

Н. І. Гринчук, І. О. Бойко, Н. О. Вринчану

Антибіоплівкова дія ципрофлоксацину щодо *Pseudomonas aeruginosa*

Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ

Ключові слова: антимікробні препарати, ципрофлоксацин, біоплівки, *P. aeruginosa*, персистері

Одним з механізмів захисту мікроорганізмів від несприятливих факторів середовища, зокрема, впливу високих концентрацій антимікробних препаратів (АМП), є формування біоплівок – специфічно організованих мікробних угруповань, які прикріплені до поверхні [1]. Біоплівки формуються як на біотичних (рани, тканини організму), так і абіотичних (катетери, імпланти) субстратах й є причиною більш ніж 65 % захворювань мікробного генезу [2, 3]. Здатність до плівкоутворення виявляють як грам-позитивні, так і грамнегативні бактерії, серед останніх *Pseudomonas aeruginosa* [4].

Біоплівки *P. aeruginosa* є гетерогенними, складаються з агрегатів «сидячих» бактеріальних клітин, укладених у матрикс синтезованих ними позаклітинних полімерних речовин – екзополісахаридів (альгінату, целюлози, декстрану, рамноліпідів), білків, еДНК, ліпідів тощо [5]. Порівняно з одноклітинними, планктонними клітинами, бактерії в складі біоплівки мають змінений фенотип, параметри росту та транскрипційну активність специфічних генів. Мікроорганізми, що вбудовані в біоплівку, отримують низку переваг перед своїми планктонними аналогами. Позаклітинний матрикс здатний секвеструвати та концентрувати поживні

речовини навколишнього середовища, такі як вуглець, азот і фосфат [6]. Додатковою перевагою біоплівкового способу існування є здатність протидіяти факторам імунної системи людини й антимікробним агентам. Стійкість до АМП опосередковується через сплячий фенотип, спричинений адаптацією до аноксичного середовища та дефіциту поживних речовин, що призводить до зниження метаболічної активності та швидкості поділу клітин. Окрім клітин зі сповільненим метаболізмом у стресовому для мікроорганізмів середовищі утворюються й клітини-персистері. Персистуючі клітини виявляють множинну лікарську толерантність, яка за своєю суттю відрізняється від резистентності. Стійка толерантність досягається за рахунок набуття метаболічно неактивного стану, тим самим захищаючи клітину навіть від бактерицидного впливу антимікробних препаратів. Клітини-персистері не чутливі до дії ефекторів імунної системи [7].

Окрім зміни швидкості метаболізму, резистентність біоплівкових мікроорганізмів може бути зумовлена здатністю матриксу біоплівки виконувати роль дифузного бар'єра. Прикладом є дезактивація в поверхневих шарах біоплівки хімічно активних форм хлору – складових деяких антимікробних засобів (гіпохлорит, хлораміни чи діоксид хлору), що призводить до недостатньої концентрації препарату в товщі біоплівки [7].

Біоплівкам, зокрема й сформованим *P. aeruginosa*, притаманна етапність розвитку, що включає 3 стадії: адгезія планктонних клітин до поверхні, формування матриксу й організація біоплівки, відокремлення нових планктонних мікроорганізмів [8].

Процес формування біоплівок регулюється складними механізмами міжклітинної комунікації Quorum Sensing (QS) [9]. Використовуючи системи QS, мікроорганізми здійснюють внутрішньовидову, міжвидову комунікацію та взаємодіють з вищими еукаріотами. *P. aeruginosa* використовує 3 системи QS (Las, Rhl, PQS) для регуляції понад 10 % генів, що відповідають за продукцію факторів вірулентності, рухливості, перехід у сесильну форму, формування біоплівок і відповідь на стресові фактори [10].

Біоплівкові мікроорганізми *P. aeruginosa* створюють серйозні проблеми в медицині. Синьогнійна паличка є однією з основних причин внутрішньолікарняних інфекцій (хронічні захворювання ЛОР-органів, м'яких тканин, дихальної та видільної систем, статевих органів, шлунково-кишкового тракту тощо), ускладнює перебіг муковісцидозу, викликає запальні процеси в осіб з ослабленим імунітетом. Завдяки низці механізмів адаптації, виживання та стійкості до багатьох класів антибіотиків, інфекції, спричинені *P. aeruginosa*, можуть становити загрозу здоров'ю населення [10].

Нині проводяться чисельні дослідження щодо вивчення антибіоплівкової активності нових перспективних сполук, АМП, впроваджених у клінічну практику, неантимікробних препаратів [11, 12], проте проблема ефективності застосування офіційних АМП для профілактики та терапії захворювань, асоційованих з

біоплівками *P. aeruginosa*, залишається актуальною.

Необхідність вирішення проблеми обмеженої кількості нових антимікробних засобів з антибіоплівковою активністю є достатньою мотивацією для пошуку потенційних лікарських засобів серед різних джерел, зокрема, серед сполук хімічного походження.

Мета дослідження – встановити чутливість біоплівок *Pseudomonas aeruginosa* та клітин-персистерів до дії ципрофлоксацину.

Матеріали та методи. У дослідженні використовували клінічний штам *P. aeruginosa* 449, виділений від пацієнта з гнійно-запальним процесом. Штам резистентний до цефепіму та тетрацикліну, помірночутливий до цефтриаксону, цефотаксиму та меропенему, чутливий до азтреонаму, цефоперазону, амікацину, гентаміцину та ципрофлоксацину.

В експериментах використано Ципрофлоксацин (Ciprofloxacin, розчин для інфузій), виробництва Євролайд Хелтнер П.в.т Л.т.д (Індія).

Здатність ципрофлоксацину порушувати плівкоутворення та руйнувати сформовані біоплівки *P. aeruginosa* визначали на полістиролових планшетах для імуноферментного аналізу згідно з [13, 14]. Для приготування інокуляту нічну культуру розводили в триптон-соевому бульйоні (TSB) у 100 разів (1:100). Для вивчення впливу препарату на плівкоутворення розчини ципрофлоксацину (0,5 МІК і 5,0 МІК) вносили в лунки планшета одночасно з інокулятом, на сформовані біоплівки – на 5-ту добу експерименту. Термін інкубації – 24 год при 37 °С. Після інкубування вміст лунок видаляли, лунки тричі промивали дистильованою водою, вносили 0,1 % розчин генціанвіолету та витримували 10–15 хв. Барвник екстрагували 96,0 % етанолом протягом

15 хв і реєстрували результати на «Adsorbance Microplate Reader ELx800» (BioTek, США) за довжини хвилі 630 нм. Контролем були інтактні культури мікроорганізмів, вирощені за тих самих умов без додавання розчинів препарату.

Життєздатність клітин *P. aeruginosa* визначали на етапі плівкоутворення та зрілих біоплівки з використанням окисно-відновного індикатора резазурину згідно з [15, 16]. Для приготування інокуляту нічну культуру розводили в 100 разів (1:100) у TSB. Для вивчення впливу цiproфлoксацину на життєздатність мікроорганізмів на етапі плівкоутворення внесення розчинів препарату (0,5 МІК, 2,0 МІК і 5,0 МІК) і культур проводили одночасно, у складі сформованих біоплівки – АМП додавали на 5-ту добу. Після інкубації впродовж 24 год при 37 °С вміст лунок видаляли, промивали двічі фосфатним буфером (рН 7,2 ± 0,2), додавали по 200 мкл TSB і 10 мкл розчину резазурину (0,5 мкг/лунка). Отримані результати реєстрували на флуоресцентному спектрофотометрі «НІТАСНІ, МРФ-3» (Японія) при λex 550 нм – λem 590 нм через 30 хв інкубації в темряві за кімнатної температури.

Вплив цiproфлoксацину на життєздатність бактеріальних клітин у складі зрілих біоплівки досліджували в концентрації 5,0 МІК за допомогою флуоресцентної мікроскопії з використанням барвників акридинового оранжевого та пропідій йодиду згідно з [17, 18]. Вирощування біоплівки здійснювали в пластикових чашках Петрі впродовж 120 год. Після закінчення терміну інкубації вносили розчин цiproфлoксацину й витримували протягом 24 год при 37 °С. Після інкубації вміст чашок видаляли та промивали двічі фосфатним буфером з рН (7,2 ± 0,2).

Для фарбування біоплівки готували розчин барвників з кінцевою концентрацією акридинового оранжевого 5 мкг/мл, пропідій йодиду – 3 мкг/мл. Біоплівки з флуоресцентними барвниками витримували впродовж 10 хв у темряві за кімнатної температури. Результати реєстрували на флуоресцентному мікроскопі «Olympus BX-41» (Японія).

Формування метаболічно неактивних клітин (персистерів) тест-штаму *P. aeruginosa* за дії цiproфлoксацину (20 мкг/мл) визначали згідно з [19]. Для виділення клітин-персистерів з активованою SOS-відповіддю 1-добові культури пересівали в рідке поживне середовище (TSB) й вирощували впродовж 24 год при 37 °С. Отриману культуру розводили в 100 разів, інкубували при 37 °С впродовж 24 год, центрифугували при 6000 об/хв протягом 10 хв (4 °С) і двічі промивали в 50 мл холодного 0,9 % розчину NaCl. Оптичну густину (OD₆₀₀) інокуляту доводили до 0,8. Інкубацію культури з цiproфлoксацином проводили в планшетах упродовж 3,5 год при 37 °С. Після закінчення терміну інкубації готували серію з семи 10-разових розведень і висівали на поверхню чашки Петрі з агаром Мюлера-Хінтон, що містить 1 % (MgCl₂ · 7 H₂O) згідно з [20]. Чашки інкубували впродовж 24 год при 37 °С та здійснювали підрахунок колоній. Результати надані у вигляді десяткового логарифма від загального числа КУО.

Оцінку чутливості метаболічно неактивних клітин до дії цiproфлoксацину (20 мкг/мл) досліджували згідно з [19]. Отриману субпопуляцію клітин-персистерів інкубували з АМП упродовж 2 год. Після закінчення терміну інкубації готували серію з семи 10-разових розведень, відбирали по 10 мкл (0,01 мл) інокуляту та висівали на чашки Петрі (d =

100 мм) згідно з методом 6×6 крапель (6×6 drop plate method) [20]. Чашки інкубували впродовж 24 год при 37 °С і здійснювали підрахунок колоній. Результати представлені у вигляді десятичного логарифма від загально-го числа КУО.

Статистичний аналіз даних проводили з використанням ANOVA (критерії Ньюмена-Кейлса та Тьюкі) за допомогою комп'ютерної програми «Statistica 6.0» (StatSoft. Inc., USA). Вірогідними вважалися відмінності за рівня значущості $p < 0,05$ [21, 22]. Дані досліджень наведено як $M \pm m$, де M – середнє значення, m – стандартна помилка середнього.

Результати та їх обговорення. Дослідження антибіоплівкової дії ципрофлоксацину проводили в концентраціях 0,5 МІК; 2,0 МІК і 5,0 МІК, враховуючи його інгібуючу активність щодо планктонних клітин *P. aeruginosa* 449 (МІК – 0,25 мкг/мл).

Результати проведених експериментів показали, що ципрофлоксацин впливає на плівкоутворення та руйнує сформовані біоплівки синьогнійної палички (рис. 1).

Отримані дані свідчать (рис. 1), що ципрофлоксацин у концентрації 5,0 МІК порушує формування біоплівок *P. aeruginosa*, інгібування стано-

вить 33,6 % ($p < 0,05$). За дії в субінгібуючій концентрації 0,5 МІК відмічена стимуляція плівкоутворення, спостерігається збільшення біомаси біоплівки на 55,3 % (порівняно з інтактним контролем).

У разі дослідження впливу АМП на сформовані 5-добові біоплівки виявлено дозозалежний інгібуючий ефект, біомаса зменшується за 0,5 МІК на 14,6 %, 5,0 МІК – на 25,0 %.

Антибіоплівкова дія ципрофлоксацину підтверджена дослідженнями з використанням окисно-відновного індикатора резазурину. Отримані дані (рис. 2) свідчать, що ципрофлоксацин у концентрації 2,0 МІК і 5,0 МІК повністю пригнічує життєздатність *P. aeruginosa* на етапі плівкоутворення, метаболічно активні клітини не реєструються.

За дії препарату в субінгібуючій концентрації 0,5 МІК відмічено зменшення кількості метаболічно активних клітин на 25,0 %, проте зазначені зміни статистично не достовірні.

За умов дії ципрофлоксацину на 5-добові біоплівки *P. aeruginosa* спостерігається зменшення кількості метаболічно активних клітин (рис. 2), при 0,5 МІК – на 64,3 %, 2,0 МІК – на 73,8 %, при 5,0 МІК – на 78,6 % порівняно з контролем.

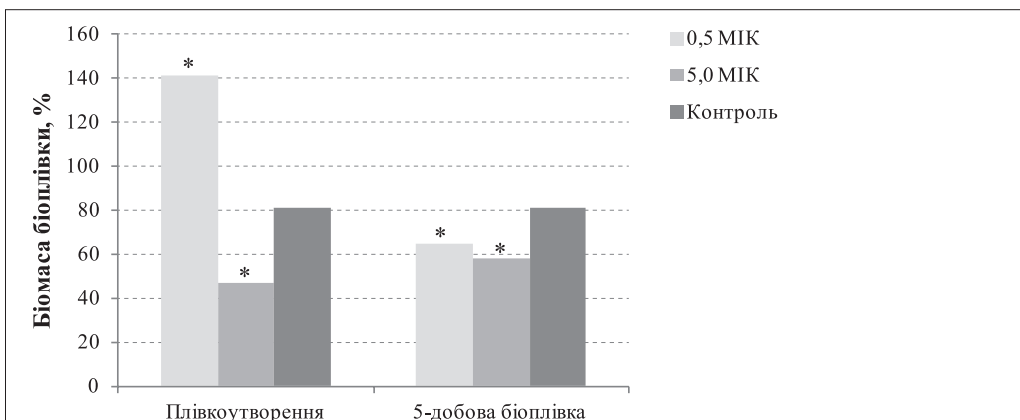
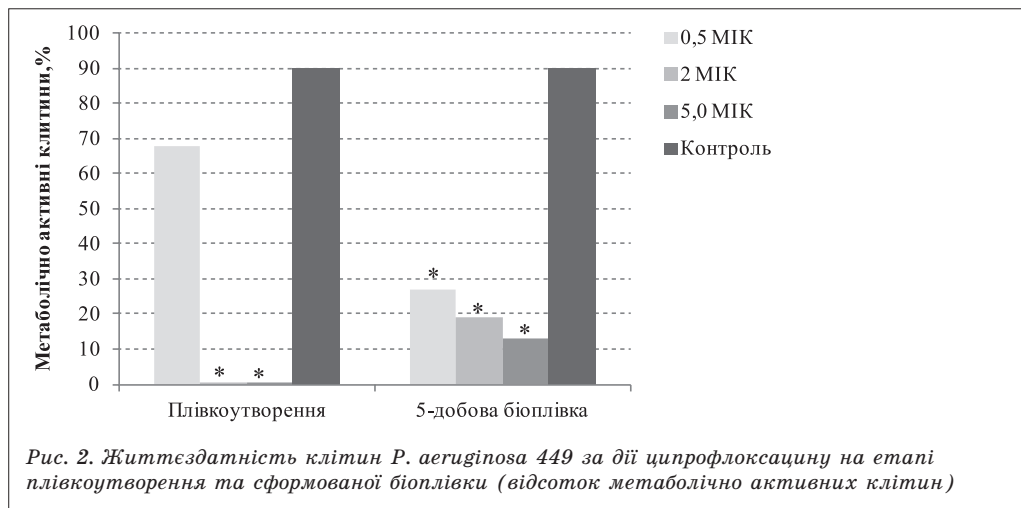


Рис. 1. Вплив ципрофлоксацину на плівкоутворення та сформовані біоплівки *P. aeruginosa* 449 (відсоток утвореної біоплівки відносно контролю)

Примітка. Тут і на рис. 2: *відмінності вірогідні відносно контролю ($p < 0,05$).



Згідно з даними флуоресцентної мікроскопії, у контролі клітини *P. aeruginosa* формували рівномірний щільний шар біоплівки, що складався з життєздатних клітин (рис. 3). За дії ципрофлоксацину (5,0 МІК) у полях зору спостерігали як нежиттєздатні клітини червоного кольору, так і клітини зеленого забарвлення (життєздатні) зі зміненою морфологією (більш видовжена форма порівняно з контролем).

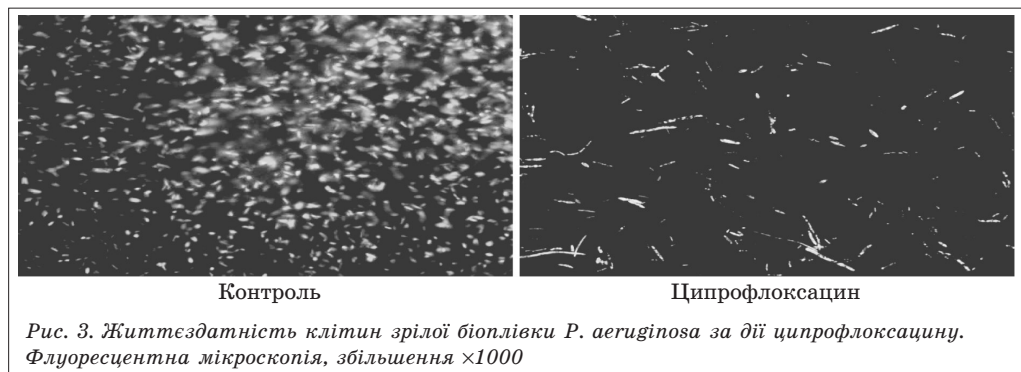
У дослідженні встановлено (таблиця), що ципрофлоксацин у концентрації 5,0 МІК виявляє виразну активність щодо біоплівок, біомаса (кількість клітин) *P. aeruginosa* зменшилась на 85,5 %, частка нежиттєздатних клітин – 41,5 %.

Таким чином, вплив ципрофлоксацину на сформовані біоплівки *P. aeruginosa* реалізується знижен-

ням біомаси та кількості метаболічно активних, життєздатних клітин порівняно з контролем.

Наявність у біоплівці життєздатних клітин за концентрації 5,0 МІК ймовірно свідчить про перехід клітин у метаболічно неактивний стан, тобто утворення персистерів – клітин, які характеризуються зниженою метаболічною активністю та стійкістю до дії антимікробних препаратів. Найчастіше персистуючі клітини утворюються за дії АМП, які впливають на метаболічні процеси в клітинах бактерій, зокрема, фторхінолонів (ципрофлоксацин, офлоксацин), аміноглікозидів (тобраміцин, гентаміцин) тощо.

Наступним етапом роботи було дослідження здатності синьогнійної палички утворювати персистеру за умови впливу ципрофлоксацину (20 мкг/мл). Тривалість інкубації пре-



**Вплив ципрофлоксацину на життєздатність клітин
5-добової біоплівки *P. aeruginosa***

Умова експерименту	Кількість клітин біоплівки в полі зору	
	абсолютна кількість, од	з них життєздатних, %
Контроль культури	11543 ± 2560	91,1 ± 3,7
Ципрофлоксацин	1669 ± 483*	58,5 ± 0,3*

Примітка. *Відмінності вірогідні відносно контролю ($p < 0,05$).

парату з *P. aeruginosa* – 3,5 год, що відповідає часу досягнення культурою середини логарифмічної фази росту.

Згідно з отриманими результатами, кількість клітин *P. aeruginosa* в контролі складає $8,7 \cdot 10^9$ КУО/мл [$9,94 \pm 0,06$ lg КУО/мл]. У разі інкубації *P. aeruginosa* 449 з ципрофлоксацином кількість клітин зменшується до $1,3 \cdot 10^8$ КУО/мл [$7,9 \pm 0,13$ lg КУО/мл], частка персистуючих клітин – 0,9 % від загальної популяції. За даними різних досліджень частка утворених персистерів у популяції синьогнійної палички за дії АМП у межах від $< 0,001$ % [23] до 0,1 % [20]. Отримані в дослідженні дані свідчать, що ципрофлоксацин не запобігає утворенню метаболічно неактивних персистуючих клітин.

Для з'ясування питання щодо чутливості персистерів до дії ципрофлоксацину виділені клітини інкубували з препаратом протягом 2 год. Результати дослідження показали, що ципрофлоксацин достовірно знижує кількість клітин-персистерів з $2,9 \cdot 10^8$ КУО/мл [$8,46 \pm 0,14$ lg КУО/мл] до $9,8 \cdot 10^5$ КУО/мл [$5,99 \pm 0,13$ lg КУО/мл]. Згідно з отриманими даними, ципрофлоксацин не запобігає утворенню персистерів, разом з тим, ці клітини є чутливими до дії фторхінолону. Такий ефект може бути пов'язаний з постантибіотичним ефектом, прямою дією ципрофлоксацину на персистуючі клітини або впливом на безпосередню мішень після відновлення метаболічно активного стану.

У літературі наведено суперечливі дані щодо антибіоплівкового ефекту ципрофлоксацину щодо *P. aeruginosa*. Згідно з [24], ципрофлоксацин у субінгібуючих концентраціях порушує плівкоутворення штамів *P. aeruginosa* ($p < 0,01$), пригнічує рухливість і продукцію факторів вірулентності. Іншими авторами [25] показано стимулюючий ефект фторхінолону щодо плівкоутворення за впливу в субінгібуючих концентраціях. За дії ципрофлоксацину в концентраціях, що перевищують МІК, спостерігається зниження біомаси біоплівки та кількості життєздатних клітин *P. aeruginosa* [26].

У дослідженні здатності ципрофлоксацину руйнувати зрілі біоплівки показано, що препарат залежно від дози та штаму бактерій обумовлює деструкцію біоплівки або сприяє збільшенню її біомаси. Зазначено також різний ефект фторхінолону щодо експресії *rhlR*, *rhlI*, *lasR* генів, що регулюють QS у *P. aeruginosa* [27].

Експериментально доведено наявність дозозалежного впливу ципрофлоксацину щодо плівкоутворення чутливими штамми *P. aeruginosa* та не виявлено активності щодо резистентних ізолятів. Такий самий ефект зареєстровано за дії препарату на попередньо сформовані біоплівки. За допомогою конфокальної скануючої мікроскопії виявлено, що ципрофлоксацин пригнічував життєздатність клітин біоплівки, а її біомаса значно не відрізнялася від

контролю [28]. Встановлено, що субінгібуючі концентрації ципрофлоксацину підвищують вірулентність планктонних клітин PA01 і стимулюють плівкоутворення синьогнійною паличкою [29]. Експериментально доведено, що фторхінолон у концентраціях, що перевищують МК, значно пригнічує плівкоутворення та життєздатність клітин у складі сформованої біоплівки клінічними ізолятами *P. aeruginosa* [30]. За дії в концентрації 3 МК інгібіція спостерігається впродовж 24–72 год. Проте відмічено, що ципрофлоксацин не повністю руйнує біоплівку, оскільки через певний час біомаса біоплівки відновлюється. Подібний ефект зареєстровано за дії гентаміцину [31].

Висновки

Таким чином, ципрофлоксацин у концентрації, що перевищує МК, впливає на формування біоплівки *P. aeruginosa*, знижуючи її біомасу та кількість метаболічно активних клітин. За дії препарату в субінгібуючій концентрації реєструється стимуляція плівкоутворення. Ципрофлоксацин обумовлює деструкцію сформованої 5-добової біоплівки, ефект препарату є дозозалежним. Встановлено, що ципрофлоксацин у концентрації 5,0 МК не запобігає утворенню клітин-персистерів *P. aeruginosa*, метаболічно неактивні клітини синьогнійної палички виявляють чутливість до його дії. Отримані результати свідчать, що ципрофлоксацин є активним не тільки щодо планктонних клітин мікроорганізмів, але й до біоплівок на ранніх етапах її формування.

1. Хмель И. А. Биопленки бактерий и связанные с ними трудности медицинской практики. URL: <https://img.ras.ru/files/>.
2. Bacterial biofilm and associated infections. M. Jamal, W. Ahmad, S. Andleeb et al. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2018. V. 81 (1). P. 7–11.
3. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation By Vitexin: A Combinatorial Study With Azithromycin And Gentamicin. D. Mc, P. Sandhu, P. Gupta et al. *Sci Rep*. 2016. V. 6 (23347). P. 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep23347>.
4. Thi M. T. T., Wibowo D., Rehm B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. V. 21 (22). P. 8671.
5. Behzadi P., Baráth Z., Gajdác M. It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel)*. 2021. V. 10 (1).
6. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. O. Y. A. Costa, J. M. Raaijmakers, E. Eiko, E. M. Kuramae. *Front. Microbiol*. 2018. V. 1636. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01636>.
7. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. N. K. Archer, M. J. Mazaitis, J. W. Costerton et al. *Virulence*. 2011. V. 2 (5). P. 445–459.
8. Карпова Е. П. Бактериальные биопленки в отоларингологии. Эффективная фармакотерапия. *Педиатрия*. 2012. Т. 1. С. 6–9.
9. Недашківська В. В., Дронова І. В., Вринчану Н. О. Біоплівки та їх роль в інфекційних захворюваннях. *Український науково-медичний молодіжний журнал*. 2016. Т. 4 (98). С. 10–19.
10. Moradali M. F., Ghods S., Rehm B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017. V. 7. P. 39. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>.
11. Verderosa A. D., Totsika M., Fairfull-Smith, K. E. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Frontiers in Chemistry*. 2019. V. 7 (824). P. 1–17. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00824>.
12. Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. E. Olivares, S. Badel-Berchoux, C. Provot et al. *Front. Microbiol*. 2020. V. 10:2894. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02894>.
13. Романова Ю. М. Образование биопленок – пример «социального» поведения бактерий. *Микробиология*. 2006. Т. 5, № 4. С. 556–661.
14. O'Toole G., Kaplan H. B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev. Microbiol*. 2000. V. 54, № 1. P. 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>.

15. Tote K., Berghe D., Maes L. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilm. *Letters in Applied Microbiology*. 2008. V. 46, № 2. P. 249–254. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02298.x>.
16. Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay. M. E. Sandberg, D. Schellmann, G. Brunhofer et al. *J. Microbiol. Methods*. 2009. V. 78, № 1. P. 104–106. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.04.014>. 17.
17. Биопленки: основные методы исследования: учебно-методическое пособие. А. М. Марданова, Д. А. Кабанов, Н. Л. Рудаква, М. П. Шарипова. Казань : К(П)ФУ, 2016. 42 с.
18. New derivatives of pyridoxine exhibit high antibacterial activity against biofilm – embedded *Staphylococcus* cells. A. Kayumov, A. Nureeva, et al. *BioMed Research Internat*. 2015. V. 2015. URL : <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/890968>. <https://doi.org/10.1155/2015/890968>.
19. Marques C. N. H. Isolation of persister cells from biofilm and planktonic populations of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bio-protocol*. 2015. V. 5, № 18. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1590>.
20. Chen C. Y. A., Nace G. W., Irwin P. L. 6x6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Methods*. 2003. V. 55, № 2. P. 475–479. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(03\)00194-5](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(03)00194-5).
21. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. Киев : Морион, 2001. 408 с.
22. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ; В. П. Фисенко, ред. Москва : ЗАО «ИИА Ремедиум», 2000. 450 с.
23. Möker N., Dean C. R., Tao J. *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *J. Bacteriology*. 2010. V. 192, № 7. P. 1946–1955. <https://doi.org/10.1128/JB.01231-09>.
24. Gupta P., Chhibber S., Harjai K. Subinhibitory concentration of ciprofloxacin targets quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa* causing inhibition of biofilm formation & reduction of virulence. *Indian J Med Res*. 2016. V. 143, № 5. P. 643–651. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.187114>.
25. Kaplan J. B. Antibiotic-induced biofilm formation. *The International journal of artificial organs*. 2011. V. 34, № 9. P. 737–751.
26. Bacteriophage PEV20 and Ciprofloxacin Combination Treatment Enhances Removal of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Isolated from Cystic Fibrosis and Wound Patients. R. Y. K. Chang, T. Das, J. Manos, E. Kutter et al. *AAPS J*. 2019. V. 21, № 3. <https://doi.org/10.1208/s12248-019-0315-0>.
27. Effects of disinfectants and ciprofloxacin on quorum sensing genes and biofilm of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. N. Uzunbayir-Akel, Y. Tekintas, F. F. Yilmaz et al. *J Infect Public Health*. 2020. V. 13, № 12. P. 1932–1938. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.10.002>.
28. Yasir M., Dutta D., Willcox M. D. P. Activity of Antimicrobial Peptides and Ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Molecules*. 2020. V. 25, № 17. P. 3843. <https://doi.org/10.3390/molecules25173843>.
29. Tewes F., Bahamondez-Canas T. F., Smyth H. D. C. Efficacy of Ciprofloxacin and Its Copper Complex against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *AAPS PharmSciTech*. 2019. V. 20, № 5. P. 205. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1417-9>. PMID: 31144198.
30. *In vitro* effects of combined iron chelation, antibiotics and matrix disruption on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. A. Nair, A. Perry, J. D. Perry et al. *J. Antimicrobial Chemotherapy*. 2020. V. 75, № 3. P. 586–592.
31. Antimicrobial Pressure of Ciprofloxacin and Gentamicin on Biofilm Development by an Endoscope-Isolated *Pseudomonas aeruginosa*. I. Machado, J. Graça, H. Lopes et al. *ISRN Biotechnol*. 2012. V. 2013. <https://doi.org/10.5402/2013/178646>.

Н. І. Гринчук, І. О. Бойко, Н. О. Вринчану

Антибіоплівкова дія ципрофлоксацину щодо *Pseudomonas aeruginosa*

Здатність мікроорганізмів до плівкоутворення створює суттєві проблеми в клінічній практиці. Одним із шляхів вирішення проблеми є оцінка антибіоплівкового ефекту сучасних антимікробних препаратів і дослідження їхнього впливу на різні етапи формування біоплівки.

Мета дослідження – встановити чутливість біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* та клітин-персистерів до дії ципрофлоксацину.

Антибіоплівкову активність ципрофлоксацину щодо клінічного ізоляту *P. aeruginosa* досліджували в концентраціях 0,5 МІК, 2,0 МІК і 5,0 МІК методом сорбції генціанвіолету на структурах біоплівки та з використанням резазурину. Життєздатність бактерій у складі сформованої біоплівки оцінювали за допомогою флуоресцентної мікроскопії з використанням барвників акридинового оранжевого та пропідій йодиду. Формування та реверсію метаболічно неактивних клітин досліджували шляхом активації SOS-відповіді в бактерій.

Отримані результати дослідження свідчать, що ципрофлоксацин здатен порушувати плівкоутворення та руйнувати сформовані біоплівки *P. aeruginosa*. За його дії в концентрації 5,0 МІК

рееструється зменшення біомаси (на 25,0–33,6 %) та кількості метаболічно активних клітин (78,6–100 %) на різних етапах формування біоплівки. Встановлено, що ципрофлоксацин у концентрації 0,5 МІК стимулює формування біоплівки. Препарат не запобігає утворенню персистерів, але здатен зменшувати їхню кількість у сформованій субпопуляції. Персистуючі клітини виявляють чутливість до дії препарату.

Таким чином, ципрофлоксацин виявляє антибіоплівкову активність щодо *P. aeruginosa*, яка більш виражена в концентрації, що перевищує МІК. У субінгібуючій концентрації ципрофлоксацин здатен стимулювати плівкоутворення, що необхідно враховувати в схемах використання фторхінолону в клінічній практиці. Існує необхідність поглиблених досліджень в умовах *in vivo* на різних моделях біоплівкових інфекцій з використанням штамів з різною чутливістю до антимікробних препаратів.

Ключові слова: антимікробні препарати, ципрофлоксацин, біоплівки, *P. aeruginosa*, персистери

Н. И. Гринчук, И. А. Бойко, Н. А. Врынчану **Антибиопленочная активность ципрофлоксацина относительно** ***Pseudomonas aeruginosa***

Способность микроорганизмов к пленкообразованию создает существенные проблемы в клинической практике. Одним из путей решения проблемы является оценка антибиопленочного эффекта современных антимикробных препаратов и исследование их влияния на различные этапы формирования биопленок.

Цель исследования – установить чувствительность биопленок *Pseudomonas aeruginosa* и клеток персистеров к действию ципрофлоксацина.

Антибиопленочную активность ципрофлоксацина в отношении клинического изолята *P. aeruginosa* исследовали в концентрациях 0,5 МІК, 2,0 МІК и 5,0 МІК методом сорбции генцианвиолета на структурах биопленки, а также с использованием резазурина. Жизнеспособность бактерий в составе сформированной биопленки оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием красителей акридинового оранжевого и пропидий йодида. Формирование и реверсию метаболически неактивных клеток исследовали путем активации SOS-ответа у бактерий.

Полученные результаты свидетельствуют, что ципрофлоксацин способен нарушать пленкообразование и разрушать сформированные зрелые биопленки *P. aeruginosa*. При его действии в концентрации 5,0 МІК регистрируется уменьшение биомассы (на 25,0–33,6 %) и количества метаболически активных клеток (на 78,6–100 %) на различных этапах формирования биопленки. Установлено, что ципрофлоксацин в концентрации 0,5 МІК стимулирует формирование биопленки. Препарат не предотвращает образование персистеров, но способен уменьшать их количество в сформированной субпопуляции. Персистирующие клетки проявляют чувствительность к препарату.

Таким образом, ципрофлоксацин оказывает антибиопленочное действие в отношении *P. aeruginosa*, которое более выражено в концентрации, превышающей МІК. В субингибирующей концентрации ципрофлоксацин способен стимулировать пленкообразование, что необходимо учитывать в схемах использования препарата в клинической практике. Существует необходимость дальнейших углубленных исследований в условиях *in vivo* на различных моделях биопленочных инфекций с использованием штаммов с разной чувствительностью к антимикробным препаратам.

Ключевые слова: антимикробные препараты, ципрофлоксацин, биопленки, *P. aeruginosa*, персистеры

Н. Hrynychuk, I. Boiko, N. Vrynchanu **Antibiofilm activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa***

The ability of microorganisms to form film creates significant problems in clinical practice. One of the ways to solve the problem is to assess the antibiofilm effect of modern antimicrobial drugs and study their effect on different stages of biofilm formation.

The aim of the study was to establish the sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and persister cells to the action of ciprofloxacin.

The antibiofilm activity of ciprofloxacin against the *P. aeruginosa* clinical isolate was investigated at concentrations of 0,5 MIC, 2,0 MIC and 5,0 MIC by sorption of gentian violet by biofilm structures, as well as using resazurin. The viability of bacteria in the formed biofilm was assessed by fluorescence microscopy using acridine orange and propidium iodide dyes. The formation and reversion of metabolically inactive cells were studied by activating the SOS-response in bacteria.

The results obtained indicate that ciprofloxacin is capable of disrupting film formation and destroying mature *P. aeruginosa* biofilms. Under the action of the drug at concentration of 5,0 MIC, a decrease in the biomass (25,0–33,6 %) and number of metabolically active cells (78,6–100 %) was recorded at various stages of biofilm formation. It was found that ciprofloxacin at a concentration of 0,5 MIC stimulates the

formation of *P. aeruginosa* biofilm. The drug does not prevent the formation of persisters, but is able to reduce their number in the formed subpopulation. Persistent cells are sensitive to the drug.

Thus, ciprofloxacin has an antibiofilm effect against *P. aeruginosa*, which is more pronounced at a concentration exceeding the MIC. At a subinhibitory concentration, ciprofloxacin is able to stimulate film formation, which must be taken into account in the drug use regimens in clinical practice. There is a need for further in-depth studies *in vivo* on various models of biofilm infections using strains with different sensitivity to antimicrobial drugs.

Key words: antimicrobial drugs, ciprofloxacin, biofilms, P. aeruginosa, persisters

Надійшла: 31 березня 2021 р.

Прийнята до друку: 28 квітня 2021 р.

Контактна особа: Гринчук Наталія Ігорівна, молодший науковий співробітник, лабораторія фармакології протимікробних засобів, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03150. Електронна пошта: natali72grynchuk@gmail.com