DOI: <https://doi.org/10.34883/PI.2021.10.3.022>
УДК 615.281.015.2

Артюх Т.В.
Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Artsiukh T.
Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Оценка антибактериальных эффектов триптофана и цинка аспартата как антибиопленочных агентов в комбинации с доксициклином *in vitro*

Evaluation of the Antibacterial Effects of Tryptophan and Zinc Aspartate as Antibiofilm Agents in Combination with Doxycycline *in Vitro*

Резюме

Цель. Изучить чувствительность микроорганизмов (*E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*) к доксициклину при добавлении в среду триптофана и цинка аспартата (1000 мкг/мл) в составе моно- и микст-биопленок.

Материалы и методы. Исследование проводили на клинических штаммах *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, изолированных у пациентов с клиническими признаками вагинита. Способность к пленкообразованию исследуемых штаммов *E. coli* 2646 и *S. aureus* 2738, *C. albicans* 2924 изучали в системе иммунологических планшетов в течение 5 дней в статических условиях, с закладкой медных сеточек для электронной микроскопии. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) доксициклина и его комбинаций с триптофаном и цинком для микроорганизмов в составе биопленок определяли с использованием анализа восстановления ХТТ (2,3-бис (2-метокси-4-нитро-5-сульфопенил)-5-[карбонил (фениламино)]-2Н-гидроксид тетразолия) на основе 1% резазурина. Визуализировали микробные биопленки под световым и электронным трансмиссионным микроскопом JEM 1011 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 KV.

Результаты. Исследуемые микроорганизмы *E. coli* 2646 и *S. aureus* 2738, *C. albicans* 2924 способны образовывать биопленки. Триптофан и цинка аспартат в концентрации 1000 мкг/мл оказывают модулирующее действие на чувствительность *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* к доксициклину в составе моно- и микст-биопленок. Триптофан и цинка аспартат повышают активность доксициклина по отношению к монобиопленкам *E. coli* и *S. aureus*. По отношению к биопленкам, в состав которых входит *C. albicans*, триптофан и цинка аспартат снижают активность доксициклина. МИК антибактериальных препаратов для микроорганизмов в составе микст-биопленок возрастают относительно МИК для монобиопленок в 4 раза.

Выводы. Биологически активные вещества (аминокислоты) обладают высоким потенциалом действия на биопленки. Тщательная оптимизация состава и концентрации триптофана и цинка аспартата, в зависимости от вида микроорганизма, вызывает антибиопленочный эффект, что позволяет рассматривать их в качестве адъювантов/наполнителей лекарств. Установленные закономерности могут быть использованы в качестве теоретической основы для разработки

способов повышения эффективности антимикробных препаратов в терапии биопленочных инфекций и борьбы с распространением устойчивых штаммов микроорганизмов.

Ключевые слова: микробные биопленки, резистентность, доксициклин, триптофан, цинка аспартат, минимальная ингибирующая концентрация.

Abstract

Objectives. To study the sensitivity of microorganisms (*E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*) to doxycycline in the presence of tryptophan and zinc aspartate (1000 mcg/ml) in mono- and mixed biofilms.

Materials and methods. The study was carried out on clinical strains *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* isolated in patients with clinical signs of vaginitis. The ability to film formation of the investigated strains *E. coli* 2646, *S. aureus* 2738, *C. albicans* 2924 was studied in the system of immunological plates for 5 days under static conditions, with the laying of copper meshes for electron microscopy. The minimum inhibitory concentration (MIC) of doxycycline and its combinations with tryptophan and zinc for microorganisms in biofilms was determined using the XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[carbonyl (phenylamino)]-2H-tetrazolium hydroxide) based on 1% resazurin. Microbial biofilms were visualized under a light and electron transmission microscope JEM 1011 (JEOL, Japan) at an accelerating voltage of 80 KV.

Results. The investigated microorganisms *E. coli* 2646, *S. aureus* 2738, *C. albicans* 2924 are capable of forming biofilms. Tryptophan and zinc aspartate at a concentration of 1000 mcg/ml have a modulating effect on the sensitivity of *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* to doxycycline in mono- and mixed biofilms. Tryptophan and zinc aspartate increase the activity of doxycycline in relation to mono-biofilms of *E. coli* and *S. aureus*. In relation to biofilms, which include *C. albicans*, tryptophan and zinc aspartate reduce the activity of doxycycline. The MIC of antibacterial drugs for microorganisms in the composition of mixed biofilms increases by a factor of 4 relative to the MIC for mono-biofilms.

Conclusion. Biologically active substances (amino acids) have a high potential for action on biofilms. Careful optimization of formulation and concentration can induce an anti-biofilm effect, allowing them to be used as adjuvants/fillers for drugs. The established patterns can be used as a theoretical basis for the development of ways to increase the effectiveness of antimicrobial drugs in the treatment of biofilm infections and to combat the spread of resistant strains of microorganisms.

Keywords: microbial biofilms, resistance, doxycycline, tryptophan, zinc aspartate, minimum inhibitory concentration.

■ ВВЕДЕНИЕ

Большинство микроорганизмов (до 97%) в естественных средах обитания, в том числе в организме человека, существуют в составе микробных биопленок [1]. Биопленка – это сообщество микроорганизмов, заключенное в защитный матрикс, синтезируемый участниками этого сообщества. Независимо от того, какие микроорганизмы входят в состав биопленок, они имеют общие принципы строения, функционирования, обладают химическими механизмами межклеточной коммуникации и генетически детерминированными программами, которые регулируют процессы пленкообразования на разных стадиях, включая диспергирование [2]. Специализированные вещества, аутоиндукторы, способны экскретироваться клетками и накапливаться в среде во время роста биопленки. Ответ клетки зависит от концентрации индуктора в среде, по достижении критического значения которого запускается

определенная генетическая программа у каждой клетки сообщества. В результате достигается высокая степень координации экспрессии генов и механизмов адаптации [3]. Эти закономерности позволяют рассматривать биопленку в качестве сложноорганизованного многоклеточного сообщества [4].

По данным Национального института здоровья США, около 80% бактериальных инфекций ассоциированы с микробными биопленками и с трудом поддаются лечению [5]. Биопленочные инфекции включают как тканевые инфекции (tissue infections), так и связанные с образованием биопленок на медицинских устройствах и катетерах (device-related infections) [6]. Образование биопленки – механизм выживания, при котором микроорганизмы становятся более устойчивыми не только к факторам иммунной защиты, ультрафиолету, дегидратации, вирусам, но и к антибактериальным препаратам [7–9]. Недавние исследования показывают, что для элиминации биопленки требуются до 100 раз большие дозы антибиотика по сравнению с их изолированными аналогами (планктонными формами) [10, 11]. Этот факт переводит антибиотики в неэффективные препараты для лечения биопленочных инфекций по причине токсичности для макроорганизма. Что подтверждается отсутствием терапевтических рекомендаций относительно биопленочных инфекций, которые будут отражены в инструкциях лекарственных средств. В свою очередь, применение минимальных ингибирующих концентраций для планктонных форм микроорганизмов с целью терапии биопленочных инфекций способствует распространению мультирезистентных штаммов и приводит к хронизации и рецидивированию инфекционных заболеваний бактериальной этиологии [12].

Динамика исследований, связанных с изучением микробных биопленок, указывает на осознание медицинским научным сообществом роли микробных биопленок в течении инфекционных процессов (рис. 1).

Рис. 1. Динамика изучения микроорганизмов в составе биопленок согласно Национальному центру биотехнологической информации (NCBI) [13]

Fig. 1. Dynamics of the study of microorganisms in biofilms according to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) [13]

В настоящее время во всем мире продолжается активный поиск лекарственных средств с высоким потенциалом действия на биопленки. Подходы в поиске таких веществ могут основываться на: комбинировании нескольких антибиотиков, разработке новых антибактериальных препаратов, активных в отношении биопленок, мониторинге известных соединений (биологически активных веществ) на наличие антибиопленочных эффектов [14, 15].

В исследованиях *in vitro* биологически активные вещества (БАВ) способны оказывать воздействие на жизнедеятельность бактерий в составе биопленки как самостоятельные вещества, а также в качестве адъювантов при антибактериальной терапии. Недавние исследования показывают влияние комбинаций L-аргинина и фторида на рост *Lactobacillus rhamnosus*. Аргинин в зависимости от концентраций может увеличивать и задерживать пленкообразование, 2%-е содержание аминокислоты в среде обеспечивает оптимальный синбиотико-фторидный синергизм [16].

На модели биопленки хронической раны (*S. aureus*, *P. aeruginosa*) определено влияние ферментов (трипсина, β -глюкозидазы и ДНКазы I) на снижение минимальной концентрации эрадикации биопленок меропенема и амикацина [17].

D-аспарагиновая кислота и D-глутаминовая кислота способны диспергировать сформировавшиеся биопленки *S. aureus* и ингибировать образование новой биопленки в отсутствие антибиотика. Помимо этого, наблюдается синергетический бактериостатический эффект L-аминокислот с цiproфлоксацином в более низких диапазонах концентраций аминокислот [18].

Из вышеописанных исследований можно сделать вывод, что изучение природы взаимодействия биологически активных веществ с биопленками различного состава имеет первостепенное значение, с помощью которого можно модулировать антибактериальный эффект для широкого спектра бактериальных патогенов.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на клинических штаммах *E. coli* 2646 и *S. aureus* 2738, *C. albicans* 2924. Микроорганизмы были изолированы у пациентов с клиническими признаками вагинита в УЗ «Гродненская университетская клиника». Идентификация, типирование и определение антибактериальной чувствительности микроорганизмов производились на микробиологическом анализаторе Vitek 2 Compact фирмы BioMérieux. Данные штаммы характеризуются как чувствительные (*S* – sensitive) к доксициклину. В работе руководствовались системой предельных значений European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [19]. Все манипуляции выполнялись в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.1890-04, предназначенными для применения в микробиологических лабораториях [20]. Эксперименты проводились с соблюдением определенных правил, которые необходимо выполнять, чтобы предохранить исследуемую культуру от загрязнения посторонними микроорганизмами [21].

Для приготовления рабочего раствора воздействующих веществ использовали доксициклин в капсулах по 100 мг ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов».

Особенности чувствительности исследуемых микроорганизмов по отношению к доксициклину изучали в присутствии триптофана и цинка аспартата. L-триптофан ($C_{11}H_{12}N_2O_2$) – ароматическая альфа-аминокислота в виде порошка белого цвета, является протеиногенной аминокислотой и входит в состав белков всех живых организмов. Аспарагинат цинка ($C_8H_{12}N_2O_8Zn$) представляет собой цинковую соль аспарагиновой (аминоянтарной) кислоты в виде порошка белого цвета. Массовая доля цинка в аспарагинате цинка не менее 27,5%.

Использовали суточную культуру микроорганизмов, выращенную на скошенном мясопептонном агаре, в концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл ед. (0,5 ед. по Мак-Фарланду) для *E. coli* и *S. aureus*; 6×10^8 КОЕ/мл ед. (2 ед. по Мак-Фарланду) для *C. albicans* в стерильном физиологическом растворе хлорида натрия. Концентрацию микробных тел контролировали измерением оптической плотности растворов по шкале McFarland на детекторе мутности суспензий DEN-1 Biosan. Результат измерения зависит от размеров микроорганизмов. Представленные числовые значения стандарта мутности по Мак-Фарланду являются средними для бактерий. Для дрожжевых микроорганизмов, размеры которых больше, эти значения должны быть разделены на 30 [22].

Моно- и микст-био пленки выращивали в системе 96-луночных полистироловых иммунологических планшетов, в статических условиях по адаптированной методике, описанной Caiazza и O'Toole, для микропланшетов Qu et al., 2016 [23].

В каждую лунку вносили по 100 мкл питательного бульона Мюллера – Хинтона, 20 мкл взвеси микроорганизмов и медные сеточки для просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Планшетки помещали в термостат для инкубации 35 ± 1 °C, время экспозиции 24 ч.

Рис. 2. Схема эксперимента, культивирование моделей биопленок in vitro

Fig. 2. Scheme of the experiment, cultivation of biofilm models in vitro

Рис. 3. Способ визуализации образцов биопленок, сеточка для ПЭМ [24]

Fig. 3. Method for visualization of biofilm samples, mesh for transmission electron microscopy [24]

Контроль роста биопленки на сеточках визуализировали с применением ПЭМ, световой микроскопии с использованием иммерсионной системы (окраска водным фуксином). Медные сеточки диаметром 3,5 мм покрывали формваровой пленкой (рис. 3). Покрытие формваром осуществлялось на базе научно-исследовательской лаборатории.

В течение трех дней ежедневно проводили промывку лунок фосфатным буферным раствором (рН 7,2–7,4) для удаления планктонных клеток, затем вносили свежую питательную среду и продолжали инкубировать, а также делали отбор некоторых сеточек для исследования ультраструктуры биопленки с помощью ПЭМ: микроскоп JEM 1011 (JEOL, Япония), ускоряющее напряжение 80 KV.

Для изучения эффектов триптофана и цинка аспартата на 4-е сутки после промывки добавили исследуемые препараты. Первая группа – доксициклин в двойных разведениях (5000–600 мкг/мл); 2-я группа – доксициклин в двойных разведениях (5000–600 мкг/мл) + триптофан 1000 мкг/мл; 3-я группа – доксициклин в двойных разведениях (5000–600 мкг/мл) + цинка аспартат 1000 мкг/мл (Macia et al., 2014) [25]. Через 24 часа (на 5-й день) каждую лунку промывали фосфатным буферным раствором. Производили отбор препаратов-сеточек, для каждого образца сделали по 10 фотографий в последовательно случайном поле зрения электронного микроскопа. После забора сеточек вносили свежую питательную среду и 1% раствор резазурина, регистрировали МИК. Для определения МИК исследуемых веществ на микроорганизмы в составе биопленки применяли модификацию метода определения метаболической активности биопленок с использованием анализа восстановления ХТТ на основе 1% резазурина (Alamar Blue). В результате бактериостатического и бактерицидного действия антибиотика микроорганизмы не проявляют жизнедеятельности и цвет резазурина не изменяется (синий). В живых клетках митохондрии способны уменьшать количество растворенного субстрата с формированием водорастворимого ярко-розового красителя (рис. 4). При устойчивости микроорганизма к препарату индикатор изменяет цвет на розовый. Таким образом, концентрация красителя пропорциональна количеству метаболически активных клеток.

Рис. 4. Принцип работы ХТТ-метода в модификации с резазурином [26]

Fig. 4. Method principle of the XTT method in the modification with resazurin [26]

Результаты регистрировали через 1, 2, 3, 6 и 18–24 часа по изменению окраски в сравнении с контролем. Результаты антибиотикочувствительности биопленок к исследуемым препаратам выражали в мкг/мл. Эксперименты были выполнены в трех повторях.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели ХТТ-теста представлены на рис. 5, в таблице.

Для моноплёнки, состоящей из клеток *S. aureus*, наиболее эффективным препаратом является 2-й (комбинация доксициклина с триптофаном), МИК равна 600 мкг/мл; и 3-й (комбинация доксициклина с цинка аспартатом), МИК 600 мкг/мл. Первый препарат (доксициклин) менее эффективен в отношении моноплёнки *S. aureus*, МИК равна 1200 мкг/мл (рис. 5).

Для моноплёнки *E. coli* наиболее эффективным препаратом является 1-й (доксициклин), МИК равна 1200 мкг/мл; и 2-й (комбинация доксициклина с триптофаном), МИК 1200 мкг/мл. Третий препарат (доксициклин

Рис. 5. ХТТ-анализ в модификации с 1% резазурином при экспозиции 24 часа

Fig. 5. XTT test in the modification 1% resazurin at 24 hours exposure

в комбинации с цинка аспартатом) менее эффективен в отношении моноplenки E. coli, МИК равна 5000 мкг/мл (рис. 5).

Для моноplenки C. albicans наиболее эффективным препаратом является 1-й (доксициклин), МИК равна 2500 мкг/мл; МИК комбинации доксициклина с триптофаном >5000 мкг/мл. МИК комбинации доксициклина с цинка аспартатом – 5000 мкг/мл.

Для микст-биопленки C. albicans + S. aureus наиболее эффективным препаратом является доксициклин, МИК равна 1200 мкг/мл; 2-й и 3-й (комбинации с БАВ) менее эффективны, МИК равна 2500 мкг/мл (рис. 5).

Микст-биопленки C. albicans + E. coli проявляют одинаковую чувствительность ко всем препаратам, МИК равна 2500 мкг/мл (рис. 5).

Микст-биопленки C. albicans + S. aureus + E. coli наиболее чувствительны к 1-му и 2-му препарату, МИК равна 2500 мкг/мл. Комбинация доксициклина с цинка аспартатом менее эффективна в отношении данной микст-биопленки, МИК равна 5000 мкг/мл (рис. 5).

Необходимо отметить, что МИК антибактериальных препаратов для микроорганизмов в составе микст-биопленок возрастают относительно МИК для монобиопленок, что подтверждается и другими исследованиями [27].

Так, резистентность S. aureus и E. coli к доксициклину в составе микст-биопленок C. albicans + S. aureus + E. coli возрастает в 2 раза, с 1200 мкг/мл до 2500 мкг/мл; ко второму препарату (доксициклин + триптофан) в 3 раза, с 600 мкг/мл до 2500 мкг/мл; к 3-му препарату (доксициклин + цинка аспартат) в 4 раза, с 600 мкг/мл до 5000 мкг/мл.

На основании снимков световой микроскопии исследуемые микроорганизмы: E. coli 2646, S. aureus 2738 и C. albicans 2924 способны образовывать биопленку. Наблюдается тенденция прикрепления биопленок к стенкам квадратов сеточки, что подтверждает ее свойство фиксироваться на биотических и абиотических поверхностях, к центру биопленки менее плотные (рис. 6).

Эффект БАВ на чувствительность E. coli, S. aureus, C. albicans к доксициклину в составе биопленок при экспозиции 60 минут

Effect of biologically active substances on the sensitivity of E. coli, S. aureus, C. albicans to doxycycline in biofilms at 60 minutes exposure

Состав био- пленки	Контроль (м/о без пре- паратов)	1. D 5000/2500/1200/600 мкг/мл	2. D + Tr 5000/2500/1200/600 мкг/мл	3. D + Zn 5000/2500/1200/600 мкг/мл
N	3	3	3	3
S. aureus	P	C*/C*/C*/P#	C*/C* C*/C*/	C*/C* C*/C*
E. coli	P	C*/C*/C*/P#	C*/C*/C*/P#	C*/P#/P#/P#
C. albicans	P	C*/C*/P#/P#	P#/P#/P#/P#	C*/P#/P#/P#
C. albicans + S. aureus	P	C*/C*/C*/P#	C*/C*/P#/P#	C*/C*/P#/C*
C. albicans + E. coli	P	C*/C*/P#/P#	C*/C*/P#/P#	C*/C*/P#/P#
C. albicans + S. aureus + E. coli	P	C*/C*/P#/P#	C*/C*/P#/P#	C*/P#/P#/P#

Примечания: P – розовый цвет; C – синий цвет; достоверные изменения в сравнении с контролем (*); в сравнении с группой 2, 3 мкг/мл (#).

Рис. 6. Световая микроскопия, биопленки на медных сеточках (окраска водным фуксином), увеличение 100, контрольные образцы слева направо: отсутствие биопленки, монобиопленка (*E. coli*), микст-биопленка (*E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*)

Fig. 6. Light microscopy, biofilms on copper grids (staining with aqueous fuchsin), magnification 100, control samples from left to right: no biofilm, mono-biofilm (*E. coli*), mixed-biofilm (*E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*)

ПЭМ-изображения микробных биопленок показывают закономерности, схожие с резазуриновым тестом, а именно: триптофан и цинка аспартат в концентрации 1000 мкг/мл повышают активность доксициклина в отношении монобиопленок бактерий *E. coli*, *S. aureus*. Изображения остаточной биопленки продемонстрировали обширную деградацию биопленки, деформации/перфорации бактериальных клеток и удаление внеклеточной полимерной матрицы (extracellular polymeric substance, EPS) при воздействии доксициклином в присутствии триптофана и цинка аспартата (2, 3 препараты) в сравнении с контрольными образцами и образцами биопленок без БАВ. При анализе изображений микст-биопленки *E. coli* + *S. aureus* на рис. 7А (воздействие доксициклином 600 мкг/мл + триптофан 1000 мкг/мл) и 7D (воздействие доксициклином 600 мкг/мл) очевиден бактериостатический эффект триптофана (рис. 7А).

В отношении *C. albicans*, напротив, наблюдается снижение активности доксициклина в присутствии триптофана и цинка аспартата 1000 мкг/мл. Клетки *C. albicans* размножаются (почкование) и образуют гифы (рис. 7В, С). Основная функция гиф – поглощение воды и питательных веществ [28]. На основании этого можно предполагать, что триптофан и цинка аспартат являются питательными веществами для дрожжевых клеток, которые имеют принципиальное отличие в строении от бактериальных клеток. Снижение МИК доксициклина в комбинации с триптофаном или цинка аспартатом хорошо заметно не только по отношению к монобиопленке, состоящей из клеток *C. albicans*, но и на микст-биопленках, в состав которых входит *C. albicans*.

ПЭМ-изображения продемонстрировали электронноплотные структуры биопленки с обильным количеством клеток, адгезированных к поверхности формваровой пленки и друг к другу (рис. 7В, С). Клетки объединены рыхлым внеклеточным веществом (полисахаридные фибриллы и внеклеточная ДНК). Наибольшая склонность к пленкообразованию у *C. albicans*. Наблюдается активная адгезия *E. coli* на поверхности

Рис. 7. ПЭМ, образцы 5-дневных биопленок. А – *E. coli* + *S. aureus* (доксициклин 600 мкг/мл + триптофан 1000 мкг/мл). Мерный отрезок равен 5 мкм; В – *C. albicans* + *E. coli* + *S. aureus* (доксициклин 600 мкг/мл + триптофан 1000 мкг/мл). Мерный отрезок равен 10 мкм; С – гифальные формы *C. albicans*. *C. albicans* + *E. coli* + *S. aureus* (доксициклин 600 мкг/мл + цинка аспартат 1000 мкг/мл). Мерный отрезок равен 10 мкм; D – *E. coli* + *S. aureus* (доксициклин 600 мкг/мл). Мерный отрезок равен 5 мкм

Fig. 7. TEM, 5-day biofilm samples. A – *E. coli* + *S. aureus* (doxycycline 600 mcg/ml + tryptophan 1000 mcg/ml). The measured segment is 5 mcm; B – *C. albicans* + *E. coli* + *S. aureus* (doxycycline 600 mcg/ml + tryptophan 1000 mcg/ml). The measured section is 10 mcm; C – hyphal forms of *C. albicans*. *C. albicans* + *E. coli* + *S. aureus* (doxycycline 600 mcg/ml + zinc aspartate 1000 mcg/ml); The measured segment is 5 mcm; D – *E. coli* + *S. aureus* (doxycycline 600 mcg/ml). The measured segment is 5 mcm

C. albicans, которая образует ростовые трубки (рис. 7C). Аггезия бактериальных клеток, по-видимому, опосредована наличием EPS и нитевидных пилеподобных структур. Аггезия характерна для 1–3-й стадии пленкообразования и является признаком истинной биопленки в отличие от колоний на агаре (рис. 7B, C) [1, 4].

При электронной микроскопии, как и при световой, сохраняется тенденция прикрепления биопленок к стенкам квадратов медной сеточки (рис. 2, 7B).

Бактериостатическое воздействие БАВ (триптофана и цинка аспартата) на бактерии (*E. coli* и *S. aureus*) может реализовываться через блокирование синтеза клеточных элементов (компонентов клеточной стенки), блокирование синтеза или разрушение полимерного матрикса, нарушение межклеточного обмена генетической информацией, может быть направлено на механизмы первоначальной адгезии бактерий к абиотической поверхности, а также оно может сочетаться с собственными бактерицидными агентами (антибиотиками) [29]. Однако существует ряд сложностей в работе с биопленками *in vivo*: отсутствие одобренных клинических протоколов, специфических маркеров, разнообразие локализации биопленок. Поэтому в подавляющем большинстве случаев биопленки анализируются *in vitro*, *in situ*, *ex vivo*, что может не передавать полной информации о свойствах биопленки, эффектах воздействующих веществ и искажать диагностику [30].

■ ВЫВОДЫ

Исследуемые микроорганизмы *E. coli* 2646 и *S. aureus* 2738, *C. albicans* 2924 способны образовывать биопленки.

Триптофан и цинка аспартат в концентрации 1000 мкг/мл оказывают модулирующее действие на чувствительность *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* к доксициклину в составе моно- и микст-биопленок. Триптофан и цинка аспартат (1000 мкг/мл) в 2 раза повышают активность доксициклина по отношению к монобиопленкам *E. coli* и *S. aureus* с 1200 до 600 мкг/мл. По отношению к биопленкам, в состав которых входит *C. albicans*, триптофан и цинка аспартат (1000 мкг/мл) снижают активность доксициклина с 1200 до >5000 мкг/мл.

При определении ингибирующих концентраций ХТТ-методом в модификации с 1% резазурином МИК антибактериальных препаратов для микроорганизмов в составе микст-биопленок возрастают относительно МИК для монобиопленок в 4 раза.

Установленные закономерности могут быть использованы в качестве теоретической основы для разработки способов повышения эффективности антимикробных препаратов в терапии биопленочных инфекций и борьбы с распространением устойчивых штаммов микроорганизмов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Sigrun E. (2021) Biofilms. *Monogr Oral Sci.*, vol. 29, pp. 1–11.
2. Schilcher K., Horswill A.R. (2020) Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies [electronic resource]. *Microbiol Mol Biol Rev.*, vol. 84, iss. 3. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32792334/> (accessed 15.06.2021).
3. Detusheva E., Slukin P., Fursova N. (2020) Molecular genetic methods of studying biofilms of microorganisms. *Bacteriology*, vol. 5, no 2, pp. 49–55.
4. Oliveira N.M. (2015) Biofilm formation as a response to ecological competition. *PLoS Biol.*, vol. 13, no 7, p. e1002191.
5. Vsemirnaja organizacija zdravoohraneniya. *Evropejskoj regionalnoe bjuro. Jepidnadzor za ustojchivostju k protivomikrobnym preparatam v Centralnoj Azii i Evrope* [World Health Organization. Regional Office for Europe. Antimicrobial resistance surveillance in Central Asia and Europe]. Available at: https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0013/430132/WHO-CAESAR-manual-2019-RUS.pdf.

6. Stewart P.S., Bjarnsholt T. (2020) Risk factors for chronic biofilm-related infection associated with implanted medical devices. *Clin Microbiol Infect.*, vol. 26, no 8, pp. 1034–1038.
7. Qu Y. (2020) In vitro Evaluation of Medihoney Antibacterial Wound Gel as an Anti-biofilm Agent Against Ventricular Assist Device Driveline Infections [electronic resource]. *Front Microbiol.*, vol. 11. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7719625/> (accessed 16.06.2021).
8. Galimzyanov H.M. (2018) Clinical significance of biofilm formation in bacteria. *Astrakhan medical journal*, 4, pp. 32–42.
9. Sokolova T. (2014) Microbial biofilms and methods for their detection. *Journal of the Grodno State Medical University*, 4, pp. 12–15.
10. Hoiby N. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 35, no 4, pp. 322–332.
11. Artyukh T., Sokolova T., Ostrovskaya O. (2021) Features of resistance of clinical isolates of *E. coli* and *C. albicans* forming a biofilm. *Vestn. VSMU*, vol. 20, no 1, pp. 46–54.
12. Walker J.N. (2020) High-resolution imaging reveals microbial biofilms on patient urinary catheters despite antibiotic administration. *World J Urol.*, vol. 38, no 9, pp. 2237–2245.
13. The National Center for Biotechnology Information (electronic resource). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=biofilms> (accessed 14.06.2021).
14. Magana M. (2018) Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms (electronic resource). *Clin Microbiol Rev.*, vol. 31, no 3. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6056845/> (accessed 16.06.2021).
15. Mandell J.B. (2019) Large variations in clinical antibiotic activity against *Staphylococcus aureus* biofilms of periprosthetic joint infection isolates. *J Orthop Res.*, vol. 37, iss. 7, pp. 1604–1609.
16. Bijle M.N. (2021) Combined effect of arginine and fluoride on the growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG (electronic resource). *Sci Rep.*, vol. 11. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7806861/> (accessed 16.06.2021).
17. Pirlar R.F. (2020) Combinatorial effects of antibiotics and enzymes against dual-species *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the wound-like medium (electronic resource). *PLoS One*, vol. 15, iss. 6. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7316268/> (accessed 17.06.2021).
18. Warraich A.A. (2020) Evaluation of anti-biofilm activity of acidic amino acids and synergy with ciprofloxacin on *Staphylococcus aureus* biofilms (electronic resource). *Sci Rep.*, vol. 10. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7265346/> (accessed 15.06.2021).
19. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID, European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Arendrup M.C., Cuenca-Estrella M. (2012) Document E.DEF 7.2: Method for the determination of broth dilution of antifungal agents for fermentative yeasts.
20. (2004) Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs. Methodical instructions: MUK 4.2.1890-04, approved. M-vom zdr. RF. 04.04.2004: as of 17.04.2021 Moscow: Cent. scientific research inst. epidemiology.
21. Kontsevaya I. (2017) *Microbiology: cultivation and growth of bacteria: manual*. Chernigov: Desna polygraph publishing house, p. 43.
22. User manual: suspension turbidity detector DEN-1 BIOSAN (electronic resource). *Biosan SIA*. Available at: https://biosan.lv/media/products/files/den-1-den-1b-ru204-0319_D7XD9aA.pdf (accessed 14.06.2021), p. 6.
23. Qu Y. (2016) Searching for new strategies against polymicrobial biofilm infections: guanlylated polymethacrylates kill mixed fungal/bacterial biofilms. *J Antimicrob Chemother.*, vol. 71, iss. 2, pp. 413–21.
24. Golovin C., Titova S., Simonova I. *Method of obtaining samples of biofilms of Vibrio cholerae for research by transmission electron microscopy: US Pat. RU №. 218.016.7736*. Publ. 02.08.2018.
25. Macià M.D., Rojo-Molinero E., Oliver A. (2014) Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect.*, vol. 20, iss. 10, pp. 981–90.
26. Driessche F. (2014) Optimization of resazurin-based viability staining for quantification of microbial biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 98, pp. 31–34.
27. Okulich V.K. (2015) Antibiotic resistance of hospital staphylococcus aureus isolates forming biofilm. *Health*, 7, pp. 11–16.
28. Wakade R.S., Krysan D.J. (2021) The Cbk1-Ace2 axis guides *Candida albicans* from yeast to hyphae and back again. *Curr Genet.*, vol. 67, no 3, pp. 461–469.
29. Beloin C., McDougald D. (2021) Speciality Grand Challenge for "Biofilms" (electronic resource). *Front Cell Infect Microbiol.*, vol. 11. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7937965/> (accessed 16.06.2021).
30. Artyukh T., Sokolova T., Sheibak V. (2021) Modern methods of studying intestinal microbial biofilms. *Hepatology and gastroenterology*, vol. 5, no 1, pp. 30–36.

Подана/Submitted: 26.08.2021
Принята/Accepted: 30.09.2021
Контакты/Contacts: taniaartsukh@gmail.com