



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 104321

(13) C2

(51) МПК

A61L 2/08 (2006.01)

A61N 5/067 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2012 00488	(72) Винахідник(и): Каневський Валерій Олександрович (UA), Фільчаков Ігор Вікторович (UA)
(22) Дата подання заявки: 16.01.2012	(73) Власник(и): Каневський Валерій Олександрович, вул. Лайоша Гавро, 11, кв. 170, м. Київ, 04211 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 27.01.2014	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2009025915 A2; 29.02.2009. А. В. Беликов, А. Е. Пушкарєва, А. В. Скрипник. Теоретические и экспериментальные основы лазерной абляции биоматериалов. Учебное пособие. С-Петербург. 2011. 118 с. RU 2419394 C2; 27.05.2011. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // Генетика. 2004. - Т. 40, № 11. - с. 1445-1456. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов Salmonella typhimurium / Ю.М. Романова, Н.В. Алексеева, Т.А. Смирнова, А.Л. Андреев, Л.В. Диденко, А.Л. Гинцбург // Журн. микробиол. - 2006. - № 4. - с. 38-42. Gillis RJ, Iglewski BH. Azithromycin retards Pseudomonas aeruginosa biofilm formation. J Clin Microbiol. 2004, Dec, №42(12), p. 5842-5845.
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.07.2013, Бюл.№ 14	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.01.2014, Бюл.№ 2	

(54) СПОСІБ РУЙНУВАННЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ БІОПЛІВОК

(57) Реферат:

Винахід належить до способу боротьби з мікробами, а саме до підвищення ефективності руйнування бактеріальних біоплівків та їх тримірної структури, в якому руйнацію бактеріальних біоплівків здійснюють за допомогою опромінення бактеріальної біоплівки імпульсним фемтосекундним лазером з перестроюваною довжиною хвилі з потужністю випромінювання в межах від 25 до 40 мВт/см², довжиною хвилі 3835 Å, частотою світлових імпульсів лазерного випромінювання 70 МГц, тривалістю світлового імпульсу 140 фемтосекунд та часом опромінення від 10 до 20 хвилин.

UA 104321 C2

Галузь техніки до якої належить винахід та галузь його використання.

Винахід належить до засобів боротьби з мікробами, зокрема утворючими біоплівки. Винахід може бути застосований у медицині і ветеринарії для лікування інфекційних захворювань бактеріальної етіології та для знезаражування виробів медичного призначення.

5 Рівень техніки та опис прототипів.

Відкриття та вивчення біоплівок є одним із найбільш вагомих досягнень мікробіологічної науки останніх років. За сучасним визначенням біоплівки являють собою популяцію клітин незворотно закріплену на різноманітних біотичних та абіотичних поверхнях та огорнуту матриксом з екзополімерних субстанцій, протеїнів, полісахаридів та нуклеїнових кислот [2].
10 Формування біоплівок відбувається як комплексний процес, який у своєму розвитку включає прикріплення та імобілізацію мікроорганізмів на поверхні, міжклітинну взаємодію, формування мікроколоній, формування суцільної біоплівки та розвиток трьохвимірної структури біоплівки [3]. По суті біоплівки являють собою захищений спосіб росту, який дозволяє бактеріям виживати у ворожому для них середовищі. Було доведено роль бактеріальних біоплівок у розвитку цілого ряду інфекційних захворювань людини. Електронною мікроскопією було показано кількість
15 огорнутих слизом бактерій на поверхнях медичних пристроїв (артеріовенозні шунти, ендотрахеальні трубки, штучні клапани серця, ортопедичні імплантати, контактні лінзи, судинні катетери, тощо), які обумовлювали розвиток імплантат-асоційованої інфекції. При чому, саме тримірна структура біоплівки захищає бактерії, з яких складається біоплівка, від дії антибіотиків.
20 Саме тому розробка способів руйнування бактеріальних біоплівок, зокрема їх тримірної структури має велике практичне значення для медицини.

Відомі способи руйнування бактеріальних біоплівок:

1. Спосіб руйнування біоплівок за допомогою антибіотика Азитроміцин. Саме у Азитроміцині була встановлена здатність порушувати процес формування біоплівки штамми
25 *P. aeruginosa* [5], а також здатність Азитроміцину зменшувати масу та товщину біоплівки утвореної штамми *H. influenzae*. Недоліком цього способу є вибірковість до видів бактерій та не повне руйнування тримірної структури біоплівки, що знижує ефективність цього антибіотика.

2. Спосіб руйнування бактеріальних біоплівок за допомогою лазерів. Спосіб включає насичення біоплівки спеціальною фотосенсибілізуючою речовиною, яка руйнує біоплівку під час
30 опромінення її світлом лазера яке поглинається фотосенсибілізатором [4].

Недоліком способу є токсичність фотосенсибілізатора, що обмежує область його застосування.

3. Відомий спосіб застосування холодної плазми для руйнації бактеріальних біоплівок [6]. Цей спосіб продемонстрував свою ефективність для дезактивації поверхні медичних приладів,
35 хоча спосіб є непристосованим та малоєфективним при обробці ранових поверхонь шкіри та слизової, що є його суттєвим недоліком.

Запропонований нами спосіб позбавлений недоліків, присутніх у вище зазначених аналогів.

В основу винаходу поставлена задача підвищення ефективності руйнування бактеріальних біоплівок, що вкривають різні уражені частини тіла хворої людини, а також біоплівок, що
40 знаходяться на поверхні виробів медичного призначення.

Поставлена задача вирішується тим, що руйнація бактеріальних біоплівок (включаючи і руйнацію їх тримірної структури) здійснюється за допомогою опромінення місця знаходження бактеріальної біоплівки спеціальним імпульсним фемтосекундним лазером з перестроюваною
довжиною хвилі з параметрами лазерного світла:

- 45 - потужність випромінювання змінюється в межах : $25-40 \text{ мВт/см}^2$;
- довжина хвилі вибрана рівною 3835 Å ;
- частота світлових імпульсів лазерного випромінювання дорівнює 70 МГц ;
- час опромінення знаходиться у межах $10-20$ хвилин;
- тривалість кожного світлового імпульсу дорівнює 140 фемтосекундам.

50 Вибрані параметри лазерного опромінення забезпечують повну руйнацію тримірної структури бактеріальних біоплівок, що захищає бактерії від дії антибіотиків, та різних руйнівних факторів зовнішнього середовища.

Суть винаходу.

В основі запропонованого винаходу знаходиться опромінення бактеріальної біоплівки
55 світлом спеціального фемтосекундного лазера з перебудованою довжиною хвилі в заданому спектральному діапазоні, в заданому діапазоні потужності та протягом заданого часу. При цьому не застосовується токсичних фотосенсибілізаторів. Процедура опромінення адаптована до традиційно використовуваних медичних приладів (ендоскопи, колоноскопи, уретроскопи, інше) для опромінення слизових поверхонь. З метою вивчення руйнівної дії лазерного світла по

відношенню до бактеріальних біоплівки, включаючи руйнацію тримірної структури біоплівки нами були проведені спеціальні експерименти з бактеріальними біоплівками.

Матеріали та методи дослідження

Для дослідження використали 15 штамів *Pseudomonas aeruginosa*, виділені з ран при інфекціях стопи від хворих на цукровий діабет та 3 штами *P. aeruginosa*, виділені з вух у хворих на хронічний середній отит.

Здатність до формування біоплівки мікроорганізмами проводили згідно з методиками Романової Ю.М. із співавт. [3]. Бактеріальні культури вирощували в поживному бульйоні при температурі 37 °С. Визначення проводили в плоскодонних планшетах для імуноферментного аналізу. Нічні культури штамів розводили рідким поживним середовищем до концентрації 10^7 КУО/мл, отримані суспензії вносили по 150 мкл у 96-лункову планшету (по 4 лунки для кожного штаму). Для контролю у 4 лунки вносили поживний бульйон, в якому інкубували культури. Як поживне середовище використовували трипказо-соєвий бульйон (TSB) та трипказо-соєвий бульйон з 2 % глюкози (TSBG), виробництва bioMérieux (Франція). Планшети інкубували при 37 °С 24 год. Формування біоплівки оцінювали по інтенсивності забарвлення спиртового розчину на фотометрі за довжини хвилі 630 нм. Кількісним визначенням ступеня утворення біоплівки слугували значення оптичної густини (ОГ).

В досліді використовували фемтосекундний лазерний комплекс ТОВ "Біофізика Україна", з перестроюваною частотою (ТУ У 33,1-34413533-001.2008, свідоцтво про державну реєстрацію № 8445/2008, від 24.12.2008). Спектральний діапазон дії: 370-450 нм.

При вивченні дії лазерного опромінення на мікроорганізми різних таксономічних груп були використані музейні штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 та *Pseudomonas aeruginosa* ATCC. Готували суспензії добових культур мікроорганізмів оптичною густиною 0,5 за МакФарландом або 10 ОД за стандартом мутності ДІСК. Агарові культури бактерій засівали газоном на чашки із розрахунку 0,1 мл культури (10^7 КУО/мл). Після 10 хв. підсушування проекцію чашок з засіяними бактеріями, опромінювали лазерним світлом різної потужності (5-40 мВт/см²) і діаметром зони опромінення 12 мм проягом 10 хв. Після інкубації в термостаті при 37 °С проводили облік результатів по виявленню зон затримки росту бактерій.

Для мікроскопічного аналізу біоплівки бактерій вирощували на покривному склі та монтували їх на предметному столику. Зразки біоплівки вивчали в скануючому електронному мікроскопі JSM 6060 LA (Jeol, Токуо, Япон) у режимі вторинних електронів при прискореній напрузі 30 кВ. Для запобігання накопичення поверхнього заряду та отримання контрастного зображення на поверхню зразка у вакуумі наносили тонкий шар золота методом катодного розпилення. Окремі зразки біоплівки піддавали дії лазерного опромінення, після чого проводили мікроскопічний аналіз.

Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за критерієм Ст'юдента [1].

Результати дослідження та їх обговорення

В попередній серії дослідів була вивчена дія лазерного опромінення різної потужності на ріст бактеріальних культур на твердому поживному середовищі. Як свідчать дані, наведені в табл.1 лазерне опромінення поверхні середовища потужністю більше 20 мВт/см² забезпечує чітку зону затримки росту, як грам-негативних так і грам-позитивних бактерій.

Таблиця 1

Результати дії лазерного опромінення різної потужності на ріст бактерійних культур

Бактерійні культури	Наявність зон затримки росту після опромінення різною потужністю			
	5 мВт/см ²	15 мВт/см ²	25 мВт/см ²	40 мВт/см ²
<i>S.aureus</i> ATCC	-	-	+	+
<i>E.coli</i> ATCC	-	-	+	+
<i>P.aeruginosa</i> ATCC	-	-	+	+
<i>P.aeruginosa</i> 477	-	-	+	+
<i>P.aeruginosa</i> 482	-	-	+	+
<i>P.aeruginosa</i> 348	-	-	+	+

На Фото 1 наведені чіткі зони затримки росту бактерій *P.aeruginosa* в місці дії лазерного опромінення потужністю 25 мВт/см². Важливо відзначити, що під час опромінення мікроорганізми перебували на початку логарифмічної (експоненціальної) фази росту.

Таким чином, лазерне опромінення вказаного діапазону та щільності потужності більш за 20 мВт/см² володіє вираженим бактерицидним ефектом дії.

Здатність до формування біоплівки на сьогодні встановлено для ряду таксономічних груп мікроорганізмів, зокрема *Pseudomonas* spp. При дослідженні бактерій *P. aeruginosa* було встановлено, що здатність до формування біоплівки є штамоспецифічним явищем. Показники одиниць оптичної густини, які є опосередкованим показником щільності утвореної біоплівки, коливались у межах від 0,37 до 2,72 ОГ.

Для подальших досліджень, пов'язаних із оцінкою впливу фотонів світла на сформовану біоплівку, нами було відібрано 2 штами *P. aeruginosa*, які продемонстрували найбільш високі кількісні показники ОГ-штам № 477 та 482 (2,72 та 2,70, відповідно).

Аналіз результатів мікроскопічних досліджень явно демонструє суттєву різницю в геометричній структурі біоплівки до та після опромінення лазером. Так на Фото 2 (А і В), зробленого до лазерного опромінення ми бачимо чітко виражену тримірну структуру біоплівки, що складається з нагромадження бактерій одна на одну, що має вигляд багатоповерхової конструкції.

Після дії лазерного опромінення багатоповерхова конструкція бактерій перетворилася у прошарок бактерій розмішених в одній площині, що свідчить про руйнівну дію фотонів світла на тримірну структуру біоплівки *P. aeruginosa* (Фото 2, В і Г).

Джерела інформації:

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. - Л.: Медгиз. - 1962. - 179 с.

2. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // Генетика. 2004. - Т. 40, № 11. - С. 1445-1456.

3. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium* / Ю.М. Романова, Н.В. Алексеева, Т.А. Смирнова, А.Л. Андреев, Л.В. Диденко, А.Л. Гинцбург // Журн. микробиол. - 2006. - № 4. - С. 38-42.

4. Keyvan Nouri. Laser in Dermatology and Medicine. Springer-Verlag, 2011.

5. Gillis RJ, Iglewski BH. Azithromycin retards *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. J Clin Microbiol. 2004 Dec; 42(12):5842-5.

6. Перспективы использования низкотемпературной плазмы в области биологической и экологической безопасности. Холоденко В.П., Чугунов В.А., Ирхина И.А., Кобзев Е.Н., Жиркова Н.А, Ермоленко З.М., Трушкин Н.И, Грушин М.Е. 2, Акишев Ю.С. Государственный научный центр Прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Государственный научный центр РФ ТРИНИТИ, Троицк.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб руйнації бактеріальних біоплівок, який включає руйнацію тримірної структури біоплівки, що характеризується опроміненням бактеріальної біоплівки променем лазера, який **відрізняється** тим, що як джерело світла використовують імпульсний фемтосекундний лазер з перестроюваною довжиною хвилі, потужність випромінювання якого змінюється в межах від 25 до 40 мВт/см², довжина хвилі вибрана рівною 3835 Å, частота світлових імпульсів лазерного випромінювання дорівнює 70 МГц, час опромінення знаходиться у межах від 10 до 20 хвилин, тривалість кожного світлового імпульсу дорівнює 140 фемтосекундам.

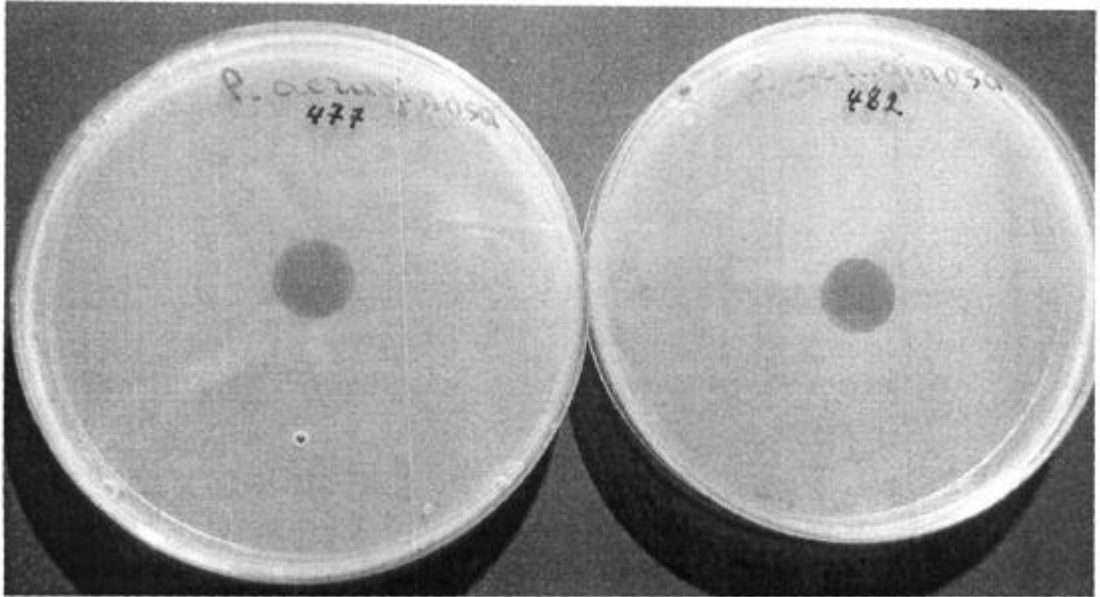
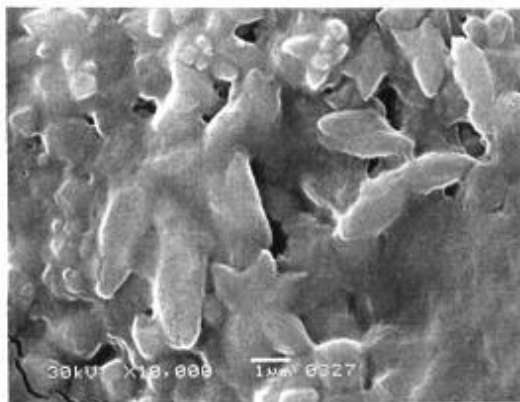
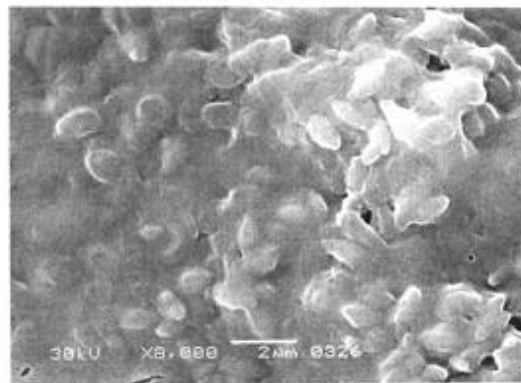


Фото 1

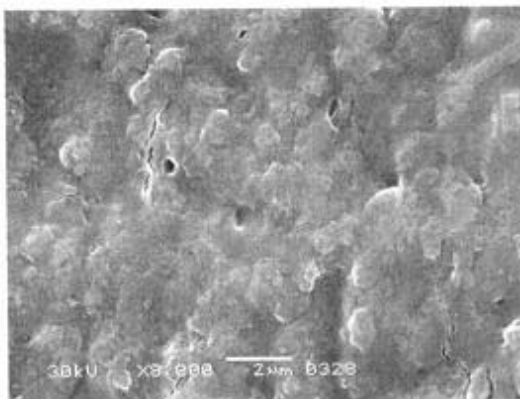
Зони затримки росту бактерій *P.aeruginosa* 477 і 482 в місці дії лазерного опромінення.



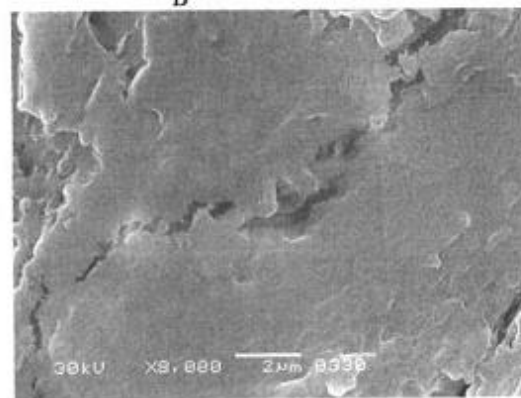
А



Б



В



Г

Фото 2

Структура біоплівки бактерій *P. aeruginosa* до (А і Б) та після (В і Г) опромінення лазером впродовж 10 хвилин