

Спектральный анализ эпидермальных стафилококков с гемолитической активностью, выделенных со слизистой оболочки полости рта у пациентов с пародонтитом

© Е.В. Тимченко¹, П.Е. Тимченко¹, А.В. Лямин², И.В. Бажутова², О.О. Фролов¹, Л.Т. Волова²,
А.В. Зотова¹, С.С. Иванов¹

¹ Самарский национальный исследовательский университет им. акад. С.П. Королева,
443086 Самара, Россия

² Самарский государственный медицинский университет,
443099 Самара, Россия

e-mail: laser-optics.timchenko@mail.ru

Поступила в редакцию 11.05.2023 г.

В окончательной редакции 08.07.2023 г.

Принята к публикации 30.10.2023 г.

Методом спектроскопии комбинационного рассеяния исследованы штаммы эпидермального стафилококка с гемолитической активностью и без гемолитической активности. Установлены основные спектральные отличия исследуемых групп. Для оценки гемолитической активности был использован комплексный анализ с использованием методов спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) и математических подходов.

Ключевые слова: спектроскопия комбинационного рассеяния, математические методы анализа, спектральный анализ, стафилококк, гемолитическая активность.

DOI: 10.61011/OS.2023.11.57017.5076-23

Введение

Актуальной задачей современной клинической стоматологии является выявление и своевременное лечение воспалительных заболеваний полости рта, которые вызваны бактериальными патогенами. Одним из потенциальных участников патологического процесса при заболеваниях полости рта могут быть коагулазонегативные стафилококки с определенным фактором патогенности, которые на протяжении последнего столетия являются наиболее значимыми оппортунистическими патогенами в медицинской практике. В литературе имеется большое количество работ, посвященных стафилококкам, в том числе с помощью спектральных методов исследований [1]. Однако роль данного микроорганизма в патологии органов полости рта (в том числе при пародонтите) остается до сих пор малоизученной, несмотря на наличие значительного числа факторов патогенности, к одному из которых можно отнести их гемолитическую активность.

Оптические методы нашли широкое распространение в биомедицинских задачах [1–3].

Анализ литературы [1–3] показал, что в настоящее время нет работ по применению оптических методов для исследования гемолитической активности бактерий.

Целью работы являлось исследование штаммов *Staphylococcus epidermidis* с гемолитической активностью с помощью спектроскопии КР.

Материалы и методы исследований

Проведено исследование 12 штаммов *Staphylococcus epidermidis*, выделенных из клинического материала от пациентов с хроническим пародонтитом (из пародонтальных карманов). Идентификацию всех выделенных штаммов проводили с использованием метода MALDI-ToF масс-спектрометрии на приборе MicroflexLT (Bruker) с использованием стандартного метода пробоподготовки и библиотек масс-спектров. У всех изолятов дополнительно определяли гемолитическую активность, при этом 50% штаммов обладали выраженной гемолитической активностью, которая была выявлена при посеве в аэробных условиях на 5% кровяном агаре с бараньей кровью (HiMedia). Для постановки эксперимента из точных культур штаммов стафилококка получали инокулюм 1.0 по МакФарланду в физиологическом растворе, что соответствовало $3 \cdot 10^8$ КОЕ/ml. В качестве отрицательного контроля использовали неинокулированный физиологический раствор.

Исследуемые образцы поделены на 2 группы: I — образцы без гемолитической активности (28 спектров комбинационного рассеяния — КР), II — образцы с гемолитической активностью (27 спектров).

В качестве основного метода анализа штаммов *Staphylococcus epidermidis* с гемолитической активностью был использован метод спектроскопии КР, подробно описанный в работах [4,5]. Мощность лазера 350 MW при длительности экспозиции 60 s обеспечивала стабильность измерений и получаемых результатов. Регистрация спектров КР проводилась с помощью оптического

зонда, который располагался над объектом на расстоянии 7 mm. Нормализация спектров проведена методом Extended multiplicative signal correction (EMSC). Сглаживание спектров проведено методом Maximum likelihood estimation Savitzky-Golay filter (MLE-SG) [6] с параметром $\sigma = 4$.

Для исключения вклада автофлуоресценции в КР-спектре использовался модифицированный метод вычитания флуоресцентной составляющей полиномиальной аппроксимацией Improved Modified Multi-Polynomial Fitting (I-ModPoly) со степенью полинома 11. В настоящей работе анализ спектров КР проводился в диапазоне 450–2000 cm^{-1} .

Результаты

На рис. 1 представлены усредненные спектры КР двух групп образцов. Незначительные спектральные различия проявляются на линиях 1265 cm^{-1} (Amide III), 1338 cm^{-1} (одна из характерных полос *Pgingivalis*), 1414 cm^{-1} (C55C stretching in quinoid ring), 1556 cm^{-1} (Amide II). Наиболее выраженные спектральные различия проявляются на линии 1647 cm^{-1} (Amide I vibration (collagen-like proteins)), что можно интерпретировать как гемолитическую активность бактерий. Это вероятнее всего связано с тем, что в результате жизнедеятельности бактерии выделяют жирные кислоты [7].

Для повышения информативности полученных спектров КР и дальнейшего анализа с помощью линейного дискриминантного анализа был произведен нелинейный регрессионный анализ спектров, состоящий в их разложении на сумму асимметричных линий Гаусса. Состав спектральных линий определен на основе автоматического многоитерационного моделирования 55 спектров КР и апробирован по результатам анализа литературы. При моделировании спектрального контура у линий, используемых как шаблон, фиксировалось положение x_0 и полуширина линии (HWHM) dx . При моделировании подбиралась лишь интенсивность линии в диапазоне от 0 до значения локального максимума спектра в области x_0 . HWHM ограничивалось в диапазоне от 1 до 13 cm^{-1} .

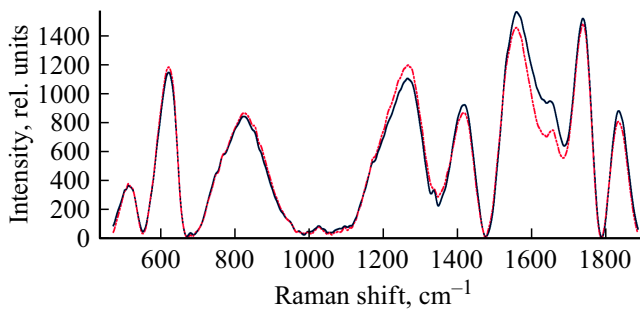


Рис. 1. Усредненные спектры КР исследуемых образцов: прерывистая линия — спектры образцов без гемолитической активности (по 28 спектрам КР), сплошная линия — спектры образцов с гемолитической активностью (по 27 спектрам).

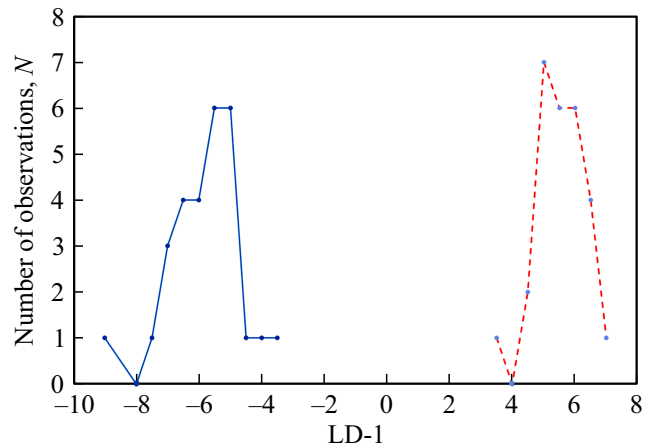


Рис. 2. График значений LD-1 — линейной дискриминантной функции образцов бактерий с гемолитической активностью (сплошная линия) и без нее (штриховая линия)

Это позволяло добиться высокой стабильности результатов при моделировании контура и учитывать все сдвиги линий КР. Критериальной переменной являлась амплитуда линий a , которая зависит от значений независимых регрессоров dx и x_0 , определяющих начальные условия анализа. Среднее значение скорректированного коэффициента детерминации спектра от исходного в области 450–2000 cm^{-1} для всех 55 спектров составило $R^2 = 0.9997$.

На рис. 2 представлены результаты сравнения LDA (линейный дискриминантный анализ) двух групп образцов, анализ проводился по LD-1. Положительные значения LD-1 (от 0 до 10) преимущественно характеризуют спектры КР образцов бактерий с гемолитической активностью, а отрицательные значения (от -10 до 0) характеризуют спектры КР бактерий без гемолитической активности. Дискриминантная функция LD-1 описывает дисперсию на 100%.

Выводы

В настоящей работе установлены спектральные отличия штаммов эпидермального стафилококка с гемолитической активностью и без гемолитической активности. В ранее опубликованных работах других авторов подобные исследования не проводились. В литературе встречались работы [1], связанные с исследованием спектральных свойств разных штаммов бактерий без оценки их гемолитической активности (патогенности).

Для оценки влияния гемолитической активности на изменения в спектрах КР были проведены нелинейный регрессионный анализ спектров КР, состоящий в их разложении на сумму асимметричных линий Гаусса, а также дискриминантный анализ. В результате была установлена спектральная разница между двумя спектральными группами, которая наблюдается на линии КР $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ (Amide I vibration (collagen-like proteins)).

Полученные результаты могут быть в дальнейшем использованы в качестве экспресс-оценки маркеров патогенности стафилококка и других условно-патогенных микроорганизмов и выявления их потенциального участия в развитии заболеваний слизистых оболочек полости рта.

Этический комитет

Исследования проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией, протокол был одобрен Комитетом по этике (выписка из протокола № 207 заседания комитета по биоэтике Самарского государственного медицинского университета от 09.12.2020 г.).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

Список литературы

- [1] E. Witkowska, A.M. Lasica, K. Nicinski, J. Potempa, A. Kaminska. *ACSSensors*, **6** (4), 1621 (2021). DOI: 10.1021/acssensors.1c00166
- [2] J. Zhang, Y. Liu, H. Li, S. Cao, X. Li, H. Yin, Y. Li, X. Dong, X. Zhang. *J. Innovative Optical Health Sciences*, **15** (03), (2022). DOI: 10.1142/s1793545822400016
- [3] Б.Г. Андрюков, А.А. Карпенко, Е.В. Матосова, И.Н. Ляпун. *Современные технологии в медицине*, **11** (4), 161 (2019). DOI: 10.17691/stm2019.11.4.19
- [4] Е.В. Тимченко, П.Е. Тимченко, Е.В. Писарева, М.Ю. Власов, Л.Т. Волова, А.А. Федотов, Я.В. Федорова, А.С. Тюмченкова, Д.А. Романова, М.А. Даниэль, А.Н. Субатович. *Оптический журн.*, **87** (3), 37 (2020). DOI: 10.17586/1023-5086-2020-87-03-37-45 [E.V. Timchenko, P.E. Timchenko, E.V. Pisareva, M.A. Daniel, L.T. Volova, A.A. Fedotov, O.O. Frolov, A.N. Subatovich. *Journal of Optical Technology*, **87** (3), 37 (2020). DOI: 10.1364/JOT.87.000161].
- [5] P.E. Timchenko, E.V. Timchenko, L.T. Volova, M.A. Zybin, O.O. Frolov, G.G. Dolgushov. *Optical Memory and Neural Networks*, **29** (4), 354 (2020). DOI: 10.3103/S1060992X20040116
- [6] S.J. Barton, T.E. Ward, B.M. Hennelly. *Analytical Methods*, **10**, 3759 (2018). DOI: 10.1039/C8AY01089G
- [7] L.E. Jamieson, A. Li, K. Faulds, D. Graham. *Royal Society Open Science*, **5** (12), (2018). DOI: 10.1098/rsos.181483