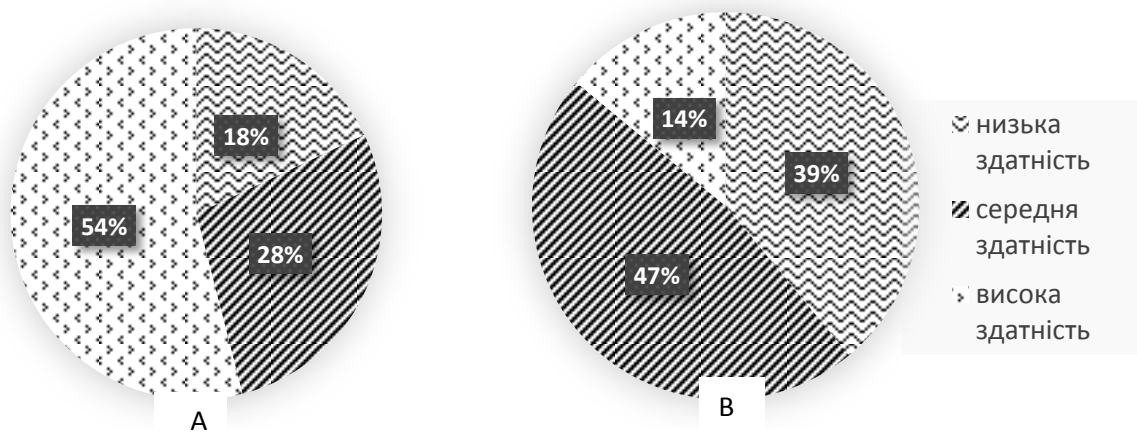


Рис.1. Розподіл штамів *P. aeruginosa* за біоплівкоутворюючою здатністю, А – клінічні ізоляти, n=96; В – штами, вилучені з зовнішнього середовища, n=20.

Результати аналізу даних щодо чутливості штамів *P. aeruginosa* до антимікробних препаратів вказали на суттєві відмінності у резистентності досліджених культур до окремих антибіотиків різних класів і груп (табл. 1). Тільки 5,2 % протестованих штамів зберегли природну чутливість до всіх груп антибіотиків.

До уреїдопеніцилінів - азлоциліну і піперациліну резистентними виявилися 48,3 % і 41,4 % досліджених ізолятів відповідно. До представника

карбоксіпеніцилінів тикарциліну стійкість проявила третя частина штамів. Помірно-стійких штамів до цієї групи антибіотиків не виявлено.

Таблиця 1

Антибіотикорезистентність та чутливість штамів *P. aeruginosa* до антисиньогнійних антибіотиків, (n=116)

Назва антибіотиків	Питома вага штамів, %		
	стійкі (резистентні)	помірно-стійкі (помірно резистентні)	чутливі
<i>Пеніциліни</i>			
Азлоцилін	48,3	0,0	51,7
Піперацилін	41,4	0,0	58,6
Тикарцилін	29,3	0,0	70,7
<i>Цефалоспорины</i>			
Цефотаксим	62,9	30,2	6,9
Цефтріаксон	51,7	35,4	12,9
Цефтазидим	24,2	14,6	61,2
Цефоперазон	19,8	38,8	41,4
Цефепім	32,0	16,3	51,7
<i>Аміноглікозиди</i>			
Гентаміцин	42,2	30,2	27,6
Амікацин	25,9	12,9	61,2
Нетилміцин	35,4	15,5	49,1
<i>Фторхінолони</i>			
Норфлуксацин	48,3	17,2	34,5
Офлоксацин	50,9	10,3	38,8
Ципрофлоксацин	40,6	17,2	42,2
Левовфлоксацин	44,0	12,9	43,1
Гатіфлоксацин	44,0	6,9	49,1
<i>Карбапенеми</i>			
Іміпенем	17,2	6,0	76,8
Меропенем	38,8	5,2	56,0
<i>Монобактами</i>			
Азтреонам	25,0	25,0	50,0

Цефалоспорины, за винятком цефтазидиму, щодо штамів *P. aeruginosa* мали невисоку активність. Сумарна кількість стійких і помірно-стійких ізолятів склало від 48,3 % (цефепім) до 93,1 % (цефотаксим). Високий рівень резистентності відзначений відносно представника групи аміноглікозидів - гентаміцину (42,2 % стійких і 30,2 % помірно-стійких штамів). Більш ефективним в цій групі препаратів виявився амікацин, чутливість до нього зберегли 61,2 % штамів. Фторхінолони, не залежно від покоління, виявили невисоку антимікробну активність щодо *P. aeruginosa*. Так, резистентністю володіли в середньому $(45,6 \pm 3,3)$ % ізолятів, помірно-резистентністю -

(12,9 ± 3,8) %. Найменшу питому вагу резистентних і помірно-резистентних штамів зафіксовано щодо імпенема - 17,2 % і 6,0 % відповідно. Інший представник групи карбапенемів меропенем ефективно пригнічував тільки 56,0 % бактерій. Практично на такому ж рівні (50 % чутливих штамів) виявляв активність представник монобактамів азтреонам.

Профілі резистентності зазначених бактерій виявилися різноманітними, всього визначено 56 варіантів профілів. Найчастіше (у 15 штамів) відзначена поєднана резистентність до цефалоспоринів-аміноглікозидів-фторхінолонів, профіль антибіотикорезистентності CFTRPMGAN.

У 30 поліантибіотикорезистентних штамів *P. aeruginosa* визначена чутливість до інгібіторзахищених бета-лактамів (табл. 2). Більше половини ізолятів проявили стійкість або виявилися помірно-стійкими до вказаних сполук, що, ймовірно, вказує на продукцію бактеріями бета-лактамаз класу C (AmpC), активність яких не пригнічується сульбактамом і тазобактамом.

Таблиця 2

Антибіотикорезистентність та чутливість штамів *P. aeruginosa* до інгібіторзахищених антисиньогнійних антибіотиків, (n=30)

Назва антибіотиків	Питома вага штамів, %		
	стійкі (резистентні)	помірно-стійкі (помірно резистентні)	чутливі
Пиперацилін/тазобактам	6,7	50,0	43,3
Цефоперазон/сульбактам	33,3	53,4	13,3
Цефтриаксон/сульбактам	20,0	40,0	40,0

Наступною ланкою досліджень було порівняльне визначення чутливості до представників β-лактамів та фторхінолонів циркулюючих штамів *P. aeruginosa* (n=116) у різних формах існування популяції – планктонна форма, стан формування біоплівки та стан сформованої зрілої біоплівки (рис. 2). Відібрані для дослідження штами характеризувались чутливістю до тест-антибіотиків та мали середній ступінь біоплівкоутворюючої активності з показниками оптичної щільності 0,226 [0,174; 0,283] OD₆₃₀.

Результати дослідження свідчать, що МІК антибіотиків щодо тест-штамів, який знаходились в процесі формування біоплівки, достовірно підвищувались у порівнянні з МІК, визначених для планктонних форм бактерій. Так, для 100 % інгібування росту тест-штамів синьогнійної палички знадобилась у 8 разів більша концентрація цефтриаксону або цiproфлоксацину та у 16 разів більша концентрація меропенему (p < 0,05). Інтерпретація отриманих значень МІК антибіотиків щодо віднесення тест-штамів до однієї з категорій чутливості показала, що штами *P. aeruginosa* частково зберегли чутливість до цiproфлоксацину та проявили помірну стійкість до цефтриаксону. МІК 32,0 мкг/мл є показником стійкості бактерій до меропенему.

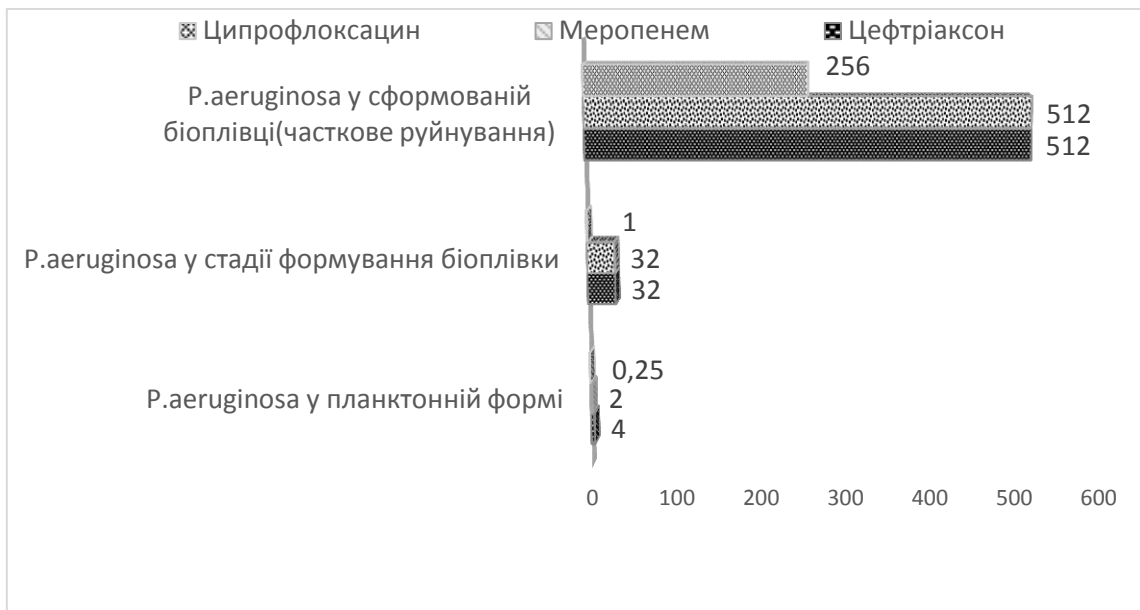


Рис.2. Значення МІК антибіотиків щодо штамів *P. aeruginosa* у різних формах існування популяції.

Наступний етап досліджень передбачав вивчення чутливості до протимікробних препаратів циркулюючих штамів *P. aeruginosa* у стані сформованої зрілої біоплівки. Технічно максимально можливими концентраціями антибіотиків у дослідженні були 256 мкг/мл для ципрофлоксацину та 512 мкг/мл для представників β -лактамів. Констатовано, що у жодному випадку не вдалося на 100 % інгібувати ріст тест-штамів у стані сформованої біоплівки. Концентрація цефтріаксону, меропенему та ципрофлоксацину при цьому перевищувала МІК щодо синьогнійної палички у планктонній формі у 128, 256 та 1024 рази відповідно ($p < 0,00\dots$). Ознаки руйнування біоплівки – зниження значення OD_{630} у досліді щодо OD_{630} позитивного контролю, більш ніж на 25 % – визначено за концентрацій цефтріаксону 128,0 [64,0; 128,0] мкг/мл; меропенему 64,0 [64,0; 128,0] мкг/мл; ципрофлоксацину 64,0 [32,0; 128,0] мкг/мл. Слід зазначити, що вищезначені концентрації антибіотиків перевищували значення, що є терапевтично прийнятними для лікування інфекцій, викликаних синьогнійною паличкою.

У відсутності нових ефективних препаратів стратегія антисиньогнійної терапії базується сьогодні на застосуванні катіонних поліпептидів поліміксинів, формування резистентності до яких відбувається повільно і спостерігається значно рідше у порівнянні з іншими антибіотиками. У нашому дослідженні 96 % штамів мали чутливість до поліміксину, резистентних штамів не виявлено. Оскільки, з огляду на можливу нефротоксичність, просте збільшення дози поліміксинів не є способом оптимізації їх активності проти *P. aeruginosa* у формі біоплівки, великі потенційні можливості може мати комбінована терапія з іншими антибіотиками.

Протимікробну активність антисиньогнійних препаратів та їх комбінацій з поліміксинами вивчали на референтному штамі *P. aeruginosa* ATCC 27853 та 33 циркулюючих полірезистентних штамів *P. aeruginosa* (табл. 3).

Експериментально досліджені можливі ефекти комбінації терапевтичних доз антибіотиків різних груп (фторхінолони, аміноглікозиди, цефалоспорини, карбопенени) з субінгібіторними дозами поліміксинів М та В (від 1,0 до 0,25 мкг/мл). Встановлено адитивність протимікробної дії поліміксинів та антибіотиків усіх інших груп, крім представників карбопенемів, з якими поліміксини показали синергічний ефект. Дія поліміксину В у $(79,0 \pm 3,3) \%$ випадках достовірно не відрізнялась від ефекту поліміксину М.

Таблиця 3

Комбінований ефект дії протимікробних препаратів на штами *P. aeruginosa*, (n=34)

Протисиньогнійні препарати	Значення індексу FIC у комбінації з поліміксинами, (M±m)	
	М	В
Фторхінолони	1,0±0,1	1,0±0,0
Аміноглікозиди	0,96±0,2	0,99±0,01
Цефалоспорини III-IV поколінь	1,0±0,0	1,0±0,0
Меропенем	0,94±0,4	0,92±0,15
Іміпенем	0,75±0,2	0,6±0,1

Розроблена композиція протимікробних засобів пригнічувала процес біоплівкоутворення бактеріями (табл. 4).

Таблиця 4

Комбінований ефект дії протимікробних препаратів на біоплівкоутворення штамів *P. aeruginosa*, (n=34)

Препарат	Значення МІК що інгібували біоплівкоутворення, мкг/мл
Іміпенем	2,0 [1,0; 4,0]
Поліміксин	0,5 [0,5; 2,0]
Іміпенем+Поліміксин	0,5 / 0,25 [0,2; 0,1]/ [0,1; 0,25]

Поширеність антибіотикорезистентної мікрофлори обумовлює пошук альтернативних методів боротьби з інфекціями і в цьому ряду метод ФДТ починає займати все більш важливе місце. Показано, що за впливу на мікробні клітини окремих складових комплексу фотодинамічної терапії (фотосенсибілізатор (ФС) метиленовий синій і опромінювання над'яскравими світлодіодами у червоній ділянці оптичного спектра) бактерицидна дія не відмічена. Обробка мікроорганізмів ФС з наступним світлодіодним опромінюванням, тобто вплив на мікроорганізми ФДТ (енергетична експозиція 30 – 60 Дж/см²), суттєво підвищувала бактерицидну активність, як при мінімальній, так і при більш високій щільності енергії (табл. 5).

Таблиця 5

Зміни кількості КУО тест-штамів *P. aeruginosa* (n=10) за впливу складових ФДТ (густина потоку енергії випромінення 25 мВт/см²)

Концентрація без дії ФДТ, lg КУО/мл	Параметри ФДТ				Концентрація після дії ФДТ, lg КУО/мл
	концентрація ФС, %	час обробки ФС, хв	експозиція опромінювання, хв	енергетична експозиція, Дж/см ²	
7,12 ± 0,37	0,05	30	20	30	5,42±0,27*
7,07 ± 0,29	0,1	30	20	30	5,07 ± 0,31*
7,12 ± 0,37	0,05	30	30	45	4,21±0,58*
7,07 ± 0,29	0,1	30	30	45	0*
7,12 ± 0,37	0,05 %	30	40	60	4,01±0,66*
7,07 ± 0,29	0,1 %	30	40	60	0*

Примітка. * – різниця достовірна (p < 0,05).

За результатами визначення біоплівкоутворюючої здатності неопромінених тест-штамів встановлено, що діапазон показників оптичної щільності екстрагованого барвника варіював від 0,3915 до 0,9083 од. (табл. 5). За впливу сублетальної дози ФДТ – енергетична експозиція 30 Дж/см² вказаний діапазон звузився від 0,2992 до 0,7886 од. У 80 % штамів відмічено достовірне зниження біоплівкоутворюючої активності (табл.6).

Таблиця 6

Показники біоплівкоутворюючої здатності тест-штамів *P. aeruginosa* за умов сублетального фотодинамічного впливу (ФДВ)

Назва тест-штаму	Умови дослідження	Показники оптичної щільності екстрагованого барвника, од., (M±m)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	сублетальний ФДВ	0.4826±0.0021*
	контроль (без ФДВ)	0.7402±0.0009
<i>P. aeruginosa</i> № 8-32	сублетальний ФДВ	0.2992±0.0021*
	контроль (без ФДВ)	0.3915±0.0006
<i>P. aeruginosa</i> № 118	сублетальний ФДВ	0.7886±0.0017
	контроль (без ФДВ)	0.8034±0.0042
<i>P. aeruginosa</i> № 405	сублетальний ФДВ	0.4377±0.0019*
	контроль (без ФДВ)	0.6402±0.0012
<i>P. aeruginosa</i> № 420	сублетальний ФДВ	0.764±0.0013*
	контроль (без ФДВ)	0.9083±0.0016

Примітка. * – різниця достовірна (p<0,05) відносно контролю.

На підставі проведених експериментів *in vitro* були обрані оптимальні параметри дози щільності енергії та експозиції освітлення, що обумовило вибір

застосування складових ФДТ для проведення дослідів *in vivo*. За результатами мікробіологічного обстеження до початку лікування встановлено, що змодельована інфікована променева виразка шкіри у піддослідних тварин мала статистично однорідні показники як у дослідній, так і у контрольній групах щурів. Популяційний рівень тест-штаму синьогнійної палички становив до лікування $\lg(5,89 \pm 0,3)$ КУО/см² та $\lg(5,77 \pm 0,4)$ КУО/см² в дослідній та контрольній групі відповідно. При інфікуванні променевого ушкодження референтним штамом *P. aeruginosa* ATCC 27853 через 24 години після першого сеансу ФДТ спостерігалась 100% елімінація бактерій.

З метою наближення експерименту до реальних умов, проведені нові серії досліджень з використанням для інфікування клінічного штаму *P. aeruginosa* № 420, який характеризувався поліантибіотикорезистентністю та високою здатністю до утворення біоплівки. Через добу після сеансу ФДТ у 66,7 % піддослідних тварин з поверхні виразки тест-штам не вилучено ($p < 0,05$). У щурів, де позитивні знахідки *P. aeruginosa* залишились, рівень колонізації біотопу становив $\lg(3,15 \pm 0,07)$ КУО/см² проти $\lg(5,58 \pm 0,15)$ КУО/см² у контрольній групі тварин ($p < 0,05$) (рис. 3).

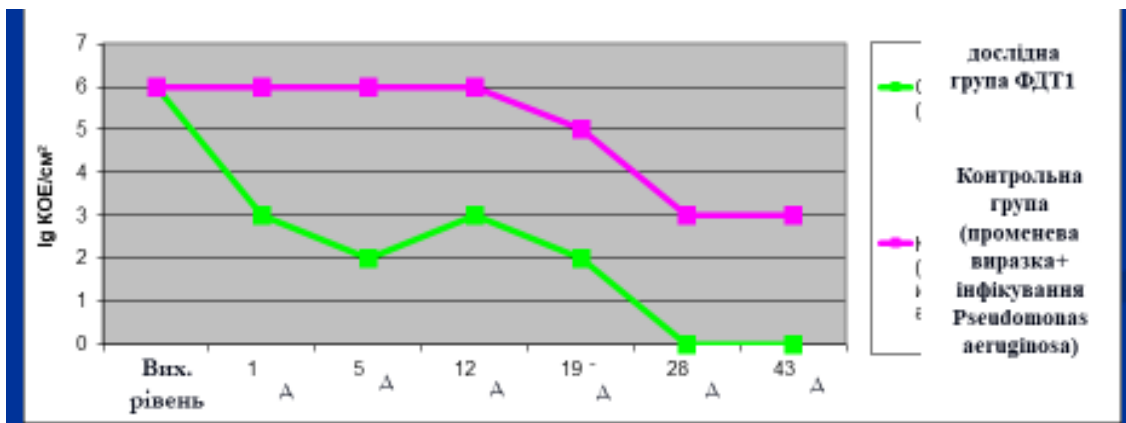


Рис. 3. Вплив ФДТ на щільність мікробної колонізації в променевій виразці шкіри щурів після інфікування клінічним штамом *P. aeruginosa* № 420

На 5 добу після сеансу ФДТ кількість тварин, у яких настала елімінація тест-штаму, збільшилась до 73,4 % у групі щурів, інфікованих синьогнійною паличкою. У тварини контрольної групи у 100 % випадків вилучено тест-штам. Хоча отримані дані свідчили про позитивну динаміку елімінації тест-штаму, але вона була дуже повільною. Відсутність стовідсоткового протимікробного ефекту після першого сеансу ФДТ спонукала до проведення повторного сеансу. Другий сеанс ФДТ у 100 % випадків вплинув бактерицидно на тест-штам *P. aeruginosa*. Досягнуті показники зберігались до кінця терміну спостереження після лікувальних заходів – 45 діб. У контрольній групі тварин лише на 13 день експерименту відмічено один випадок самоелімінації тест-штаму, показники мікробної колонізації у інших щурів залишались досить високими - $\lg(4,99 \pm 0,21)$ КУО/см² виразки (рис. 4).

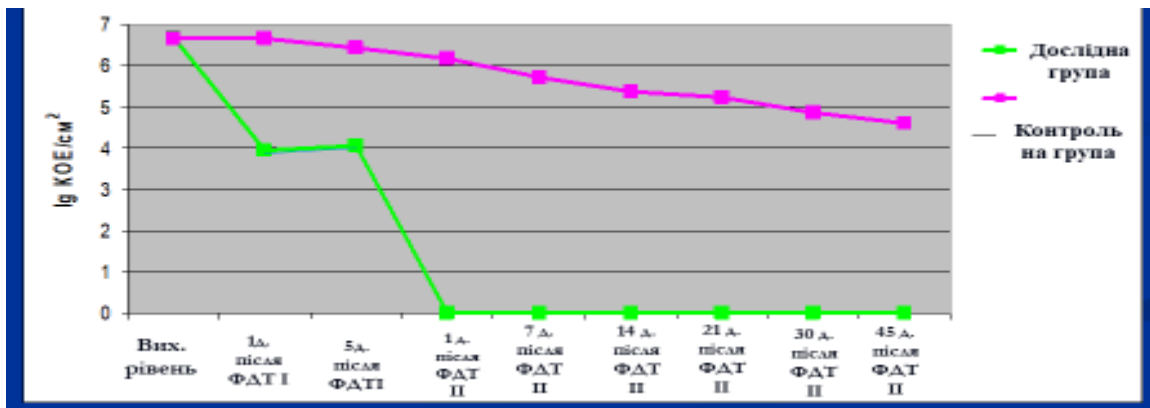


Рис. 4. Вплив другого сеансу ФДТ на щільність мікробної колонізації в променевій виразці шкіри щурів після інфікування клінічним штамом *P. aeruginosa* № 420.

Одним із головних напрямів у боротьбі зі шпитальними інфекціями, в тому числі викликаними *P. aeruginosa*, є переривання ланцюга передачі інфекції, що досягається шляхом належної дезінфекції поверхонь, стерилізації інструментів та розчинів. Одним із нових методів, що зараз знаходиться в стадії випробування та вдосконалення, є метод знезараження за допомогою електронного пучка.

Визначено режими роботи електронного прискорювача, які забезпечують бактериостатичний та бактерицидний ефект щодо тест-штамів *P. aeruginosa* у модельних зразках. Встановлено практично лінійну залежність доза-зниження кількості життєздатних бактерій (рис. 5). Показано, що бактериостатична післядія електронного пучка спостерігалась при енергетичних навантаженнях від 0,8 до 3,8 кГр. Бактерицидний ефект спостерігався після опромінення тест-штамів дозами, починаючи з 4,0 кГр.

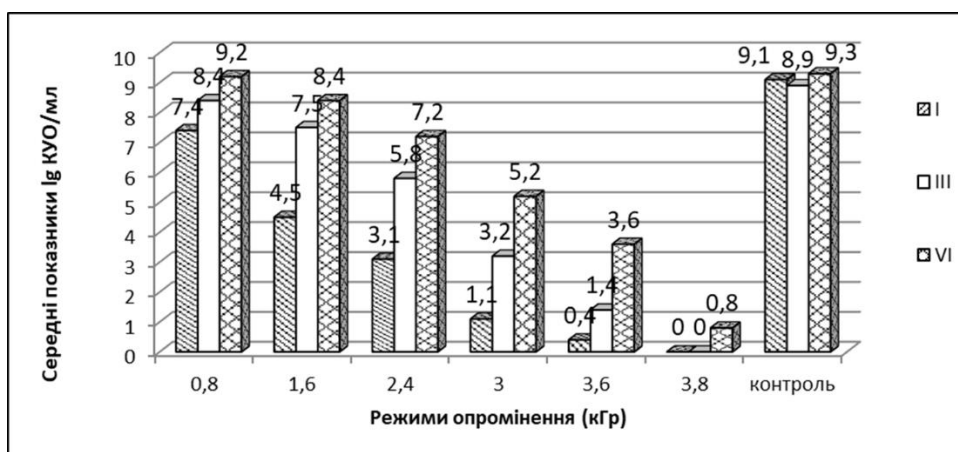


Рис. 5. Життєздатність тест-штамів *P. aeruginosa* в модельних зразках після опромінення електронним пучком, де I – перший день спостереження після опромінення, III – третій день, VI – шостий день.

Доведено, що біологічні властивості бактерій за впливу сублетальних доз потоку релятивістських електронів (1,6 та 3,0 кГр) характеризувались

зниженням або зникненням ферментативної активності, а саме з вивчених 32 біохімічних ознак відмічено відсутність ферментації L-рамнози, N-ацетилглюкозаміну, ацетату в 25,0 % досліджень. Встановлено, що вказані зміни не залежали від дози опромінення штамів електронним пучком та зникали через 1-3 пасажа культур, тобто виявились фенотиповими.

За результатами визначення біоплівкоутворюючої здатності неопромінених тест-штамів встановлено, що діапазон показників оптичної щільності екстрагованого барвника варіював від 0,4056 до 0,7402 од. (табл. 7). За впливу сублетальної дози потоку релятивістських електронів вказаний діапазон становив від 0,0657 до 0,4322 од. У всіх тест-штамів відмічено достовірне зниження біоплівкоутворюючої активності. Референтна культура *P. aeruginosa* ATCC 27853 мала у середньому у 1,6 раза менші показники оптичної щільності елюатів з біоплівок, утворених штамом після його опромінення електронним пучком ($p < 0,05$). Циркулюючі штами виявились більш чутливими до електронно-пучкового опромінення: у середньому показники знижувались у 6,6 разів ($p < 0,001$). Зазначено, що вказані зміни не залежали від дози опромінення – показники оптичної щільності екстрагованого барвника за впливу на тест-штами дози 1,6 кГр та 3,0 кГр статистично між собою не відрізнялись ($p > 0,05$).

Таблиця 7

Показники біоплівкоутворюючої здатності тест-штамів *P. aeruginosa* у залежності від поглинутої дози потоку релятивістських електронів

Тест-штами	Доза опромінення	Показники оптичної щільності екстрагованого барвника, од., (M±m)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1,6 кГр	0,4352±0,0015*
	3,0 кГр	0,4322±0,0021*
	контроль (без опромінення)	0,7402±0,0009
Циркулюючі штами <i>P. aeruginosa</i> (n=4)	1,6 кГр	0,0657±0,0218*
	3,0 кГр	0,0692±0,0305*
	контроль (без опромінення)	0,4056±0,1211

Примітка. * – різниця достовірна ($p < 0,05$) відносно контролю.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та вирішення науково-практичної задачі, що полягає у підвищенні ефективності лікування синьогнійної інфекції та знезараження контамінованих її збудником поверхонь на основі мікробіологічного обґрунтування відбору і застосування хіміотерапевтичних препаратів, фізичних чинників та їх комбінацій з найбільшою здатністю пригнічення біоплівкоутворення *P. aeruginosa*.

1. Чутливість актуальних штамів *P. aeruginosa* до антимікробних препаратів характеризувалась суттєвими відмінностями у резистентності

досліджених культур до окремих антибіотиків різних класів і груп. Найчастіше відзначена поєднана резистентність до цефалоспоринів-аміноглікозидів-фторхінолонів. Найменшу питому вагу резистентних і помірно-резистентних штамів зафіксовано щодо іміпенема - 17,2 % і 6,0 % відповідно. 96 % штамів мали чутливість до поліміксину.

2. Визначення чутливості циркулюючих штамів *P. aeruginosa* у різних формах існування популяції – планктонна форма, стан формування біоплівки та стан сформованої зрілої біоплівки, показало істотні відмінності значень МІК антибіотиків. У стані формування біоплівки МІК підвищувалась у 8-16 разів у порівнянні з такими, визначеною для планктонних форм. Тест-штами у стані сформованої біоплівки виживали за впливу 256 мкг/мл ципрофлоксацину та 512 мкг/мл цефтріаксону або меропенему. Концентрації антибіотиків, за яких визначено ознаки руйнування біоплівок, перевищували значення, що є терапевтично прийнятними для лікування інфекцій, викликаних синьогнійною паличкою.

3. Комбіноване застосування препаратів іміпенему у терапевтичних дозах та поліміксинів у субінгібуючих концентраціях (від 1,0 мкг/мл до 0,25 мкг/мл) достовірно підвищує активність іміпенему та розцінюється як синергетичний ефект. Розроблена композиція пригнічувала процес біоплівкоутворення бактерій. Синергізм дії представника карбопенемів з поліміксинами, вірогідно, має місце по відношенню до тих штамів *P. aeruginosa*, в яких резистентність до карбопенемів пов'язана саме з бар'єром проникності, створеним втратою ефективного порінового каналу зовнішньої мембрани.

4. Найбільш ефективними параметрами складових компонентів ФДТ встановлено світлове випромінювання ($\lambda = 630$ нм) та фотосенсибілізатор метиленовий синій. Визначена оптимальна концентрація ФС метиленового синього (0,1 % водний розчин) з експозицією на поверхні впродовж 30 хв та оптимальні параметри червоного випромінювання – довжина хвилі 630 – 650 нм, потужність випромінювання 25 мВт, експозиція світла 30 хв, енергетична експозиція за сеанс 45 Дж/см².

5. За результатами мікробіологічних досліджень *in vitro* та *in vivo* встановлено, що ФДТ є ефективною альтернативною антимікробній терапії при лікуванні інфікованих променевиких ушкоджень шкіри, у т.ч. для випадків, коли етіологічним чинником виступають антибіотикорезистентні, з високою здатністю до біоплівкоутворення штами бактерій. Визначено, що для досягнення повної елімінації етіологічного чинника, необхідно проведення двох сеансів ФДТ.

6. Показано, що бактеріостатична післядія потоку релятивістських електронів спостерігалась при енергетичних навантаженнях від 0,8 до 3,8 кГр. Бактерицидний ефект спостерігався після опромінення тест-штамів дозами, починаючи з 4,0 кГр. Доведено, що біологічні властивості бактерій за впливу сублетальних доз потоку релятивістських електронів (1,6 та 3,0 кГр) характеризувались зниженням або зникненням ферментативної активності, а саме з вивчених 32 біохімічних ознак відмічено відсутність ферментації L-рамнози, N-ацетилглюкозаміну, ацетату в 25,0 % досліджень. Встановлено, що

вказані зміни не залежали від дози опромінення штамів електронним пучком та зникали через 1-3 пасажа культур, тобто виявились фенотиповими. За впливу сублетальних доз фізичного чинника визначено пригнічення біоплівкоутворюючої здатності тест-штамів синьогнійних паличок у 1,7 – 6,6 раза.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Для розширення терапевтичних можливостей і, відповідно, - підвищення ефективності відомих антибіотиків, рекомендується проводити цілеспрямовану комбіновану антибіотикотерапію з урахуванням даних про молекулярний механізм дії антибіотиків. Застосування антибіотика, який в сублетальних концентраціях руйнує зовнішню мембрану бактерії, з антибіотиком, який через резистентність сам по собі не є ефективним, створює синергетичний протимікробний та біоплівкопригнічуючий ефект щодо антибіотикостійких штамів *P. aeruginosa*.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Photodynamic Therapy as a Method of *Pseudomonas aeruginosa* Management in Infected Radial Skin Ulcers / N. V. Krasnoselskiy, L. I. Simonova, N. E. Sklyar, V. V. Sarkis-Ivanova. *Pseudomonas aeruginosa: A Review and Direction for Research* : [monog.] ; Editors C. F. Wong, H. Idris. New York: Nova Science Publishers, 2019. Chap. 5. P. 189–208. (дисертант забезпечував підбір літературних джерел, провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали та підготував до публікації).
2. Мікробіологічне обґрунтування ефективності фотодинамічної терапії на експериментальній моделі інфікованої променевої виразки шкіри / Скляр Н. І., Сімонова-Пушкар Л. І., Саркіс-Іванова В. В., Гертман В. З. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2016. Т.16, Вип. 4 (56), част. 3. С. 61–65. (дисертант проаналізував дані за темою, узагальнив матеріали та підготував до публікації).
3. Дослідження дії потоку релятивістських електронів на біологічні властивості штамів *Pseudomonas aeruginosa* / Скляр Н. І., Саркіс-Іванова В. В., Осолодченко Т. П., Пономаренко С. В., Маркович І. Г. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2018. Том 3, № 7 (16). С. 53–59. (дисертант провів аналіз літератури, обґрунтував вибраний напрямок дослідження та його організацію, збір матеріалу, сформулював висновки, написання статті).
4. Антибіотикочутливість штамів *Pseudomonas aeruginosa* та *Escherichia coli* у планктонній формі та у стані біоплівки / Скляр Н. І., Саркіс-Іванова В. В., Перетятко О. Г., Ягнюк Ю. А., Мані Ханс. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2019. Том 1, № 5 (16). С. 55–58. (дисертант проаналізував літературні дані за темою, провів статистичну обробку даних, проаналізував та узагальнив результати дослідження)
5. Інгібування біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa* комбінацією протимікробних препаратів / Скляр Н. І., Ліснюк Ю. В., Саркіс-Іванова

- В. В., Маркович І. Г., Піддубна Т. Л. *Вісник проблем біології та медицини*. 2019. Вип.2, Т.1 (150). С. 200–203. (дисертантом проаналізовано літературні дані за темою, обґрунтування перспективи вибраного напрямку дослідження).
6. Sarkis-Ivanova V. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* strains, and methods of its control (review) [Електронний ресурс]. *Annals of Mechnikov Institute*. 2017. № 1. С. 9–13. Режим доступу: www.imiamn.org.ua/journal.htm
 7. Мониторинг антибиотикорезистентности актуальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* / Саркіс-Іванова В. В., Скляр Н. І., Аттіков В. Є., Малюк Т. А. *Национальная ассоциация ученых (НАУ). Ежемесячный научный журнал*. 2015. № 9 (14), Ч. 2. С. 153–155. (дисертант забезпечував підбір літературних джерел, провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали та підготував до публікації, написання статті).
 8. Протимікробна композиція для інгібування біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa* : патент на корисну модель № 82743 Україна. u201300448 / Лісняк Ю. В., Скляр Н. І., Саркіс-Іванова В. В., Калініченко С. В., Білозерський В. І., Давиденко М. Б. ; заявл. 14.01.2013 ; опубл. 12.08.2013, Бюл. № 15. 4 с. (дисертант провів експериментальні дослідження, аналіз результатів, оформлення заявки на патент).
 9. Протимікробна композиція для інгібування біоплівкоутворення (*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) : [нововвед.] / Ю. В. Лісняк, Н. І. Скляр, В. В. Саркіс-Іванова, С. В. Калініченко, В. І. Білозерський, М. Б. Давиденко. Інформ. бюлетень НАМН України. Додаток до Журналу Національної академії медичних наук України. Київ, 2013. Вип. 35. С. 86–87. (дисертант провів експериментальні дослідження, аналіз результатів).
 10. Вивчення ефективності фотодинамічної терапії за результатами мікробіологічних досліджень матеріалу з поверхні змодельованого інфікованого променевого ушкодження шкіри / Н. І. Скляр, М. М. Попов, Л. І. Симонова, В. В. Саркіс-Іванова, В. З. Гертман. Інфекційні хвороби сучасності. Біологічна безпека та біозахист : матер. наук.-практ. конф., присвяченої пам'яті академіка Л.В. Громашевського та 120-річчю ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України, 12-13 жовтня 2016 р. Київ, 2016. С. 131–133. (дисертант провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали).
 11. Колотилов А. В., Саркіс-Іванова В. В. Санитарно-гигиенические мероприятия, направленные на профилактику возникновения нозокомиальной инфекции в лечебно-профилактических учреждениях. Медицина третьего тысячелетия : збірник тез міжвузівської конференції молодих вчених та студентів, 16–17 січня 2017 р. Харків, 2017. С. 419–420. (дисертант забезпечував підбір літературних джерел, узагальнив матеріали та підготував до публікації).

12. Біоплівкоутворююча здатність тест-штамів різних таксономічних груп за впливу потоку релятивістських електронів / Н. І. Скляр, В. С. Антіпов, А. Ф. Ліннік, Т. П. Осолодченко, С. В. Пономаренко, О. В. Порт, В. В. Саркіс-Іванова, І. В. Бережна. Тези доповідей XV з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського, 11-15 вересня 2017 р. Львів: СПОЛОМ, 2017. С. 228. *(дисертант забезпечував підбір літературних джерел, провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали та підготував до публікації)*
13. Лісняк Ю. В., Саркіс-Іванова В. В., Скляр Н. І. Комбінована дія катіонних ліпопептидів з основними антисиньогнійними препаратами на циркулюючі штами *P. aeruginosa*. Сучасний стан і проблеми епідеміології та інфекційної патології в Україні : тези доповідей науково-практичної конференції, присвяченої 125-річчю з дня народження академіка Л. В. Громашевського, 10-11 жовтня 2012 року. Київ, 2013. С. 13. *(дисертант забезпечував підбір літературних джерел, провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали та підготував до публікації)*.
14. Саркіс-Іванова В. В. Антибіотикочутливість циркулюючих штамів *Pseudomonas aeruginosa*, вилучених з різних екоотопів. Матеріали конференції молодих вчених Національної академії медичних наук України, присвяченій 20-літтю створення Академії. *Журнал НАМН України*. 2013. Т. 19, додаток. С. 120.
15. Скляр Н. І., Лісняк Ю. В., Саркіс-Іванова В. В. Синергетична протимікробна композиція для інгібування біоплівкоутворення *Pseudomonas aeruginosa*. Тези доповідей XIII з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського, 01-06 жовтня 2013 р. Ялта. 2013. С. 328. *(дисертант провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали)*.
16. Sensivity to antibacterial uses of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in different forms of existens / N. Sklyar, V. Sarkis-Ivanova, E. Peretyatko, Yu. Yagnuk. Перший національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів, паразитологів: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, 16-17 травня 2019 року. Харків, 2019. С. 13–14. *(дисертант забезпечував підбір літературних джерел, провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали та підготував до публікації)*.
17. Скляр Н. І., Саркіс-Іванова В. В., Маркович І. Г. Результати визначення вірулентності мікроорганізмів за впливу потоку релятивістських електронів на моделі інфікованої променевої виразки. Перший національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів, паразитологів : матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, 16-17 травня 2019 року. Харків, 2019. С. 111–113. *(дисертант провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали та підготував до публікації)*.

18. Саркіс-Іванова В. В., Александрова К. В., Журавльова П. В. Моніторинг циркуляції штамів *Pseudomonas aeruginosa* як провідного представника нозокоміальної інфекції. Екологічні та гігієнічні проблеми сфери життєдіяльності людини : матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, 12 березня 2019 року. Київ, 2019. С. 148–149. (дисертант провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали та підготував до публікації).
19. Саркіс-Іванова В. В. Активність протимікробних препаратів стосовно потенційних нозокоміальних штамів *Pseudomonas aeruginosa*. Стратегія і тактика боротьби з інфекційними захворюваннями : наук. – практ. конф. з участю міжнародних спеціалістів, присвячена 125-річчю заснування ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України : мат. конф. Харків, 2012. С. 83–84.
20. Саркіс-Іванова В. В., Кошиль М. С. Профілактичні заходи щодо актуальних штамів *Pseudomonas aeruginosa* як представника нозокоміальної інфекції. Медицина третього тисячоліття : збірник тез міжвузівської конференції молодих вчених та студентів, 29-31 січня 2019 р. Харків, 2019. С. 481–483. (дисертант провів мікробіологічні дослідження, узагальнив матеріали та підготував до публікації).

АНОТАЦІЯ

Саркіс-Іванова В. В. Антимікробна дія хіміотерапевтичних препаратів та фізичних чинників на різні форми існування популяції *Pseudomonas aeruginosa*. На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія. – ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України», м. Харків, 2020.

Дисертація присвячена вирішенню науково-практичної задачі медицини, що полягає у підвищенні ефективності лікування синьогнійної інфекції та знезараження контамінованих її збудником поверхонь.

Досліджено біологічні властивості 116 циркулюючих штамів *P. aeruginosa*, у т.ч. визначено антибіотикочутливість бактерій у різних формах існування популяції. Розроблено синергетичну комбінацію протимікробних препаратів зі здатністю пригнічувати процес біоплівкоутворення *P. aeruginosa*. *In vitro* та *in vivo* обґрунтовано параметри ФДТ для лікування інфікованих *P. aeruginosa* променевих ушкоджень шкіри. З'ясовано вектор та силу змін біологічних властивостей штамів *P. aeruginosa* за впливу сублетальних доз потоку релятивістських електронів, у т.ч. показано пригнічення біоплівкоутворюючої здатності у 1,7 – 6,6 раза та зниження вірулентних властивостей. Визначено режими роботи електронного прискорювача, які забезпечують бактерицидний та бактеріостатичний ефект відносно штамів *P. aeruginosa*.

Ключові слова: *Pseudomonas aeruginosa*, антибіотикочутливість, біоплівкоутворення, синергетична протимікробна комбінація, фотодинамічна терапія, електронний пучок.

АННОТАЦИЯ

Саркис-Иванова В.В. Антимикробное действие химиотерапевтических препаратов и физических факторов на различные формы существования популяции *Pseudomonas aeruginosa*. На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.00.07 - микробиология. - ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова НАМН Украины», г. Харьков, 2020.

Диссертации посвящена решению научно-практической задачи медицины, состоящей в повышении эффективности лечения синегнойной инфекции и обеззараживания контаминированных ее возбудителем поверхностей.

Исследовано биологические свойства 116 циркулирующих штаммов *P. aeruginosa*, в т.ч. определена антибиотикочувствительность бактерий в различных формах существования популяции. Разработано синергетическую комбинацию противомикробных препаратов со способностью подавлять процесс биопленкообразования *P. aeruginosa*. *In vitro* и *in vivo* обоснованно параметры ФДТ для лечения инфицированных *P. aeruginosa* лучевых повреждений кожи. Выяснено вектор и силу изменений биологических свойств штаммов *P. aeruginosa* под влиянием сублетальных доз потока релятивистских электронов, в т.ч. показано угнетение биопленкообразования в 1,7 - 6,6 раз и снижение вирулентных свойств. Определены режимы работы электронного ускорителя, которые обеспечивают бактерицидный и бактериостатический эффект в отношении штаммов *P. aeruginosa*.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, антибиотикочувствительность, биопленкообразование, синергетическая противомикробная комбинация, фотодинамическая терапия, электронный пучок.

SUMMARY

Sarkis-Ivanova V.V. Antimicrobial Effect of Chemotherapeutic Drugs and Physical Factors on Different Forms of *Pseudomonas aeruginosa* Population - Qualifying scientific work on the rights of a manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Medical Sciences, specialty 03.00.07 - Microbiology. – State Institution “I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical Science of Ukraine”, Kharkiv, 2020.

In the thesis the theoretical generalization and solution of the scientific and practical problem of medicine, which consists in improving the effectiveness of treatment of *P. aeruginosa* and decontamination of contaminated surfaces of the agent on the basis of microbiological substantiation of the selection and use of chemotherapeutic drugs.

The biological properties of 116 circulating *P. aeruginosa* strains were determined, of which 96 cultures were isolated from clinical material from patients

with purulent inflammatory diseases and 20 strains were taken from the hospital environment. It was proved that antibiotic sensitivity of *P. aeruginosa* strains in different forms of population existence, particularly planktonic form, state of biofilm formation and state of mature biofilm, had significant differences of values of minimum inhibitory concentrations (MIC) of antibiotics. In the state of biofilm formation, MICs increased by 8-16 times compared to those determined for planktonic forms.

Additives of antimicrobial action of polymyxins and antibiotics of all other groups, except representatives of carbopenems, with which polymyxins showed a synergistic effect, were established. An antimicrobial composition was proposed in which the combined use of imipenem agents at therapeutic doses and polymyxins at sub-inhibitory concentrations (1.0 to 0.25 µg/ml) significantly enhanced imipenem activity and inhibits the process of biofilm formation of *P. aeruginosa*.

The effects of the combined action of a chemotherapeutic agent and physical factors (photodynamic effect) on the biological properties of *P. aeruginosa* strains were characterized. According to the results of determining the biofilm capacity of the irradiated test strains, it was found that the range of optical density of the extracted dye varied from 0.3915 to 0.9083 units. Due to the effect of the PDT sublethal dose with energy exposure of 30 J/cm², the specified range narrowed from 0.2992 to 0.7886 units. A significant decrease in biofilm activity was observed in 80% of the strains. The effectiveness of PDT in the treatment of simulated radiation skin lesions infected with *P. aeruginosa* strains was experimentally investigated.

It was proved that the biological properties of bacteria under the influence of sublethal doses of the relativistic electron flux (1.6 and 3.0 kGy) were characterized by a decrease or disappearance of enzymatic activity. All test strains showed a significant decrease in biofilm activity. The reference culture of *P. aeruginosa* ATCC 27853 had an average 1.6-fold lower optical density of biofilm-derived eluates produced by the strain after electron beam irradiation ($p < 0,05$). Circulating strains were more sensitive to electron beam irradiation: on average, they decreased 6.6-fold ($p < 0,001$). It was shown that the bacteriostatic aftereffect of the electron beam occurred at energy loads from 0.8 to 3.8 kGy, and the bactericidal effect occurred after irradiation of the test strains with doses starting from 4.0 kGy.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic sensitivity, biofilm formation, synergistic antimicrobial composition, photodynamic therapy, electron beam.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- Гр – грей – 1 грей дорівнює еквіваленту поглинання 1 Дж на 1 кг
- КУО – колонієутворюючі одиниці
- МІК – мінімальна інгібуюча концентрація
- ФДВ – фотодинамічний вплив
- ФДТ – фотодинамічна терапія
- ФС – фотосенсибілізатор
- АТСС– American Type Culture Collection – Американська колекція типових культур
- FIC – fractional inhibitory concentration
- OD – одиниці оптичної щільності