



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110598** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12N 13/00
A61N 7/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 05850	(72) Винахідник(и): Давиденко Вячеслав Борисович (UA), Мішина Марина Митрофанівна (UA), М'ясоєдов Валерій Васильович (UA), Пашенко Юрій Володимирович (UA), Штикер Станіслав Юрійович (UA), Давиденко Наталія Вячеславівна (UA), Мішин Михайло Юрійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 30.05.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.10.2016	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.10.2016, Бюл.№ 19	(73) Власник(и): ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пр. Науки, 4, м. Харків, 61022 (UA) (74) Представник: Євтушенко Тамара Григорівна

(54) СПОСІБ ПРИГНІЧЕННЯ ПРОДУКЦІЇ ПЛАНКТОННИХ КЛІТИН БІОПЛІВКАМИ ПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ, ЗБУДНИКІВ ГНІЙНО-ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ**(57) Реферат:**

Спосіб пригнічення продукції патогенних мікроорганізмів включає моделювання біоплівки патогенних мікроорганізмів з наступною дією на них антибіотиками з ультразвуковим випромінюванням. Для пригнічення продукції планктонних клітин біоплівками патогенних мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних процесів, ультразвуком з ультразвуковою хвилею до 3 Вт/см², робочою частотою коливань 26,5 кГц, амплітудою коливань до 80 мкм діють протягом 10 хв на добові біоплівки патогенних мікроорганізмів, сформованих на поверхні полістиролової панелі. Додають розчини протимікробних препаратів, в тому числі і бактеріофагів. Термостатують протягом доби. Вилучають планктонні клітини та за порівнянням оптичної щільності планктонних клітин до та після ультразвуку з протимікробними препаратами оцінюють ступінь пригнічення їх продукції біоплівками, використовуючи як негативний контроль фізіологічний розчин. Кількісним показником ступеня пригнічення продукції планктонних клітин є значення оптичної щільності 540 нм.

UA 110598 U

Корисна модель належить до клініко-експериментальної медицини та мікробіології і може бути використана для пригнічення продукції планктонних клітин біоплівками патогенних мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних процесів, під впливом низькоінтенсивного ультразвукового випромінювання та протимікробних препаратів.

В даний час є доведеним, що для бактерій базовим станом існування є форма біоплівки, а планктонна форма розглядається як спосіб переміщення мікробної клітини від місця локалізації первинної біоплівки до іншої поверхні, на якій формується нова (вторинна) біоплівка.

В клінічній та експериментальній практиці встановлена перспективність використання ультразвукової кавітації для пригнічення життєдіяльності патогенних мікроорганізмів, зокрема збудників гнійно-запальних процесів. Особливо ефективним є вплив безперервного низькоінтенсивного ультразвукового випромінювання та протимікробних препаратів на дезорганізацію біоплівок.

Встановлено ефект впливу комбінованого застосування ультразвуку з антисептиками та показано, що при 10-хвилинному впливі перекису водню на культуру золотистого стафілокока число мікробних клітин зменшується на 5-6 %, а при спільному впливі з ультразвуком - на 80 % [Оганесян М.А. Профилактика послеоперационных нагноений и лечение гнойных ран ультразвуковой кавитацией / М.А. Оганесян // Вестник хирургии. - 1982. - № 5. - С. 56-57].

Відомий спосіб оцінки ефективності протимікробного впливу антибіотиків та ультразвукового випромінювання на патогенні бактерії, що існують у формі біоплівки [Пат. № 2457254, RU, C12Q 1/04, C12N 13/00. / Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Южный федеральный университет", Сазыкин И.С., Сазыкина М.А., Чистяков В.А., Лысенко В.С. - 3. № 2011106708/10; Заявл. 22.02.2011, Опубл. 27.07.2012 Способ оценки эффективности антимикробного воздействия антибиотиков и ультразвукового излучения на патогенные бактерии, существующие в форме биопленки], що полягає у створенні моделі бактеріальної біоплівки, вирощеної з біolumінесцентних бактерій *Vibrio fischeri*, підборі доз впливу антибіотиків та ультразвукового випромінювання на бактеріальну біоплівку, реєстрації та оцінюванні антимікробного ефекту. При цьому реєстрацію антимікробного ефекту проводять шляхом визначення інтенсивності світіння біolumінесцентних бактерій *Vibrio fischeri*, а антимікробний ефект оцінюють за ступенем пригнічення інтенсивності світіння у порівнянні з контролем.

Даний спосіб пригнічення продукції патогенних мікроорганізмів є найбільш близьким до того, що заявляється, за технічною суттю та результатом, який може бути досягнутим, тому його вибрано за прототип.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення способу пригнічення продукції планктонних клітин біоплівками патогенних мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних процесів, шляхом впливу безперервного низькоінтенсивного ультразвукового випромінювання та протимікробних препаратів, включаючи бактеріофаг.

Для вирішення задачі, поставленої в основу корисної моделі, у відомому способі пригнічення продукції патогенних мікроорганізмів, що включає моделювання біоплівок патогенних мікроорганізмів з наступною дією на них антибіотиками з ультразвуковим випромінюванням, згідно з корисною моделлю, для пригнічення продукції планктонних клітин біоплівками патогенних мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних процесів, ультразвуком з ультразвуковою хвилею до 3 Вт/см²; робочою частотою коливань - 26,5 кГц; амплітудою коливань - до 80 мкм, діють протягом 10 хв на добові біоплівки патогенних мікроорганізмів, сформованих на поверхні полістиролової панелі, затим додають розчини протимікробних препаратів, в тому числі і бактеріофагів, термостатують протягом доби, вилучають планктонні клітини та за порівнянням оптичної щільності планктонних клітин до та після ультразвуку з протимікробними препаратами оцінюють ступінь пригнічення їх продукції біоплівками, використовуючи як негативний контроль фізіологічний розчин, при цьому кількісним показником ступеня пригнічення продукції планктонних клітин є значення оптичної щільності 540 нм.

Технічний ефект корисної моделі, а саме створення способу пригнічення продукції планктонних клітин біоплівками патогенних мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних процесів шляхом впливу безперервного низькоінтенсивного ультразвукового випромінювання та протимікробних препаратів, включаючи бактеріофаг, обумовлений синергізмом заходів, які заявляються.

Спосіб виконують наступним чином. Спосіб включає формування біоплівок патогенних мікроорганізмів на поверхні полістиролової панелі, розміщення їх у зоні дії низькоінтенсивного ультразвукового випромінювання з ультразвуковою хвилею до 3 Вт/см²; робочою частотою коливань - 26,5 кГц; амплітудою коливань - до 80 мкм на 10 хвилин. Ультразвуком діють на добові біоплівки патогенних мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних процесів. Затим

додають розчини протимікробних препаратів, в тому числі й бактеріофагів. Термостатують протягом доби. Вилучають планктонні клітини. За порівнянням оптичної щільності планктонних клітин до та після дії ультразвуку з протимікробними препаратами оцінюють ступінь пригнічення їх продукції біоплівками. Використовують в якості негативного контролю фізіологічний розчин.

5 Кількісним показником ступеня пригнічення продукції планктонних клітин є значення оптичної щільності 540 нм.

Аналізуючи результати щодо здатності до дезорганізації сформованих добових біоплівок полірезистентними ізолятами *S.aureus* та *E.coli* після комплексної дії УЗ випромінювання і антимікробних препаратів встановлено, що при додаванні β-лактамних антимікробних препаратів після дії УЗ на добові біоплівки *S.aureus* та *E.coli* спостерігається значне зниження оптичної щільності біоплівок, як *S.aureus* (амоксиклав - 0,088±0,002 од.ощ. та 2,35±1,91 од.ощ. (К); цефтриаксон - 0,051±0,0037 од.ощ. та 2,24±0,29 од.ощ. К), так і штамів *E.coli* (амоксиклав - 0,082±0,004 од.ощ. та 1,469±0,16 од.ощ. (К); цефтриаксон - 0,079±0,004 од.ощ. та 1,475±0,12 од.ощ. (К) порівняно з контролем). При комплексному застосуванні левофлоксацину та УЗ випромінювання встановлено пригнічення оптичної щільності сформованої біоплівки: *S.aureus* у 30,4 рази (0,076±0,008 од.ощ.) і *E.coli* у 25,4 разів (0,058±0,006 од.ощ.) порівняно з контролем. Комплексне застосування бактеріофагу і УЗ випромінювання значно пригнічувало оптичну щільність біоплівок *S.aureus*: у 44,4 рази (0,033±0,002 од.ощ.); *E.coli*: у 68,5 разів (0,039±0,002 од.ощ.) порівняно з контролем, що призвело до повної дезорганізації дослідних біоплівок.

20

Таблиця 1

Вплив протимікробних препаратів та УЗ випромінювання на добові біоплівки мікроорганізмів та на продукцію цими біоплівками планктонних клітин

Ізоляти	Форма існування	Контроль	Протимікробні препарати			
			амоксиклав	левофлоксацин	цефтриаксон	бактеріофаг
<i>E.coli</i>	біоплівки	без УЗ	1,469±0,16	1,472±0,18	1,475±0,12	0,234±0,021
		УЗ	0,082±0,004	0,058±0,006	0,079±0,004	0,039±0,002
	Планктонні клітини	без УЗ	0,702±0,08	0,706±0,04	0,705±0,09	0,258±0,04
		УЗ	0,139±0,03	0,118±0,07	0,126±0,06	0,034±0,002
<i>S.aureus</i>	біоплівки	без УЗ	2,35±1,91	2,31±0,26	2,24±0,29	0,316±0,028
		УЗ	0,088±0,002	0,076±0,008	0,051±0,0037	0,033±0,002
	планктонні клітини	без УЗ	0,824±0,08	0,819±0,06	0,832±0,09	0,315±0,03
		УЗ	0,167±0,02	0,159±0,06	0,162±0,08	0,033±0,004

При визначенні здатності добових біоплівок полірезистентних штамів *S.aureus* та *E.coli* утворювати планктонні клітини встановлено, що після дії УЗ випромінювання та β-лактамних протимікробних препаратів спостерігається пригнічення продукції планктонних клітин добовими біоплівками полірезистентних клінічних штамів *S.aureus* у 4,3 рази порівняно з контролем (при застосуванні амоксицилаву - 0,167±0,02 од.ощ. й 0,824±0,08 од.ощ.) та у 5,1 разів - при застосуванні цефтриаксону (0,162±0,08 од.ощ. й 0,832±0,09 од.ощ. відповідно). Пригнічується також й швидкість утворення планктонних клітин опроміненими біоплівками полірезистентних штамів *E.coli* при застосуванні амоксицилаву у 5,1 разів (0,139±0,03 од.ощ. й 0,702±0,08 од.ощ.), при застосуванні цефтриаксону - у 5,6 разів (0,126±0,06 од.ощ. й 0,705±0,09 од.ощ. відповідно). При комплексному застосуванні препарату з групи фторхінолонів левофлоксацину і УЗ випромінювання встановлено пригнічення утворення планктонних клітин *S.aureus* у 5,2 разів (0,159±0,06 од.ощ. та 0,819±0,06 од.ощ.) й *E.coli* - у 6 разів (0,118±0,07 од.ощ. та 0,706±0,04 од.ощ.) відповідно.

В результаті дослідження встановлено, що при застосуванні УЗ випромінювання та бактеріофагу пригнічується продукція планктонних клітин добовими біоплівками *E.coli* - у 20,8

разів ($0,034 \pm 0,002$ од.ощ. та $0,707 \pm 0,05$ од.ощ. відповідно) та *S.aureus* - у 25,1 разів ($0,033 \pm 0,002$ од.ощ. та $0,827 \pm 0,06$ од.ощ.) порівняно з позитивним контролем.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб пригнічення продукції патогенних мікроорганізмів, що включає моделювання біоплівки патогенних мікроорганізмів з наступною дією на них антибіотиками з ультразвуковим випромінюванням, який **відрізняється** тим, що для пригнічення продукції планктонних клітин біоплівками патогенних мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних процесів, ультразвуком з
- 10 ультразвуковою хвилею до 3 Вт/см^2 , робочою частотою коливань 26,5 кГц, амплітудою коливань до 80 мкм діють протягом 10 хв на добові біоплівки патогенних мікроорганізмів, сформованих на поверхні полістиролової панелі, потім додають розчини протимікробних препаратів, в тому числі і бактеріофагів, терmostатують протягом доби, вилучають планктонні клітини та за порівнянням оптичної щільності планктонних клітин до та після ультразвуку з протимікробними препаратами
- 15 оцінюють ступінь пригнічення їх продукції біоплівками, використовуючи як негативний контроль фізіологічний розчин, при цьому кількісним показником ступеня пригнічення продукції планктонних клітин є значення оптичної щільності 540 нм.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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

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