



The effect of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of bacteria that are isolated from chronic anal fissures

I. M. Kozlovska*, N. Y. Romanjuk**, L. M. Romanjuk**,
M. D. Kukhtyn***, Y. V. Horiuk****, G. V. Karpyk***

*Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

**I. Y. Horbachevsky Ternopil State Medical University, Ternopil, Ukraine

***Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ternopil, Ukraine

****State Agrarian and Engineering University in Podilya, Kamianets-Podilskiy, Ukraine

Article info

Received 08.10.2017

Received in revised form

14.11.2017

Accepted 16.11.2017

Bukovinian State Medical
University, Theatralna sq., 2,
Chernivtsi, 58002, Ukraine.
Tel.: +38-050-670-59-13
E-mail: irkakim5@gmail.com

I. Horbachevsky Ternopil State
Medical University, m. Voli, 1,
Ternopil, 46001, Ukraine.
Tel.: +38-097-854-87-81
E-mail: fedchysym@tdmu.edu.ua

Ternopil Ivan Puluj
National Technical University,
Ruska st., 56,
Ternopil, 46001, Ukraine.
Tel.: +38-097-239-20-57
E-mail: kuchtynnic@gmail.com

State Agrarian and Engineering
University in Podilya,
Shevchenko st., 13,
Kamianets-Podilskiy, 32300,
Ukraine.
Tel.: +38-097-661-79-64
E-mail: goruky@ukr.net

Kozlovska, I. M., Romanjuk, N. Y., Romanjuk, L. M., Kukhtyn, M. D., Horiuk, Y. V., Karpyk, G. V. (2017). The effect of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of bacteria that are isolated from chronic anal fissures. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 8(4), 577–582. doi:10.15421/021789

The microorganisms that are formed in biofilm cause about 60% of chronic and recurrent diseases, and as a consequence, traditional etiotropic antibacterial therapy is ineffective. Chronic anal fissures are also a disease which is caused by biofilm forms of bacteria, has a chronic course and is difficult to treat. The sensitivity of planktonic and biofilm forms of bacteria isolated from chronic anal fissures to antibacterial drugs was determined and the method of degradation of biofilm by electrophoresis for the effective treatment of fissures was developed. It was found that the most effective antibiotics against planktonic forms of bacteria were cephalosporins III and IV generations: cefepime, cefoperazone and ceftazidime. Exceptionally, only bacteria of the genus *Enterococcus*, which were sensitive to ceftazidime, were found to be 38.9%. The sensitivity of the bacteria to Furamag was from 60.0% to 100.0%, and only *P. aeruginosa* exhibited resistance in 100.0% of the studied cultures. The number of sensitive to gatifloxacin strains of *P. aeruginosa* and *Enterobacter* spp. was 71.4%, all other isolated bacteria were sensitive to this preparation from 77.8% to 100.0%. Among the five studied antiseptics (chlorhexidine, deccasan, octinisept, povidone iodine, dioxidine), the greatest antimicrobial activity was found in dioxidine and betadine (povidone iodine) solutions, the sensitivity of the microflora was from 60.0% to 100.0%. We found that the most protected biofilm matrix was *P. aeruginosa* and *Enterococcus* spp. We found that the antibiotic which had the best effect on cells in biofilm was fluoroquinolone gatifloxacin. After its influence on the biofilm *P. aeruginosa* and *Enterococcus* spp., the number of living cells didn't exceed $\lg 1.5 \pm 0.02$ CFU/cm² in the area of the biofilm, and *S. aureus* and *E. coli* cells were completely inactivated. After the influence of other antibiotics, the number of microbial cells that survived in the biofilm did not exceed $\lg 2.9 \pm 1.6$ CFU/cm² of the area. It was found that after the action of dioxin, the amount of viable microbial cells was up to $\lg 2.9 \pm 1.7$ CFU/cm² of biofilm area. Antiseptics: octine septum, ranopost, decaSan and chlorhexidine exhibited less strong bactericidal action on cells in biofilms, and the number of bacteria that survived after their action ranged from 2.9 ± 1.8 to $\lg 3.7 \pm 2.1$ CFU/cm² of biofilm area. We propose using solution "Dioxysol-Darnitsa" (active substance dioxidine) for local treatment of patients with chronic anal fissures for intracutaneous electrophoresis of the fissure. We established that under the influence of electrophoresis at a current of 0.05–0.10 mA/cm² of the area of the biofilm with dioxidine, bacteria were not isolated. This indicates on the destruction of the matrix and the effective contact of dioxidine with microbial cells and the manifestation of bactericidal action. Consequently, laboratory microbiological studies indicate that the use of electrophoresis with dioxysole in the treatment of chronic anal fissures is promising.

Keywords: antibiotics; antiseptics; sensitivity; biofilm; electrophoresis; anal fissures

Вплив антимікробних препаратів на планктонні та біоплівкові форми бактерій, виділені з хронічних анальних тріщин

I. M. Козловська*, Н. Є. Романюк**, Л. М. Романюк**,
М. Д. Кухтин***, Ю. В. Горюк****, Г. В. Карпик***

*Буковинський державний медичний університет, Чернівці, Україна

**Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, Тернопіль, Україна

***Тернопільський національний технічний університет імені І. Пулюя, Тернопіль, Україна

****Подільський державний аграрно-технічний університет, Кам'янець-Подільський, Україна

Визначено чутливість планктонних та біоплівкових форм бактерій, виділених із хронічних анальних тріщин, до антибактеріальних препаратів, розроблено спосіб деградації біоплівки електрофорезом для ефективного лікування дефекту слизової оболонки. Найефективнішими з антибіотиків на планктонні форми бактерій виявилися цефалоспорины III і IV покоління: цефепім, цефоперазон і цефтазидим. Із п'яти досліджених антисептиків виявлено найбільшу протимікробну дію розчину діоксидину та розчину бетадину (повідонід): чутливість мікрофлори становила 60–100%. Із досліджених антибіотиків найкраще впливає на клітини біоплівки гатифлоксацин. Після його дії на біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* і *Enterococcus* spp. кількість живих клітин не перевищувала $\lg 1,5 \pm 0,02$ КУО/см² площі біоплівки, а клітини *Staphylococcus aureus* і *Escherichia coli* повністю інактивовані. Після впливу інших антибіотиків кількість мікробних клітин, що вижили у біоплівці, не перевищувала $\lg 2,9 \pm 1,6$ КУО/см² площі. Після дії діоксидину кількість життєздатних мікробних клітин становила до $\lg 2,9 \pm 1,7$ КУО/см² площі біоплівки. Запропоновано для місцевого лікування хворих на хронічні анальні тріщини та для внутрішньотканинного електрофорезу тріщин використовувати розчин «Діоксизоль-Дарниця» (діюча речовина діоксидин). Під час електрофорезу силою струму 0,05–0,10 мА/см² площі біоплівки з діоксидином бактерій не виділено. Це вказує на руйнування матриксу та добрий контакт діоксидину з мікробними клітинами та прояв бактерицидної дії.

Ключові слова: антибіотики; антисептики; чутливість; біоплівка; електрофорез; анальні тріщини

Вступ

Нині проблема боротьби із септичними запальними захворюваннями, які мають хронічний перебіг, досить актуальна, оскільки вони спричиняються мікроорганізмами у біоплівці, а традиційна етіотропна антибактеріальна терапія малоефективна (Zhao et al., 2013; Penesyan et al., 2015; Banin et al., 2017; Vorobey et al., 2017). Це пов'язано з тим, що мікроорганізми у біоплівці в 10–100 разів стійкіші до антибактеріальних препаратів за свої планктонні форми (Hoiby et al., 2010; Fuente-Nunez et al., 2013; Manavathu et al., 2014; Kukhtyn et al., 2017). У науковій літературі описано низку чинників, які відповідають за резистентність біоплівкових форм бактерій до антибіотиків. Бактерії у біоплівці мають знижений метаболізм і сповільнену швидкість росту клітин, внаслідок чого антимікробні препарати дифундують із біоплівки швидше, ніж досягається їх дія (Weigel et al., 2007; Hall-Stoodley and Stoodley, 2009). У біоплівці відбувається інактивація антибіотиків позаклітинними полімерами та енізимами та формування за впливом антимікробних препаратів клітин-персистерів (Gostev and Sidorenko, 2010). Також бактерії у біоплівці можуть обмінюватися плазмідами, які містять гени, що відповідають за їх резистентність до антибіотиків (Hall-Stoodley et al., 2004; Atkinson and Williams, 2009; Flemming and Wingender, 2010; Van Acker et al., 2014). Екзополісахариди матриксу біоплівки перешкоджають фагоцитарній активності макрофагів, внаслідок чого фагоцити не діють на бактерії, сформовані у біоплівці (Mah and O'Toole, 2001; Percival et al., 2012; Soto, 2013).

Нині достовірно встановлено роль біоплівок у розвитку понад 60% хронічних або рецидивуючих захворювань, в патогенезі яких бере участь мікробний чинник (Sanchez et al., 2013). Для мікроорганізмів перебування у стані біоплівки, який характеризується прикріпленням до будь-якої поверхні, що омивається – базова властивість, яка виробилася впродовж мільйонів років за впливу природного відбору та змінних екологічних чинників (Atkinson and Williams, 2009; Bessa et al., 2015). Тому нині науковці вважають, що ефективність будь-якого антимікробного препарату чи способу лікування слід перевіряти на адгезованих мікроорганізмах і вважати ефективними ті концентрації (دوزи), які діють бактерицидно на більшість бактерій у біоплівках, а не на планктонні їх форми (Levis, 2001; Cooper et al., 2014; Kukhtyn et al., 2017).

До захворювань, які мають хронічний перебіг і важко лікуються, відносять хронічні анальні тріщини (ХАТ) (Ebinger et al., 2017; Stewart et al., 2017; Wienert et al., 2017). Проте наразі дослідники недостатньо звертають увагу на роль біоплівкових форм бактерій у виникненні ХАТ. Тому вивчення видового складу мікрофлори ХАТ, здатність ізольованих бактерій формувати біоплівки та розроблення ефективних методів терапевтичного впливу на біоплівки – ключові питання лікування цієї патології.

Мета дослідження – визначити чутливість планктонних і біоплівкових форм бактерій, виділених із ХАТ, до антибактеріальних препаратів і розробити спосіб деградації біоплівки електрофорезом для ефективного лікування тріщин.

Матеріал і методи досліджень

Виділення та ідентифікація мікроорганізмів. Для виділення стафілококів змиви з ХАТ засівали на середовище – жовтково-сольовий м'ясопептонний агар. Виділення ентерококів проводили на середовищі Bile Esculin Azide Agar, стрептококів – Streptococcus Selective Agar (HiMedia). Ентеробактерії (ешерихії, протеї, клебсієли та інші) вирощували на середовищах Ендо, Левіна та Плоскірєва (Фармактив). Виділення *Pseudomonas aeruginosa* проводили на середовищі Pseudomonas Isolation Agar (HiMedia). Ідентифікацію виділених чистих культур проводили за морфологічними, тинкторіальними, культуральними, біохімічними властивостями та ознаками патогенності. Посіви інкубували в термостаті за температури 37 °С упродовж 24–48 годин. Ідентифікацію чистих культур проводили, враховуючи біохімічні тести, описані у визначнику бактерій Берджі (Vos et al., 2011).

Визначення щільності утворених біоплівок. У стерильні одноразові пластикові чашки Петрі вносили 5 см³ м'ясопептонного бульйону та 1 см³ добової тест-культури мікроорганізмів (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*) у концентрації 10⁷ КУО/см³ та інкубували за температури 37 °С упродовж 24–48 годин. Після інкубації чашки триразово відмивали від планктонних (неприкріплених) мікроорганізмів фосфатним буфером, висушували та фіксували утворені біоплівки 96° етиловим спиртом упродовж 10 хвилин. Потім забарвлювали 0,1% розчином кристалічного фіолетового впродовж 10 хвилин. У чашки Петрі додавали 3,0 см³ 96° етилового спирту та залишали на 20–30 хвилин, періодично струшуючи. Вимірювали оптичну густину спиртового розчину спектрофотометрично за довжини хвилі 570 нМ (Stepanovic et al., 2000). За густини промивного розчину з біоплівок до 0,50 од. щільність сформованих біоплівок вважали низькою, від 0,51 до 1,00 од. – середньою та за густини розчину понад 1,01 од. – високою (Kukhtyn et al., 2017).

Визначення чутливості мікроорганізмів, що перебувають у біоплівковій формі, до антибіотиків і антисептиків проводили на добових мікробних біоплівках, вирощених у пластикових чашках Петрі. Після 24 годин інкубації культур чашки триразово відмивали від планктонних (неприкріплених) мікроорганізмів стерильним фосфатним буфером і вносили 5 см³ свіжоприготовлених антибіотиків або антисептиків. Після експозиції антибіотики та антисептики зливали, чашки триразово промивали стерильним фосфатним буфером, вносили 5 см³ стерильного 0,9% розчину натрію хлориду та стерильним тампоном ретельно відмивали зі стінок і дна чашки мікробну біоплівку. Із чашок відбирали 1,0 см³ суспензії, готували низку десятикратних розведень, проводили посів 1,0 см³ кожного розведення у чашки Петрі, заливали МПА та інкубували за температури 37 °С упродовж 24–48 годин для визначення кількості бактерій (Cucarella et al., 2004).

Визначення чутливості планктонних мікроорганізмів, виділених із хронічних ран, до антибіотиків проводили класичним диск-дифузійним методом Кірбі – Бауера. Визначення чутливості планктонних мікроорганізмів до антисептиків проводили таким способом. Готували суспензії з чистих культур, висівали суспензії в чашки Петрі з МПА, виготовляли в МПА лунки за

допомогою пробійника № 10, заповнювали лунки антисептиками. Чашки Петрі інкубували в термостаті упродовж 24 годин, потім оцінювали результат за діаметром затримання росту мікроорганізмів навколо лунки. Діаметр до 15 мм – мікроорганізми нечутливі до антисептиків, від 16 до 20 мм – мікроорганізми помірно чутливі до антисептиків, від 21 до 25 мм – мікроорганізми чутливі до антисептиків, від 26 мм і більше – мікроорганізми високочутливі до антисептиків (Kukhtyn et al., 2014).

Вивчення впливу електрофорезу різної сили струму на бактерій, які перебувають у біоплівковій формі, проводили за власною методикою. Вирощували мікробні біоплівки у стерильних одноразових чашках Петрі. Після відмивання планктонних клітин фосфатним буфером вносили у чашки з біоплівками 5 см³ стерильного 0,9% розчину натрію хлориду, вставляли електроди та підключали прилад «Поток-1». Тривалість дії – 60 хвилин, сила струму – 0,025–0,100 мА/см² площі чашки Петрі. Після закінчення дії електрофорезу з чашок Петрі зливали фізрозчин і змивали відшаровані мікробні біоплівки стерильним фосфатним буфером. Потім вносили 5 см³ стерильного 0,9% розчину натрію хлориду та стерильним тампоном ретельно відмивали зі стінок і дна чашки мікробну біоплівку.

Із чашок відбирали 1,0 см³ суспензії, готували десятикратні розведення, висівали 1,0 см³ кожного розведення у чашки Петрі, заливали МПА та інкубували за температури 37 °С упродовж 48 годин для визначення кількості бактерій. Для визначення впливу електрофорезу з антисептиком діоксизолем на мікробні біоплівки дослідження проводили аналогічно, тільки електроди занурювали в чашки Петрі з біоплівками не у фізрозчин, а в діоксизоль.

Статистичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики з використанням програми Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Застосовували непараметричні методи досліджень (критерії Уїлкоксона, Манна – Уїтні). Визначали середнє арифметичне (\bar{x}), стандартну похибку середньої величини (SE). Різницю між порівнюваними величинами вважали достовірною за $P < 0,05$.

Результати

Проведено порівняльні дослідження чутливості виділених бактерій, які перебувають у планктонному стані (табл. 1) та у сформованих біоплівках (табл. 2), до антимікробних препаратів.

Таблиця 1

Чутливість (%) планктонних форм бактерій, виділених із хронічних анальних тріщин до антимікробних препаратів

Антимікробні препарати, кількість діючої речовини	Досліджені бактерії						
	<i>P. aeruginosa</i> , n = 7	<i>E. coli</i> , n = 34	<i>S. aureus</i> , n = 6	<i>Enterococcus</i> spp., n = 18	<i>Proteus</i> spp., n = 10	<i>Enterobacter</i> spp., n = 3	<i>Citrobacter</i> spp., n = 3
Цефепім, 30 мкг	87,7	91,2	83,3	83,3	100,0	100,0	100,0
Цефтазидим, 30 мкг	100,0	91,2	100,0	38,9	100,0	100,0	100,0
Цефоперазон, 75 мкг	71,4	91,2	100,0	88,9	100,0	100,0	100,0
Цефтриаксон, 30 мкг	42,8	67,6	83,3	44,4	0,0	66,7	33,3
Цефуроксим, 30 мкг	71,4	82,3	83,3	77,8	30,0	33,3	66,7
Гентаміцин, 10 мкг	87,7	88,2	83,3	72,2	100,0	100,0	100,0
Доксициклін, 10 мкг	0,0	76,5	50,0	38,9	60,0	33,3	66,7
Фурамаг, 300 од.	0,0	97,0	83,3	83,3	60,0	66,7	100,0
Гатифлоксацин, 5 мкг	71,4	97,0	83,3	77,8	100,0	66,7	100,0
Ципрофлоксацин, 5 мкг	71,4	91,2	66,7	72,2	100,0	100,0	100,0
Діоксизоль (діоксидин)	87,7	88,2	100,0	88,9	60,0	66,7	100,0
Октенісепт, 1 : 1	42,8	76,5	100,0	83,3	30,0	66,7	66,7
Бетадин, 10%	71,4	88,2	100,0	88,9	100,0	100,0	100,0
Декасан, 0,02%	42,8	67,6	50,0	72,2	30,0	66,7	33,7
Хлоргексидин, 0,05%	57,1	58,8	50,0	77,8	60,0	66,7	66,7

Найефективнішими серед досліджених антибіотиків виявилися цефалоспорины III і IV покоління: цефепім, цефоперазон і цефтазидим. Ці антибіотики проявляли бактерицидну дію на всі виділені бактерії з ХАТ. Винятком виявилися лише бактерії роду *Enterococcus* spp., які чутливі до цефтазидиму в 38,9%. Протимікробна активність інших цефалоспоринов хоча й була висока, але значно менша, ніж у цефоперазону та цефтазидиму. Чутливість планктонних форм бактерій до цефтриаксону коливалася у межах 33,3–83,3%, а *Proteus* spp. узагалі стійкі до цього препарату. Чутливість виділених бактерій до препарату нітрофуранового ряду – фурамагу – також висока (60–100%), лише *P. aeruginosa* проявляла стійкість у 100% досліджуваних культур.

Аміноглікозид гентаміцин проявляв стабільну бактерицидну дію на всі виділені бактерії, чутливість їх становила 72,2–100,0%. Ефективність антибіотиків тетрациклінового ряду, зокрема, доксицикліну, низька. Слід відмітити досить високу протимікробну активність у препаратів фторхінолонового ряду гатифлоксацину та ципрофлоксацину. Кількість чутливих до гатифлоксацину штамів *P. aeruginosa* та *Enterobacter* spp. становила 71,4%, всі інші виділені бактерії чутливіші до цього препарату (77,8–100,0%). Найвища чутливість до ципрофлоксацину була в ентеробактерій – 91,2–100,0%, найменша – у стафілококів і ентерококів – 66,7–72,2%. Отже, результати визначення чутливості виділеної мікрофлори до антибіотиків мають велике клінічне значення, оскільки дозволяють обґрунтувати вибір раціональної схеми антибіотикотерапії.

Для місцевого лікування хронічних анальних тріщин з антимікробних препаратів найчастіше використовують антисептики.

Ми визначили чутливість виділеної мікрофлори до антисептиків. Із п'яти досліджених антисептиків виявлено найбільшу протимікробну дію у розчинів діоксидину та бетадину (повідоніод), чутливість мікрофлори становила 60,0–100,0%. Найменш активний відносно виділеної мікрофлори антисептик декасан: чутливість бактерій – 30,0–72,2%. Враховуючи антимікробну дію антисептиків для місцевого лікування хворих на ХАТ і для внутрішньотканинного електрофорезу тріщин ми використовували розчин «Діоксизоль-Дарниця» (діюча речовина діоксидин).

Мікроорганізми здебільшого перебувають у біоплівках, а планктонна форма призначена для колонізації інших локалізацій. Результати досліджень впливу антимікробних препаратів на бактерії, які сформовані у біоплівки, наведено в таблиці 2. У дослід відібрано штами бактерій, планктонні форми яких чутливі до визначених у досліді антибіотиків у диск-дифузному методі Кірбі – Бауера та антисептиків у луночковому методі.

Як видно з даних таблиці 2, антимікробні препарати (антибіотики та антисептики) проявляли бактерицидну дію до мікроорганізмів у мікробній біоплівці, проте мікробні клітини виявлялися життєздатними на рівні вище «порогу інфікованості». Найбільше захищені біоплівкою виявилися клітини *P. aeruginosa* та *Enterococcus* spp. Із досліджених антимікробних засобів найкраще впливає на клітини в біоплівці гатифлоксацин. Після дії гатифлоксацину на біоплівки *P. aeruginosa* та *Enterococcus* spp. кількість живих клітин не перевищувала $1g \pm 0,1$ КУО/см² площі біоплівки, а клітини *S. aureus* і *E. coli* повністю інактивовані. За дії інших антибіотиків кількість мікробних клітин, що вижили, не перевищувала $1g \pm 1,6$ КУО/см² площі біоплівки. З антисептиків на бактерії у

біоплівках найкраще діяв діоксидин: кількість життєздатних мікробних клітин становила $10^{2,9} \pm 1,7$ КУО/см² площі біоплівки. Інші антисептики (октенисепт, декасан і хлоргексидин) проявляли

меншу бактерицидну дію на клітини у біоплівках, кількість бактерій, що вижили після їх дії, становила від $10^{2,9} \pm 1,8$ до $10^{3,7} \pm 2,2$ КУО/см² площі біоплівки.

Таблиця 2

Вплив антимікробних препаратів на бактерії у складі біоплівки (10^x КУО/см², $x \pm SE$)

Антимікробні препарати, кількість діючої речовини	Кількість клітин <i>P. aeruginosa</i> у біоплівці, n = 4		Кількість клітин <i>E. coli</i> у біоплівці, n = 12		Кількість клітин <i>S. aureus</i> у біоплівці, n = 3		Кількість клітин <i>Enterococcus</i> spp. у біоплівці, n = 5	
	до дії препарату	після дії препарату	до дії препарату	після дії препарату	до дії препарату	після дії препарату	до дії препарату	після дії препарату
Цефепім, 30 мг/л	6,6 ± 4,1	2,8 ± 1,3	6,5 ± 4,1	2,8 ± 1,5	6,7 ± 4,2	2,8 ± 1,3	6,7 ± 4,3	2,9 ± 1,3
Цефгазидим, 30 мг/л	6,6 ± 4,1	2,3 ± 1,3	6,5 ± 4,1	2,2 ± 1,2	6,7 ± 4,2	2,3 ± 1,2	6,7 ± 4,3	2,8 ± 1,5
Цефтриаксон, 30 мг/л	6,6 ± 4,1	2,1 ± 1,2	6,5 ± 4,1	2,9 ± 1,3	6,7 ± 4,2	2,7 ± 1,4	6,7 ± 4,3	2,8 ± 1,5
Гентаміцин, 10 мг/л	6,6 ± 4,1	2,5 ± 1,4	6,5 ± 4,1	2,3 ± 1,9	6,7 ± 4,2	2,9 ± 1,5	6,7 ± 4,3	2,9 ± 1,6
Гатифлоксацин, 5 мг/л	6,6 ± 4,1	1,5 ± 0,1	6,5 ± 4,1	0	6,7 ± 4,2	0	6,7 ± 4,3	1,4 ± 0,2
Діоксизоль	6,6 ± 4,1	2,8 ± 1,6	6,5 ± 4,1	2,8 ± 1,6	6,7 ± 4,2	2,8 ± 1,5	6,7 ± 4,3	2,9 ± 1,7
Октенисепт, 1 : 1	6,6 ± 4,1	3,4 ± 1,9	6,5 ± 4,1	2,9 ± 1,8	6,7 ± 4,2	2,9 ± 1,8	6,7 ± 4,3	2,9 ± 1,7
Бетадин, 10%	6,6 ± 4,1	3,7 ± 2,0	6,5 ± 4,1	3,3 ± 1,9	6,7 ± 4,2	3,0 ± 2,0	6,7 ± 4,3	3,2 ± 2,1
Декасан, 0,02%	6,6 ± 4,1	3,7 ± 2,2	6,5 ± 4,1	2,9 ± 1,3	6,7 ± 4,2	3,1 ± 1,6	6,7 ± 4,3	3,2 ± 2,1
Хлоргексидин, 0,05%	6,6 ± 4,1	3,5 ± 1,7	6,5 ± 4,1	2,9 ± 1,3	6,7 ± 4,2	3,0 ± 1,6	6,7 ± 4,3	3,0 ± 2,1

Отже, бактерії у біоплівках стійкіші до антимікробних препаратів, ніж їх планктонні форми. Оскільки, за даними різних авторів (Ifodij et al., 2014; Ebinger et al., 2017; Stewart et al., 2017; Wienert et al., 2017), хронічні рани здебільшого загоюються упродовж тривалого часу, можна стверджувати, що мікроорганізми, що виділяються з цих ран, перебувають у біоплівці та ускладнюють протимікробну терапію.

Із метою обґрунтування ефективності лікування ХАТ за допомогою внутрішньотканинного електрофорезу з діоксизолем вивчали вплив різної сили струму на деградацію біоплівки (табл. 3). За дії електрофорезу силою струму 0,05 мА/см² площі біоплівки, їх щільність зменшувалася в середньому в 1,6–2,0 раза ($P > 0,05$). Із підвищенням сили струму до 0,1 мА/см² площі щільність біоплівки суттєво зменшувалася, що вказує на

руйнування екзополісахаридного матриксу. Найсильніша деградація біоплівки відбулася в *Enterobacter* spp.: зменшення відбулося у 2,8 раза ($P > 0,05$), порівняно з контролем. У *S. aureus*, *E. coli* та *Enterococcus* spp. щільність біоплівок знизилася в 2,4–2,5 раза ($P > 0,05$). Найстійкішими до дії електрофорезу 0,1 мА/см² площі біоплівки виявилися бактерії виду *P. aeruginosa* – щільність біоплівок зменшилася в 1,9 раза.

Для лікування ХАТ із метою руйнування мікробної біоплівки та кращого бактерицидного впливу лікарських засобів проведено гальванізацію з розчином «Діоксизоль-Дарниця». Результати досліджень впливу електрофорезу з діоксизолем за різної сили струму на мікробні біоплівки наведено в таблиці 4. У дослід взяті штами бактерій, планктонні форми яких чутливі до діоксизолу у луночковому методі.

Таблиця 3

Вплив електрофорезу силою струму 0,05–0,1 мА/см² площі чашки Петрі та тривалістю 60 хвилин на мікробні біоплівки ($x \pm SE$; n = 27)

Вид бактерій	Щільність мікробних біоплівок			
	до дії електрофорезу, од. (контроль)	після дії електрофорезу силою струму 0,05 мА/см ² площі біоплівки, од.	до дії електрофорезу, од. (контроль)	після дії електрофорезу силою струму 0,1 мА/см ² площі біоплівки, од.
<i>P. aeruginosa</i> , n = 4	1,7 ± 0,1	1,1 ± 0,04*	1,8 ± 0,1	0,9 ± 0,04*
<i>S. aureus</i> , n = 3	1,8 ± 0,1	1,0 ± 0,04*	1,7 ± 0,1	0,7 ± 0,03*
<i>E. coli</i> , n = 12	1,4 ± 0,1	0,9 ± 0,05*	1,4 ± 0,1	0,5 ± 0,03*
<i>Enterococcus</i> spp., n = 5	1,8 ± 0,1	1,1 ± 0,03*	1,8 ± 0,1	0,7 ± 0,03*
<i>Enterobacter</i> spp., n = 3	1,3 ± 0,1	0,7 ± 0,04*	1,4 ± 0,1	0,5 ± 0,02*

Примітка: * – $P > 0,05$, щодо контролю.

Таблиця 4

Кількість бактерій у біоплівці до та після дії електрофорезу з діоксизолем із різною силою струму (10^x КУО/см², $x \pm SE$; n = 27)

Вид бактерій	Кількість бактерій на 1 см ² площі біоплівки до електрофорезу	Кількість бактерій після дії силою струму		
		0,025 мА/см ² площі біоплівки	0,05 мА/см ² площі біоплівки	0,1 мА/см ² площі біоплівки
<i>P. aeruginosa</i> , n = 4	6,7 ± 5,2	2,3 ± 1,2*	не виділено	не виділено
<i>S. aureus</i> , n = 3	6,8 ± 5,3	1,4 ± 0,3*	не виділено	не виділено
<i>E. coli</i> , n = 12	6,6 ± 5,2	1,5 ± 0,3*	не виділено	не виділено
<i>Enterococcus</i> spp., n = 5	6,7 ± 5,2	2,2 ± 0,9*	не виділено	не виділено
<i>Enterobacter</i> spp., n = 3	6,4 ± 5,1	не виділено	не виділено	не виділено

Примітка: див. табл. 3.

Із таблиці 4 видно, що застосування електрофорезу з антисептиком діоксизолем на мікробні біоплівки досить дієвий. За сили струму 0,05–0,10 мА/см² площі біоплівки бактерій не виділено. Це вказує на руйнування біоплівки також добрий контакт діоксидину з мікробними клітинами та прояв бактерицидної дії.

Обговорення

Нині достеменно з'ясовано, що хронічні гнійно-запальні процеси спричиняються мікроорганізмами у біоплівці, та традиційна етіотропна антибактеріальна терапія малоефективна (Penesyan et al., 2015; Banin et al., 2017). Тому науковці прово-

дять пошук дієвих методів і засобів впливу на бактерії у біоплівках із метою ефективного лікування запальних процесів. Наші дослідження виявили, що чутливість планктонних форм бактерій, виділених із ХАТ, до антибіотиків цефалоспоринів: цефепім, цефоперазон і цефгазидим становила 71,4–100,0%. Тільки ентерококи були стійкими до цефгазидиму (чутливість – 38,9%). Чутливість виділених бактерій до гентаміцину також була високою (72,4–100,0%), як і до фторхінолонів (гатифлоксацину та ципрофлоксацину – 66,7–100,0%). У дослідженнях (Hidijatov et al., 2012; Wienert et al., 2017) також вказується на високу чутливість (73,4–100,0%) мікрофлори ХАТ до антибіотиків цефалоспоринів і аміноглікозидів. Незважаючи на значну

чутливість планктонних форм бактерій, виділених із ХАТ, до антибіотиків, не завжди досягається позитивний результат під час лікування (Castillo and Margolin, 2004; Ebinger et al., 2017; Stewart et al., 2017), оскільки в патогенезі ХАТ провідна роль належить біоплівковим формам бактерій (Iftodij et al., 2014; Nedashkivs'ka et al., 2016). Ці дослідження збігаються з численними даними про необхідність визначення чутливості мікрофлори до антибіотиків під час лікування гнійно-запальних процесів. За нашими даними, антисептики менш дієві на планктонні форми бактерій, ніж антибіотики, що ймовірно пов'язано з частішим застосуванням їх для місцевого лікування ХАТ. Чутливість планктонних форм бактерій до антисептиків діоксидину та бетадину становила 60,0–100,0%, до розчинів октенисепту, декасану та хлоргексидину – 33,7–83,3%.

Під час визначення впливу антибіотиків і антисептиків на біоплівкові форми бактерій встановлено, що клітини у біоплівці стійкіші до антибактеріальних препаратів. Із досліджених антибіотиків найкраще діяв гатифлоксацин ймовірно завдяки його низькій молекулярній масі та здатності проникати через пори та канали біоплівки до мікробних клітин. Після дії гатифлоксацину на біоплівки *P. aeruginosa* та *E. faecalis* кількість живих клітин не перевищувала $lg 1,5 \pm 0,02$ КУО/см² змиву, а клітини *S. aureus* і *E. coli* повністю інактивовані. Про те, що фторхінолони легко дифундують через біоплівку та ефективно знижують її ріст і бактеріцидно діють на мікробні клітини, повідомляють також автори, які проводили досліді *in vitro* (Brooun et al., 2000; Stepanovic et al., 2000; Lewis, 2001). Також про підвищену стійкість бактерій у біоплівці, виділених із хронічних ран, до антибіотиків повідомляють дослідження інших авторів (Flemming and Wingender 2010; Sanchez et al., 2013; Sanchez-Vizuete et al., 2015).

Із досліджених нами антисептиків найкраще діяв на бактерії у біоплівках «Діоксизоль-Дарниця» – кількість життєздатних мікробних клітин зменшувалася до $lg 2,9 \pm 1,6$ на см² площі біоплівки. Бар'єрну функцію екзополісахаридного матриксу щодо антисептиків, зокрема, перекису водню, описано у дослідженнях (Elkins et al., 1999; Hassett et al., 1999), які вказують, що планктонні клітини гинули за концентрації 50 мкМ, а бактерії у біоплівці ефективно захищені, оскільки доза, яка доходила до клітин біоплівки, була нижчою бактеріцидного рівня. Це дає змогу стверджувати, що саме здатність бактерій, виділених зі слизової оболонки ХАТ, формувати біоплівку високої щільності ускладнює ефективність протимікробної терапії хвороби та визначає хронічний характер її перебігу. Тому, з метою обґрунтування ефективності лікування ХАТ за допомогою внутрішньотканинного електрофорезу з діоксизолем, ми вивчали вплив різної сили струму на бактерії у біоплівках і деградацію біоплівки.

За дії електрофорезу силою струму 0,025–0,100 мА/см² площі відбулося руйнування матриксу біоплівки та його щільність зменшувалася з високої до низької. Однак за дії сили струму 0,025 мА/см² площі біоплівки та діоксидину ще виділялися життєздатні клітини з біоплівки, що вказує на часткове руйнування матриксу. Підвищення сили струму до 0,05–0,10 мА/см² площі біоплівки спричиняло загибель клітин бактерій. Деградація матриксу біоплівки електрофорезом позбавляє мікробні клітини захисту, а застосування препарату «Діоксизоль-Дарниця» забезпечує бактеріцидний ефект. Del Pozo et al. (2009) також вказують на ефективність і перспективність використання фізичних методів для боротьби з бактеріями, які перебувають у біоплівці. Електричні поля низької напруги підвищували ефективність антисептиків, їх бактеріцидна концентрація на біоплівкові форми бактерій нижча, ніж мінімальна бактеріцидна концентрація для планктонних форм. Дослідники (Huang et al., 1996) продемонстрували ефективність ультразвуку щодо біоплівок *P. aeruginosa* – обробка підвищувала дію гентаміцину відносно тих самих біоплівок. Таким чином, лабораторні мікробіологічні дослідження вказують, що використання електрофорезу з діоксизолем для лікування ХАТ перспективне та актуальне.

Висновки

Із ХАТ виділяються умовно-патогенні бактерії, планктонні форми яких чутливі до антибіотиків цефалоспоринів III–IV покоління та фторхінолонів (66,7–100,0%). Чутливість цієї мікрофлори до антисептиків діоксидину та бетадину становила 60,0–100,0%, а до антисептиків октенисепту, декасану та хлоргексидину – 33,7–83,3%. Біоплівкові форми бактерій, виділені з ХАТ, стійкіші до антибіотиків і антисептиків, ніж їх планктонні форми. Із досліджених антибіотиків найкраще діяв на бактерії у біоплівках гатифлоксацин, після його впливу на біоплівки *P. aeruginosa* та *E. faecalis* кількість клітин не перевищувала $lg 1,5 \pm 0,02$ КУО/см² змиву, а бактерії *S. aureus* і *E. coli* повністю інактивовані. Із п'яти досліджених антисептиків найефективніше діяв на бактерії у біоплівці діоксидин. Після його впливу кількість мікробних клітин не перевищувала $lg 2,9 \pm 1,7$ КУО/см² площі біоплівки.

За дії електрофорезу силою струму 0,05 мА/см² площі біоплівки їх щільність зменшувалася в середньому в 1,6–2,0 раза, а за дії силою 0,1 мА/см² площі в 2,4–2,8 раза, що вказує на значну деградацію біоплівки. Завдяки застосуванню електрофорезу силою струму 0,05–0,10 мА/см² площі біоплівки з діоксидином відбувається руйнування біоплівки та прояв бактеріцидної дії антисептика. Враховуючи отримані дані, у комплексному лікуванні ХАТ рекомендовано проводити внутрішньотканинний електрофорез силою струму 0,05–0,10 мА/см² з антисептиком і призначати антибактеріальну терапію, попередньо визначивши чутливість до антибіотиків і антисептиків, виділених із тріщини мікроорганізмів.

References

- Atkinson, S., & Williams, P. (2009). Quorum sensing and social networking in the microbial world. *Journal of the Royal Society Interface*, 6, 959–978.
- Banin, E., Hughes, D., & Kuipers, O. P. (2017). Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 450–452.
- Bessa, L. J., Fazio, P., Di Giulio, M., & Cellini, L. (2015). Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: Some remarks about wound infection. *International Wound Journal*, 12(1), 47–52.
- Brooun, A., Liu, S., & Lewis, K. (2000). A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3), 640–646.
- Castillo, E., & Margolin, D. A. (2004). Anal fissures: Diagnosis and management. *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*, 6(1), 12–16.
- Cooper, R. A., Bjamsholt, T., & Alhed, M. (2014). Biofilms in wounds: A review of present knowledge. *Journal of Wound Care*, 23(11), 570–582.
- Cucarella, C., Tormo, M. A., Ubeda, C., Trotonda, M. P., Monzon, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., & Penades, J. R. (2004). Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 72(4), 2177–2185.
- Del Pozo, J. L., Rouse, M. S., Mandrekar, J. N., Sampedro, M. F., Steckelberg, J. M., & Patel, R. (2009). Effect of electrical current on the activities of antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(1), 35–40.
- Ebinger, S. M., Hardt, J., Warschkow, R., Schmied, B. M., Herold, A., Post, S., & Marti, L. (2017). Operative and medical treatment of chronic anal fissures – A review and network meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Gastroenterology*, 52(6), 663–676.
- Elkins, J. G., Hassett, D. J., Stewart, P. S., Schweizer, H. P., & McDermott, T. R. (1999). Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4594–4600.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633.
- Fuente-Nunez, C., Refluveille, F., Fernandez, L., & Hancock, R. E. (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 16(5), 580–589.
- Gostev, V. V., & Sidorenko, S. V. (2010). Bakterial'nye bioplenki i infekcii [Bacterial biofilms and infections]. *Zhurnal Infekologii*, 2(3), 4–15 (in Russian).
- Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*, 11(7), 1034–1043.

- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108.
- Hassett, D. J., Ma, J. F., Elkins, J. G., McDermott, T. R., Ochsner, U. A., West, S. E., Huang, C. T., Fredericks, J., Burnett, S., Stewart, P. S., McFeters, G., Passador, L., & Iglewski, B. H. (1999). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Molecular Microbiology*, 34(5), 1082–1093.
- Hidijatov, I. I., Adiev, R. F., Strizhkov, A. E., Kazakov, M. V., & Nurimanov, R. Z. (2012). Rezul'taty kompleksnogo obsledovaniya i hirurgicheskogo lecheniya bol'nyh s hronicheskoy anal'noj treshhinoj [The results of complex examination and surgical treatment of patients with chronic anal fissure]. *Astrahanskij Medicinskij Zhurnal*, 7(4), 256–259 (in Russian).
- Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 322–332.
- Huang, C. T., James, G., Pitt, W. G., & Stewart, P. S. (1996). Effects of ultrasonic treatment on the efficacy of gentamicin against established *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 6(4–5), 235–242.
- Ifodij, A. G., Kozlovskaja, I. M., Olenovich, O. A., Bilik, O. V., & Brodovskij S. P. (2014). Vpliv mikroflori kishchechniku na patogenezu perebigu hronichnih uskladnenih anal'nih trishhin [Influence of intestinal microflora on the pathogenesis of chronic complicated anal fissures]. *Bukovinskij Medicnij Visnik*, 18(3), 78–82 (in Ukrainian).
- Kukhtyn, M., Berhilevyh, O., Kravcheniuk, K., Shynkaruk, O., Horyuk, Y., & Semaniuk, N. (2017). Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 5(11), 26–33.
- Kukhtyn, M., Berhilevyh, O., Kravcheniuk, K., Shynkaruk, O., Horyuk, Y., & Semaniuk, N. (2017). The influence of disinfectants on microbial biofilms of dairy equipment. *Eureka: Life Sciences*, 5, 11–17.
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 999–1007.
- Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1), 34–39.
- Manavathu, E. K., Vager, D. L., & Vazquez, J. A. (2014). Development and antimicrobial susceptibility studies of *in vitro* monomicrobial and polymicrobial biofilm models with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology*, 14(1), 53.
- Nedashkivska, V. V., Dronova, M. L., & Vrinchanu, N. O. (2016). Bioplivki ta jih rol' v infekcijnyh zahvorjuvanniah [Biofilms and their role in infectious diseases]. *Ukrainij'skij Naukovo-Medychnij Molodizhnyj Zhurnal*, 98, 10–19 (in Ukrainian).
- Penesyan, A., Gillings, M., & Paulsen, I. T. (2015). Antibiotic discovery: Combating bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules*, 20(4), 5286–5298.
- Percival, S. L., Hill, K. E., Williams, D. W., Hooper, S. J., Thomas, D. W., & Costerton, J. W. (2012). A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 20(5), 647–657.
- Sanchez, C. J., Mende, K., Beckius, M. L., Akers, K. S., Romano, D. R., Wenke, J. C., & Murray, C. K. (2013). Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infectious Diseases*, 13(1), 47.
- Sanchez-Vizuet, P., Orgaz, B., Aymerich, S., Le Coq, D., & Briand, R. (2015). Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–12.
- Soto, S. M. (2013). Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 4(3), 223–229.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179.
- Stewart Sr, D. B., Gaertner, W., Glasgow, S., Migaly, J., Feingold, D., & Steele, S. R. (2017). Clinical practice guideline for the management of anal fissures. *Diseases of the Colon and Rectum*, 60(1), 7–14.
- Van Acker, H., Van Dijk, P., & Coenye, T. (2014). Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends in Microbiology*, 22(6), 326–333.
- Vorobey, E. S., Voronkova, O. S., & Vinnikov, A. I. (2017). Korekcija dysbiozu pihvy myshej, vyklykanogo plivkotvornym shtatom *Staphylococcus aureus*, za dopomogoj bakteriofagiv i probiotykviv [Correction of vaginal dysbiosis in mice caused by a film-forming strain *Staphylococcus aureus*, using bacteriophages and probiotics]. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(2), 252–258 (in Ukrainian).
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., & Whitman, W. (Eds.). (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 3: The Firmicutes. Springer Science & Business Media.
- Weigel, L. M., Donlan, R. M., Shin, D. H., Jensen, B., Clark, N. C., McDougal, L. K., Zhu, W., Musser, K. A., Thompson, J., Kohlerschmidt, D., Dumas, N., Limberger, R. J., & Patel, J. B. (2007). High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1), 231–238.
- Wienert, V., Raulf, F., & Mlitz, H. (2017). *Anal fissure: Symptoms, diagnosis and therapies*. Springer.
- Zhao, G., Usui, M. L., Lippman, S. I., James, G. A., Stewart, P. S., Fleckman, P., & Olerud, J. E. (2013). Biofilms and inflammation in chronic wounds. *Advances in Wound Care*, 2(7), 389–399.