

УДК: 616-001-036.6-002.31+615.281

**АНТИБАКТЕРІАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ
ПОЛІОКСОМЕТАЛАТУ ГОЛЬМІЮ ПО
ВІДНОШЕННЮ ДО ЗБУДНИКІВ
ГНІЙНО-ЗАПАЛЬНИХ УСКЛАДНЕНЬ У
ПОСТТРАВМАТИЧНИХ ІЗ ТЯЖКИМИ ТРАВМАМИ**

Лебедєва Н.Ю., Піддубна О.М.

Донецький національний медичний університет
ім. М. Горького

Україна, Донецьк, 83003, пр. Ілліча, 16, E-mail:
natalia_swan@mail.ru

Полірезистентність деяких видів збудників інфекційних хвороб представляє значну проблему для ефективної етіотропної терапії. Цей факт створює велику небезпеку для здоров'я людини [1]. Звісно, що людина не в змозі створювати вплив на виникнення резистентності у мікроорганізмів до хіміопрепаратів, у тому числі і до антибіотиків. Властивість набувати стійкості до різних речовин, які володіють антимікробною дією, є окремою характеристикою бактеріальної еволюції. Це явище не можна повернути назад, його можна лише зробити повільним. ВООЗ вважає проблему антимікробної резистентності найбільш пріоритетною. Про це говорить розробка «Глобальної стратегії ВООЗ по утриманню резистентності до антимікробних препаратів» [2]. Пошук нових хімічних речовин, до яких мікроорганізми є чутливими та дія яких є знищуючою для представників мікробного світу, є одним із актуальних шляхів цієї стратегії. Певний інтерес викликають антимікробні властивості біоцидів (антисептиків, дезінфікуючих засобів та консервантів) [3]. У полі нашого зору з'явилися поліоксометалати (ПОМ), які за даними світової літератури володіють антибактеріальною, антивірусною та фунгіцидною діями [4-8], тому метою нашого дослідження стало виявлення антимікробної дії гольмію на клінічні штами бактерій різних видів.

Матеріали і методи

У ході проведених досліджень вивчено антибактеріальні властивості синтезованого поліоксометалату гольмію ($\text{HoW}_{10}\text{O}_{36}^9$) по відношенню до збудників гнійно-запальних ускладнень у постраждалих із тяжкими травмами опорно-рухової системи. Дослідження проведено на штаммах мікроорганізмів, що найчастіше було виділено з виділення ран хворих (по 10 штамів кожного мікроорганізму): *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*. В якості контрольних використано референтні штами мікроорганізмів: *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* №235, *E. faecalis* №5, *E. coli* ATCC 25922.

З метою виявлення антибактеріальної дії гольмію проведено визначення величини мінімальної

пригнічуючої концентрації (МПК) водних розчинів даної речовини у п'яти двократних розведеннях: 1×10^{-2} М, 5×10^{-3} М, 1×10^{-3} М, 5×10^{-4} М, $2,5 \times 10^{-4}$ М. Приготовані розчини гольмію було простерилізовано в автоклаві при тиску 1 атм протягом 60 хвилин. Для збереження заданої концентрації розчинів додавали до мітки стерильну дистильовану воду замість рідини, що вийшла з парою. Значення рН вихідних розчинів складало приблизно 6,5 одиниць.

Величину МПК гольмію на мікроорганізми визначали за допомогою методу серійних розведень у щільному поживному середовищі - м'ясо-пептонному агарі (МПА) [9, 10]. Розчини гольмію у різних концентраціях асептично вносили до флаконів з приготованим, стерилізованим у автоклаві та охолодженим до 50°C МПА (1 частина речовини та 9 частин МПА), розливали по чашках Петрі шаром товщиною 3 - 4 мм. Після затвердіння агару на його поверхню бактеріологічною петлею (діаметр петлі - 3 мм) наносили краплю приготованих суспензій різних штамів мікроорганізмів у концентрації 10^7 КУО/мл. Відповідну концентрацію було приготовано шляхом розведення у 10 разів початкової суспензії мікроорганізмів, що дорівнювала 0,5 одиниць за шкалою стандартів мутності McFarland (10^8 КУО/мл). В якості контролю росту робили засів досліджуваних штамів мікроорганізмів на МПА без додавання гольмію. Засіви інкубували у термостаті при температурі 37°C протягом 20 годин.

Облік результатів дослідження проводили, розташував чашки Петрі на темну поверхню, що не відображує світло. За МПК приймали ту концентрацію гольмію, яка викликала повне пригнічення росту (повну відсутність росту на чашці Петрі з МПА) певного штаму мікроорганізму.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за критерієм згоди Пірсона Хі-квадрат (χ^2) [11]. За нульову статистичну гіпотезу приймали припущення, що додавання розчинів гольмію у різних концентраціях до поживного середовища (МПА) не впливає на ростові властивості досліджуваних мікроорганізмів (не пригнічує їхній ріст), тобто аніон гольмію не має антибактеріальної дії.

Результати оцінювали за принципом наявності росту / відсутності росту мікроорганізмів на чашках Петрі з додаванням до МПА розчинів гольмію у певних концентраціях. Підраховували кількість штамів того чи іншого мікроорганізму, що вирости на МПА при засіві їх у концентрації 10^7 КУО/мл (абсолютне число та процентне відношення штамів, що вирости на МПА, від загальної кількості досліджуваних штамів даного мікроорганізму), та кількість штамів, ріст яких на МПА був повністю відсутнім.

Порівняння проводили між кількістю штамів мікроорганізмів, що вирости на контрольній чашці Петрі з МПА без додавання гольмію, та кількістю штамів мікроорганізмів, що вирости на МПА з додаванням до нього розчинів гольмію у кожній досліджуваній концентрації. Також порівнювали кількість штамів

мікроорганізмів, що вирости на МПА з додаванням гольмію у певній концентрації, з кількістю штамів, що вирости на МПА з додаванням гольмію у інших концентраціях.

Таблиця.- Рости властивості мікроорганізмів на м'ясо-пептонному агарі при додаванні до нього гольмію у певних концентраціях

Концентрація гольмію, М	Кількість штамів мікроорганізмів, що вирости на поживному середовищі з певною концентрацією гольмію											
	Staphylococcus aureus			Staphylococcus epidermidis			Enterococcus faecalis			Escherichia coli		
	N	n	%	N	n	%	N	n	%	N	n	%
К	11	11	100,0±0,0	11	11	100,0±0,0	11	11	100,0±0,0	11	11	100,0±0,0
1×10^{-2}	11	0***	0,0±0,0	11	3***	27,3±13,4	11	3*	27,3±13,4	11	11	100,0±0,0
5×10^{-3}	11	10	90,9±8,7	11	11	100,0±0,0	11	4**	36,4±14,5	11	11	100,0±0,0
1×10^{-3}	11	11	100,0±0,0	11	11	100,0±0,0	11	4**	36,4±14,5	11	11	100,0±0,0
5×10^{-4}	11	11	100,0±0,0	11	11	100,0±0,0	11	4**	36,4±14,5	11	11	100,0±0,0
$2,5 \times 10^{-4}$	11	11	100,0±0,0	11	11	100,0±0,0	11	4**	36,4±14,5	11	11	100,0±0,0

Примітки: N – загальна кількість досліджуваних штамів мікроорганізмів; n – кількість штамів мікроорганізмів, що вирости на м'ясо-пептонному агарі при додаванні до нього гольмію у певних концентраціях (абсолютне число); % - теж (процентне відношення n від N); K – контроль росту мікроорганізмів (ріст на середовищі без додавання гольмію); * - достовірність відмінностей ($P < 0,001$) при порівнянні показників із контролем за критерієм Хі-квадрат; ** - теж ($P < 0,002$); *** - достовірність відмінностей ($P < 0,001$) при порівнянні показників із контролем та з показниками при різних концентраціях гольмію. Нульову гіпотезу про недостовірність (випадковість) відмінностей відкидали, а відмінності враховували статистично значущими з малою імовірністю помилки (5%, 1%, 0,2% або 0,1%) при умові, що розраховане значення χ^2 (при числі ступенів волі $k=1$) перевищує табличне (критичне) значення χ^2 при рівні значущості $P=0,05$, $P=0,01$, $P=0,002$ або $P=0,001$

Результати та обговорення

Результати бактеріологічних досліджень антимікробної дії гольмію на збудників гнійно-запальних ускладнень у постраждалих із тяжкими травмами опорно-рухової системи та на референтні штами мікроорганізмів представлено у таблиці.

При культивуванні засівів мікроорганізмів на контрольних чашках Петрі з МПА без додавання гольмію виявлено наявність росту всіх штамів кожного з досліджуваних мікроорганізмів у 100,0% випадків.

Додавання до поживного середовища розчинів гольмію у різних концентраціях впливало на рости властивості даних мікроорганізмів у різному ступеню. Виразу антимікробну дію гольмію відмічено відносно до грампозитивної кокової мікрофлори – стафілококів та ентерококів (як до референтних штамів, так й до штамів, ізольованих із виділення ран).

На ріст *S. aureus* та *S. epidermidis* аніон гольмію мав чітко інгібуючу дію ($P < 0,001$) тільки у високій концентрації - 1×10^{-2} М. Достовірне значення ($P < 0,001$) даної дії виявлено при порівнянні з ростом штамів стафілококів на контрольних чашках Петрі (без гольмію) та з ростом на МПА з додаванням гольмію в інших (більш низьких) концентраціях. При цьому на МПА з гольмієм у концентрації 1×10^{-2} М спостерігалась відсутність росту усіх досліджуваних

штамів *S. aureus* (0,0%), а ріст *S. epidermidis* відмічено у 27,3% штамів.

Найбільш значну пригнічуючу дію гольмію ($P < 0,001$ при концентрації 1×10^{-2} М та $P < 0,002$ при інших концентраціях) виявлено відносно до *E. faecalis*: при порівнянні з контролем (100,0%) на чашках Петрі з додаванням розчинів гольмію в усіх досліджуваних концентраціях (від 1×10^{-2} М до $2,5 \times 10^{-4}$ М) ріст з'явився лише у 27,3 – 36,4% штамів даного мікроорганізму.

Змін рости властивостей грамнегативних мікроорганізмів - *E. coli* – при додаванні до МПА аніона гольмію в усіх проаналізованих концентраціях не зафіксовано.

Таким чином, при проведенні досліджень виявлено значні антибактеріальні властивості синтезованого поліоксометалату гольмію ($\text{HoW}_{10}\text{O}_{36}^{9-}$) по відношенню до збудників гнійно-запальних ускладнень у постраждалих із тяжкими травмами опорно-рухової системи. Розчини гольмію мають чітко виразу антимікробну дію тільки відносно до грампозитивних мікроорганізмів. Ріст стафілококів пригнічується при додаванні до поживного середовища аніона гольмію тільки у високій концентрації 1×10^{-2} М, яка для них є МПК. На ентерококи суттєво впливають розчини гольмію в усіх досліджуваних концентраціях, тому МПК для них становить $2,5 \times 10^{-4}$

Висновки

1. Синтезований поліоксометалат гольмію $\text{HoW}_{10}\text{O}_{36}^{9-}$ має значну антибактеріальну дію по відношенню до грампозитивної мікрофлори – стафілококів та ентерококів.
2. На грамнегативні бактерії (*E. coli*) гольмій не впливає в усіх досліджуваних концентраціях.
3. Для стафілококів МПК розчинів гольмію становить 1×10^{-2} М, для ентерококів – $2,5 \times 10^{-4}$ М.

Література

1. Ген множественной лекарственной устойчивости (MDR1) – маркер терапевтической резистентности и степени тяжести заболеваний / Ж.Л. Миронова [и др.] // Российский аллергологический журнал. - 2010. - № 3. - С. 9-11.
2. Страчунский, Л.С. Антимикробная резистентность как угроза национальной безопасности / Л.С. Страчунский // Поликлиника. - 2006. - № 3. - С. 54-57.
3. Салманов, А.Г. Резистентність бактерій до антисептиків та дезінфікуючих засобів / А.Г. Салманов, В.Ф.Марієвський, М.К. Хобзей // Український медичний часопис. - 2010. - Т.ХІ-ХІІ, № 6.- С.51-56.
4. Photocatalytic bacterial inactivation by polyoxometalates / E. Bae [et al.] // Chemosphere. - 2008. - № 72.- P. 174-178.
5. Antibacterial activity of highly charged polyoxometalates, $\text{K}_{27}[\text{KA}_{54}\text{W}_{40}\text{O}_{140}]$ and $\text{K}_{18}[\text{KS}_{39}\text{W}_{21}\text{O}_{86}]$, and Keggin-structural polyoxotungstates against *Helicobacter pylori* / M. Inoe [et al.] // J. of Inorganic Biochem.- 2005.- № 99. - P.1023-1031.
6. Hill, C. Anti-HIV-1 activity, toxicity and stability studies of representatives structural families of polyoxometalates / C. Hill, M. Weeks, R. Schinazi // J. Med. Chem.-1990. - № 33.- P. 2767-2772.
7. Yamamoto, N. Mechanism of anti-human immunodeficiency virus action of polyoxometalates, a class of broad-spectrum antiviral agents / N. Yamamoto, D. Schools, E. Clerq // Mol. Pharm.-1992.- № 42.- P. 1109-1117.
8. Curticapean, M. Detection of the sensitivity of some bacteria and fungi to the action of sodium phosphotungstate beta- $\text{NA}_6[\text{P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}].18\text{H}_2\text{O}$ / M. curticapean, F. Toma, A. Sopteren // Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol. - 2007. - № 52. - P. 139-147.
9. Скала Л.З. Практические аспекты современной клинической микробиологии / Л. З. Скала, С. В. Сидоренко, А.Г. Нехорошева. – Тверь: ООО «Изд-во «Триада», 2004. – 312 с.
10. Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів»: Наказ МОЗ України №167. - [Чинний від 2007-04-05]. – К.: МОЗ України, 2007. – 116 с.

УДК: 616-001-036.6-002.31+615.281

АНТИБАКТЕРІАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОЛІОКСОМЕТАЛАТУ ГОЛЬМІЮ ПО ВІДНОШЕННЮ ДО ЗБУДНИКІВ ГНІЙНО-ЗАПАЛЬНИХ УСКЛАДНЕНЬ У ПОСТТРАВМАТИЧНИХ ІЗ ТЯЖКИМИ ТРАВМАМИ

Лебедева Н.Ю., Піддубна О.М.
Донецький національний медичний університет ім. М. Горького

Статтю присвячено визначенню антимікробної дії гольмію щодо збудників гнійно-запального процесу у рані травматологічних хворих. Методом серійних розведень у щільному живному середовищі (МПА) визначено мінімальну пригнічуючу концентрацію (МПК) розчинів гольмію відносно штамів стафілококів, ентерококів та ешерихій. Встановлено, що розчини гольмію мають чітко виражену антибактеріальну дію на стафілококи різних видів та ентерококи (МПК щодо штамів *S.aureus* та *S. epidermidis* становить 1×10^{-2} М, а для штамів *E. faecalis* – $2,5 \times 10^{-4}$ М). На властивості росту штамів *E. coli* розчини гольмію не впливають.

Ключові слова: гольмій, антибактеріальна дія

УДК: 616-001-036.6-002.31+615.281 АНТИБАКТЕРІАЛЬНІ СВОЙСТВА ГОЛЬМІЯ ПО ВІДНОШЕННЮ К ВОЗБУДИТЕЛЯМ ГНІЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНИХ ОСЛОЖНЕНЬ У ПОСТТРАВМАТИЧНИХ С ТЯЖЕЛИМИ ТРАВМАМИ

Лебедева Н.Ю., Поддубная Е.Н.
Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

Статья посвящена определению антибактериального гольмия на возбудителей гнойно-воспалительного процесса в ранах травматологических больных. Методом серийных разведений на плотной питательной среде (МПА) определена минимальная подавляющая концентрация (МПК) растворов гольмия относительно штаммов стафилококков, энтерококков и эшерихий. Установлено, что растворы гольмия оказывают четко выраженное антибактериальное действие на стафилококки разных видов и энтерококки (МПК относительно штаммов *S.aureus* и *S. epidermidis* составляет 1×10^{-2} М, а для штаммов *E. faecalis* – $2,5 \times 10^{-4}$ М). На ростовые свойства штаммов *E.coli* растворы гольмия не влияют. Ключевые слова: гольмий, антибактериальное действие

UDC: 616-001-036.6-002.31+615.281 ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF HOLMIUM TO CAUSATIVE AGENTS OF SUPPURATIVE - INFLAMMATORY COMPLICATIONS IN PATIENTS WITH TRAUMA

Lebedeva N.Yu., Poddubnaya E. N.
Donetsk National Medical University named by M. Gorky

Article denotes to determination of antibacterial action of polyoxometalate holmium to causative agents of suppurative-inflammatory process in wounds of patients, which were suffered from trauma. Method of serial

dilutions was used for determination of minimal inhibiting concentration (MIC) of holmium to staphylococci, enterococci and E. coli. Registration of holmium action shows the strong antibacterial influence to staphylococci and enterococci (MIC of holmium action to staphylococcal and enterococcal strains same $1 \cdot 10^{-6}$ M, to strains of E.coli – $2,5 \cdot 10^{-6}$ M). Solutions of holmium don't have antibacterial action to strains of E.coli.

Key words: Holmium, Antibacterial action