

Ниженковская И.В., Онищук Л.В.

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев, Украина

Nizhenkovska I., Onyshchuk L.

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Чувствительность биопленок *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* к действию нового комбинированного лекарственного средства в форме вагинальных суппозиторий

Susceptibility of *Staphylococcus Aureus* and *Candida Albicans* Biofilms to the New Combined Drug of Vaginal Suppositories

Резюме

Бактериальные клетки в составе биопленок характеризуются высоким уровнем патогенности, устойчивостью к защитным механизмам организма человека и резистентностью к антибиотикам и дезинфектантам. Биопленки снижают эффективность антимикробной химиотерапии и способствуют хронизации воспалительного процесса, их обнаруживают в 80–90% случаев хронических заболеваний. В эксперименте изучали антибиопленочное действие нового комбинированного лекарственного средства на *S. aureus*, *C. albicans* и микробные ассоциации. В работе исследовали вагинальные суппозитории (клотримазол, метронидазол, ибупрофен, витепсол). Способность исследуемых веществ влиять на пленкообразование бактерий и грибов исследовали на 1-суточных культурах микроорганизмов, используя полистироловые планшеты для иммуноферментного анализа. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре. Клотримазол в концентрации 100–400 мкг/мл подавлял формирование биопленки *C. albicans* на 92,2–93,7%, а метронидазол в концентрации 200 мкг/мл подавлял формирование биопленки *S. aureus* на 75,1%. В исследовании выявлена отчетливая антимикробная активность нестероидного противовоспалительного препарата ибупрофена, по отношению к биопленкам *S. aureus* в концентрации 20 мкг/мл ингибирующий эффект составил 50,8%, при 40 мкг/мл и 80 мкг/мл – 76,7 и 72,3% соответственно. Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что новый комбинированный препарат проявляет отчетливое ингибирующее действие на монокультуры аэробных и анаэробных бактерий, а также бактериально-грибковые ассоциации. Экспериментально доказано наличие антибиопленочной активности препарата в отношении золотистого стафилококка, дрожжеподобных грибов и микробных ассоциаций, состоящих из *S. aureus* и *C. albicans*.

Ключевые слова: биопленки, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, метронидазол, клотримазол, ибупрофен.

Abstract

Bacterial cells in the composition of biofilms are characterized by high levels of pathogenicity, resistance to protective mechanisms of the human body and resistance to antibiotics and disinfectants. Biofilms reduce the effectiveness of antimicrobial chemotherapy and promote the

chronization of the inflammatory process, they are found in 80–90% of cases of chronic diseases. In the experiment, the antibiotic effect of the new combined drug on *S. aureus*, *C. albicans* and microbial associations was studied. Vaginal suppositories (clotrimazole, metronidazole, ibuprofen, vitepsol) were investigated in this study. The ability of the test substances to influence the film formation of bacteria and fungi was investigated on 1-day cultures of microorganisms using polystyrene plates for immunoassay analysis. Measurement of optical density was carried out on a spectrophotometer. Clotrimazole at a concentration of 100–400 µg/ml suppressed the formation of *C. albicans* biofilms by 92.2–93.7%, and metronidazole at a concentration of 200 µg/ml suppressed the formation of biofilms *S. aureus* by 75.1%. The study revealed a distinct antimicrobial activity of the nonsteroidal anti-inflammatory drug ibuprofen, with respect to *S. aureus* biofilms at a concentration of 20 µg/ml, the inhibitory effect was 50.8%, at 40 µg/ml and 80 µg/ml – 76.7 and 72.3% respectively. The results of the conducted studies indicate that the new combined drug exhibits a distinct inhibitory effect on monocultures of aerobic and anaerobic bacteria, as well as bacterial-fungal associations. The presence of antibiotic activity of the preparation in relation to *S. aureus*, yeast-like fungi and microbial associations consisting of *S. aureus* and *C. albicans* has been experimentally proved.

Keywords: biofilms, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, metronidazole, clotrimazole, ibuprofen.

■ ВВЕДЕНИЕ

В течение длительного времени микроорганизмы рассматривались как планктонные клетки, с учетом чего проводилось большинство микробиологических исследований, в том числе установление активности антимикробных препаратов, определение спектра и механизма действия, а также разработаны тест-системы по определению чувствительности микроорганизмов к действию лекарственных средств. Согласно современным представлениям, основной формой существования микроорганизмов являются биопленки – структурно организованные микробные группировки, прикрепленные к абиотическому (импланты, катетеры) или биотическому (ткани макроорганизма) субстрату и окруженные биополимерным матриксом. Бактериальные клетки в составе биопленок характеризуются высоким уровнем патогенности, устойчивостью к защитным механизмам организма человека и резистентностью к антибиотикам и дезинфектантам [1–3]. Биопленки снижают эффективность антимикробной химиотерапии и способствуют хронизации воспалительного процесса, их обнаруживают в 80–90% случаев хронических заболеваний [4–6].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение влияния потенциального комбинированного лекарственного средства с противомикробной и противовоспалительной активностью в форме вагинальных суппозиториях на чувствительность биопленок *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования стали модельные образцы комбинированного лекарственного средства в форме вагинальных суппозиториях, в состав которых входили клотримазол, метронидазол, ибупрофен, витепсол.

Эксперименты проведены с использованием клинического штамма *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) 222, чувствительного к действию азитромицина, амикацина и клиндамицина, умеренно чувствительного к эритромицину, резистентного к действию оксациллина, гентамицина, рифампицина и ципрофлоксацина, и *Candida albicans* (*C. albicans*) 1486, чувствительной к действию клотримазола, итраконазола и тербинафина, умеренно чувствительной к амфотерицину В, резистентной к действию флуконазола и кетоконазола.

Антибактериальное действие нового комбинированного лекарственного средства по отношению к планктонной форме *S. aureus* определяли методом серийных разведений и оценивали по показателям минимальной ингибирующей концентрации (МИК) [7]. Плотность инокулята составляла для бактерий – 10^5 КОЕ/мл, для дрожжеподобных грибов – 10^5 грибных элементов на 1 мл среды [8]. Эксперименты проведены с использованием бульона Мюллера – Хинтона.

Способность исследуемых веществ влиять на пленкообразование бактерий и грибов исследовали на 1-суточных культурах микроорганизмов, используя полистироловые планшеты для иммуоферментного анализа. Растворы исследуемых веществ вносили одновременно с суспензией бактерий. Плотность инокулята при исследовании пленкообразования составляла 10^7 КОЕ/мл питательной среды. После добавления веществ, планшеты выдерживали при температуре 37 °С в течение 24 ч. После окончания срока инкубации вносили 0,1%-ный раствор генцианвиолета на 15 мин., затем промывали лунки дистиллированной водой и осуществляли экстракцию красителя 96,0%-ным этанолом. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре для микропланшета «Absorbance Microplate Reader ELx800». Контролем служили культуры микроорганизмов, выращенные на тех же условиях, без добавления соединений и препаратов [9].

Антимикробное действие свечей исследовали согласно ГФУ [10]. Для установления антибактериального и антифунгального действия суппозитории растворяли в буферном растворе с натрия хлоридом и пептоном pH 7,0, предварительно подогретом до 37 °С (10 г препарата + 100 мл растворителя), и осуществляли последовательные десятикратные разведения для получения различных концентраций в растворах. Конечная концентрация клотримазола составляла 5000, 500 и 50 мкг/мл, метронидазола – 1250, 125 и 12,5 мкг/мл, ибупрофена – 1000, 100 и 10 мкг/мл.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием программ Excel 2007 (Microsoft Corp., США) и Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для оценки результатов исследований и выявления различий использовали дисперсионный метод (ANOVA), критерий Ньюмена – Кейлса [11].

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С учетом этапности формирования биопленки и форм существования микроорганизмов мы исследовали антибиопленковое действие вагинальных суппозитория по отношению к планктонным микроорганизмам и биопленкам.

При исследовании антибиопленковой активности клотримазола и метронидазола учитывали концентрации этих веществ в готовой лекарственной форме – вагинальные суппозитории (клотримазол – 400 мг, метронидазол – 100 мг). Специфическую антимикробную активность клотримазола изучали в концентрациях 100, 200, 400 мкг/мл, метронидазола – 50, 100, 200 мкг/мл.

Поскольку спектр действия антимикробных препаратов по отношению к планктонным микроорганизмам не всегда соответствует такому относительно биопленок [12], а также учитывая отсутствие адгезивности *S. sroogenes* к абиотической поверхности тест-объектов, при определении антибиопленочной активности метронидазола изучали *S. aureus* и *S. albicans*.

Исследования показали, что клотримазол проявляет такую активность в отношении биопленок золотистого стафилококка в концентрациях 100–400 мкг/мл, что биопленка не образуется. Практически не образуется также и биопленка *S. albicans*, угнетение составляет 92,2–93,7% (рис. 1).

Данные рис. 2 свидетельствуют о выразительном антибиопленочном действии метронидазола по отношению к золотистому стафилококку. Действие антимикробного вещества является дозозависимым, максимальная ингибирующая активность наблюдается в концентрации 200 мкг/мл (75,1%). Снижение концентрации метронидазола до 50 мкг/мл хотя и сопровождается снижением активности (43,3%), но антимикробное вещество проявляет отчетливое антибиопленочное действие.

Составляющим вагинальных суппозиториях кроме антимикробных веществ является нестероидный противовоспалительный препарат ибупрофен, который, согласно литературе [13, 14], тоже может проявлять антимикробную активность, в частности антибиопленочную, а также способен усиливать специфическую активность антимикробных препаратов. В связи с этим мы оценивали активность ибупрофена

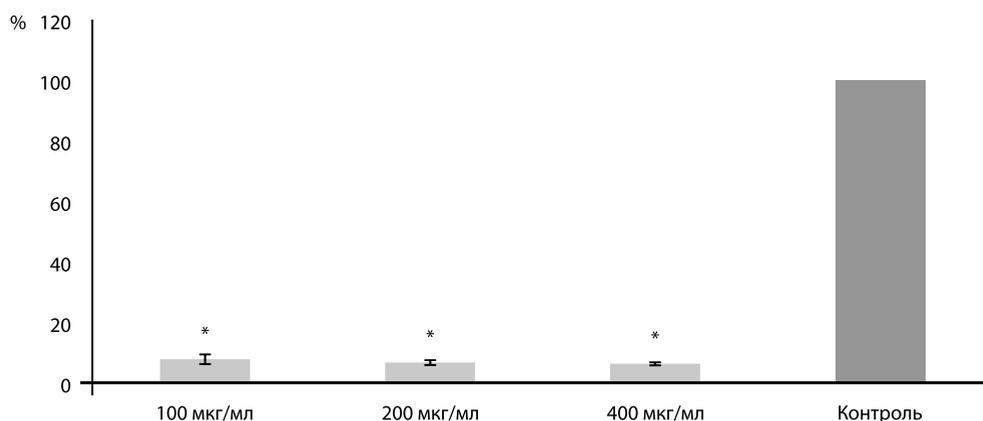


Рис. 1. Формирование биопленки *S. albicans* 1486 при воздействии клотримазола (% образованной биопленки)

Примечание: * различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

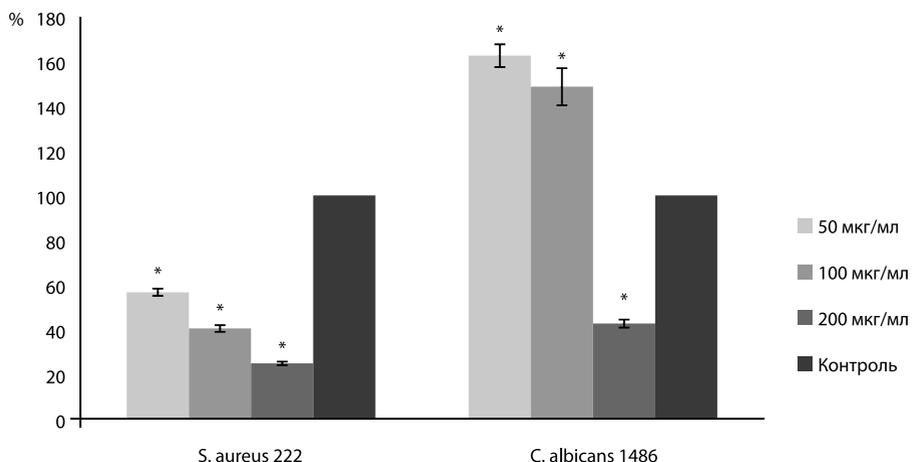


Рис. 2. Формирование биопленки *S. aureus* 222 и *C. albicans* 1486 при действии метронидазола (% образованной биопленки)

Примечание: * различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

относительно биопленок бактерий (*S. aureus*). Антибиопленочное действие ибупрофена изучали в диапазоне концентрации 20–80 мкг/мл.

Полученные данные приведены на рис. 3.

Проведенные исследования показали, что ибупрофену присуще выразительное ингибирующее антибиопленочное действие по отношению к золотистому стафилококку, степень угнетения которого зависит от концентрации указанного фармакологического агента. Так, при концентрации 20 мкг/мл ингибирующий эффект составляет 50,8%, при 40 мкг/мл и 80 мкг/мл – 76,7% и 72,3% соответственно.

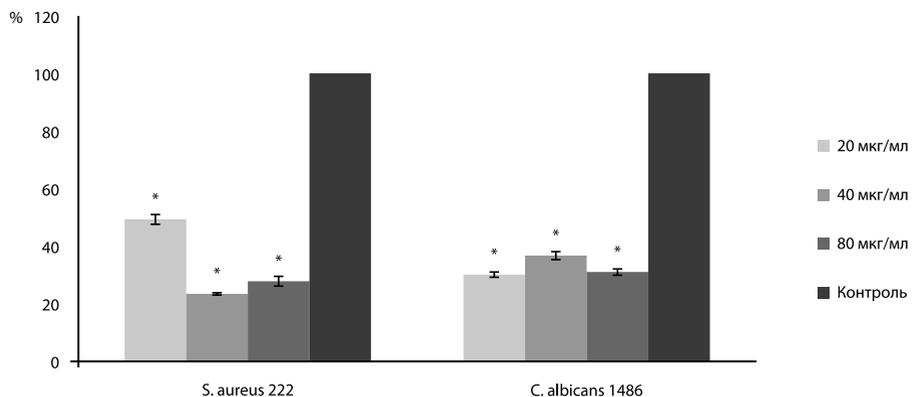


Рис. 3. Формирование биопленки *S. aureus* 222 и *C. albicans* 1486 при воздействии ибупрофена (% биопленки)

Примечание: * различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о выразительной активности действующих веществ вагинальных суппозиторий по отношению к монокультурам планктонных аэробных грамположительных, облигатных анаэробных бактерий и дрожжеподобных грибов. Доказана также их активность в отношении биопленок, сформированных монокультурой бактерий или грибов.

Для выяснения возможного негативного влияния на специфическую антимикробную активность действующих веществ при их комбинированном применении проведено сравнение совместного ингибирующего эффекта составляющих препарата с действием отдельных веществ относительно биопленок, сформированных золотистым стафилококком и грибами рода *Candida*. Полученные результаты приведены на рис. 4.

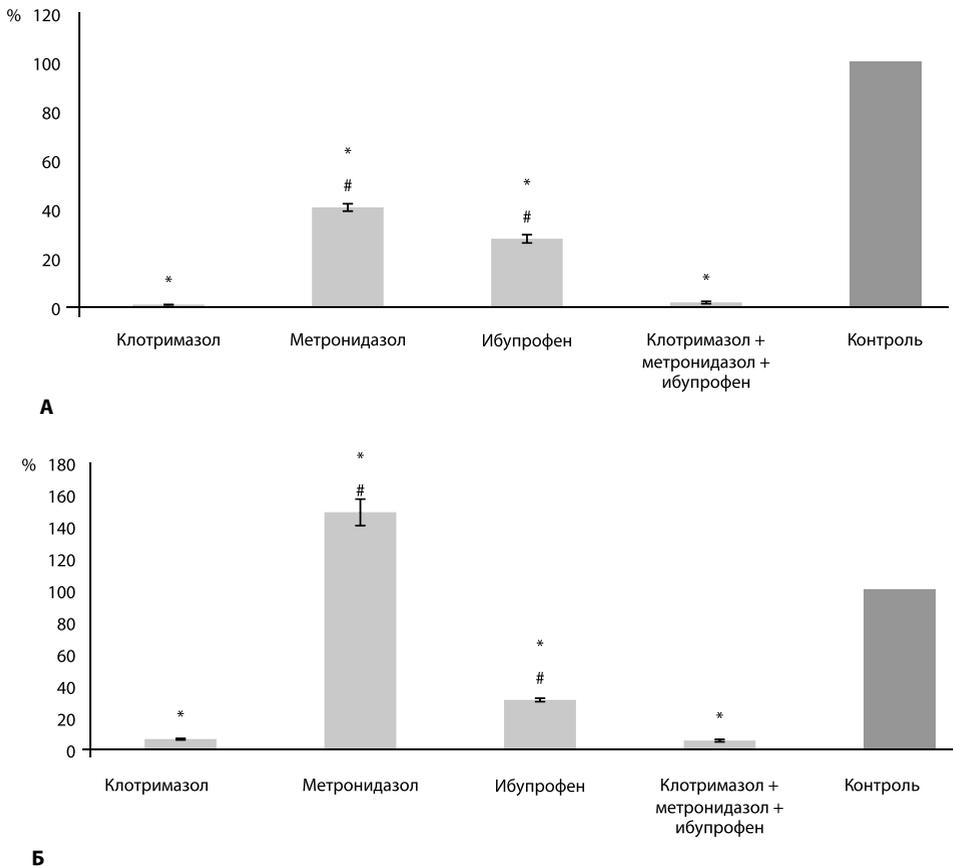


Рис. 4. Пленкообразование *S. aureus* 222 (А) и *C. albicans* 1486 (Б) при действии клотримазола, метронидазола, ибупрофена и их совместного применения (% образованной биопленки)

Примечания:

* различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$);

различия достоверны по сравнению с совместным применением клотримазола, метронидазола и ибупрофена ($p < 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют (рис. 4), что при взаимодействии активных компонентов суппозитория не наблюдается снижение специфического антимикробного действия отдельных компонентов препарата. Установлено, что достоверных различий антимикробной активности клотримазола (400 мкг/мл) по отношению к биопленкам бактерий и грибов не обнаружено в сравнении с антибиопленочным действием веществ при их совместном применении – ингибирующий эффект по отношению к *S. aureus* 222 составляет 99,2% и 98,3%, а к *C. albicans* 1486 – 93,7% и 94,6% соответственно ($p < 0,05$). В дальнейших экспериментах определяли влияние вагинальных суппозитория на пленкообразование бактерий, грибов и микробных ассоциаций.

Определение антибиопленочного действия суппозитория проводили согласно [3]. Один суппозиторий растворяли в соотношении 10:100 в фосфатном буферном растворе с натрия хлоридом и пептоном (рН 7,0) и готовили последовательные десятикратные разведения препарата в соответствующей питательной среде. Конечная концентрация активного вещества клотримазола составила 5000, 500 и 50 мкг/мл с учетом разведения вагинальных суппозитория.

Полученные данные о влиянии вагинальных суппозитория на образование биопленки золотистого стафилококка приведены на рис. 5.

Результаты проведенных экспериментов показали (рис. 5), что исследуемый препарат дозозависимо угнетает пленкообразование *S. aureus* 222, ингибирующий эффект составляет 12,0–93,5%.

Выразительную активность суппозитория проявляют и по отношению к биопленкам, сформированным дрожжеподобными грибами (рис. 6).

Данные рис. 6 показывают, что при условии влияния препарата биомасса биопленки значительно уменьшается и составляет 5,2–17,6% (степень ингибирования пленкообразования 82,4–94,8% в зависимости от концентрации).

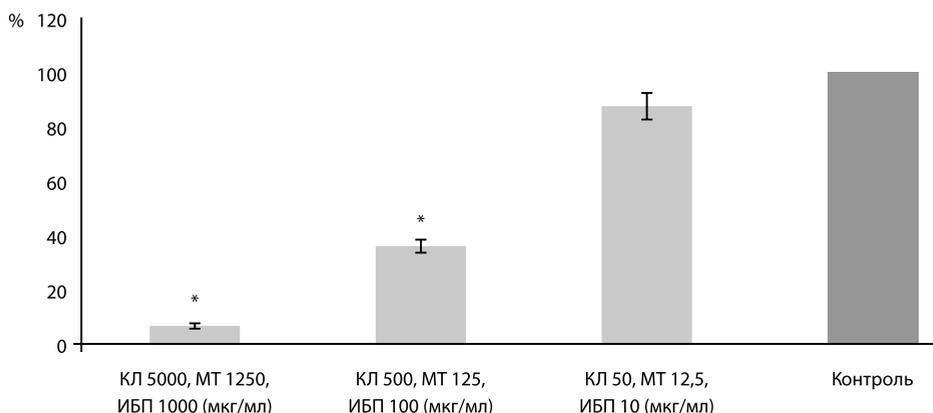


Рис. 5. Формирование биопленки *S. aureus* 222 при воздействии суппозитория (% образованной биопленки)

Примечания:

КЛ – клотримазол, МТ – метронидазол, ИБП – ибупрофен;

* различия достоверны в сравнении с контролем ($p < 0,05$).

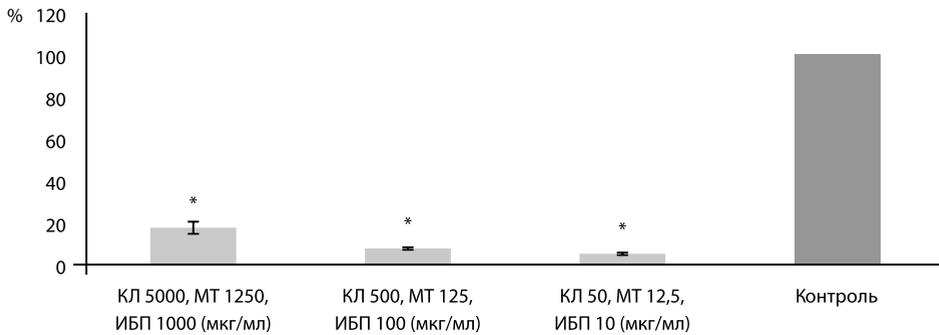


Рис. 6. Формирование биопленки *C. albicans* 1486 при воздействии суппозиториях (% образованной биопленки)

Примечания:

КЛ – клотримазол, МТ – метронидазол, ИБП – ибупрофен;

* различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что действующие вещества нового комбинированного препарата проявляют отчетливое ингибирующее действие по отношению к монокультурам аэробных и анаэробных бактерий, а также бактериально-грибковым ассоциациям. Клотримазол в концентрации 100–400 мкг/мл подавляет формирование биопленки *C. albicans* на 92,2–93,7%, а метронидазол в концентрации 200 мкг/мл подавляет формирование биопленки *S. aureus* на 75,1%.

В исследовании выявлена отчетливая антимикробная активность нестероидного противовоспалительного препарата ибупрофена, по отношению к биопленкам *S. aureus* в концентрации 20 мкг/мл ингибирующий эффект составил 50,8%, при 40 мкг/мл и 80 мкг/мл – 76,7% и 72,3% соответственно.

Кроме того, экспериментально доказано наличие антибиопленочного действия комбинированного трехкомпонентного препарата в лекарственной форме вагинальных суппозиториях в отношении золотистого стафилококка и дрожжеподобных грибов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Tets V.V., Tets G.V. (2013) Mikrobnie bioplenkii problemi antibiotikoterapii [Microbial biofilms. Antibiotic therapy problems]. *Prakticheskaya pul'monologiya*, no 4, pp. 60–64.
2. Kuz'mich R.G., Makarova E.S., Tonko O.V. (2017) Bioplenka mikroorganizmov kak faktor formirovaniya rezistentnosti k antibiotikam [The biofilm of microorganisms as a factor in the formation of antibiotic resistance]. *Uchenie zapiski UO VGAVM*, no 2, pp. 76–80.
3. Shebotar' I.V., Mayanskii A.N., Konchakova E.D. (2012) Antibiotikorezistentnost' bioplyonochnih bakterii [Antibiotic resistance of biofilm bacteria]. *Klin. mikrobiol. antimikrob. himioter.*, no 1, pp. 51–58.
4. Gostev V.V., Sidorenko S.V. (2010) Bakterial'nie bioplenki i infektsii [Bacterial biofilms and infections]. *Zhurnal infektologii*, vol. 2, no 3, pp. 4–15.

5. Eroshenko D.V. (2015) *Vliyanie faktorov vneshnei sredi na pervie etapi obrazovaniya bioplenok bakteriyami Staphylococcus epidermidis: dis. kand. biol. nauk: 03.02.03* [Influence of environmental factors on the first stages of the formation of biofilms of bacteria *Staphylococcus epidermidis*: the dissertation of the candidate of biological sciences: 03.02.03]. Perm', 137 p.
6. Tihomirov A.L., Kazenashev V.V., Sarsaniya S.I., Tuskaev K.S. (2017) Prebioticheskaya korektsiya pri bakterial'nom vaginoze [Prebiotic correction for bacterial vaginosis]. *Meditsinskii sovet*, no 2, pp. 66–68.
7. Semina N.A., Sidorenko S.V., Rezvan S.P. (2004) Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nim preparatam: Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.1890-04 [Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs: methodological guidelines MG 4.2. 1890-04]. *Klin. mikrobiol. i antimikrob. Himioterap.*, vol. 6, no 4, pp. 306–359.
8. Vrinchanu N.O., Burmaka O.V., Dronova M.L., Dudikova D.M., Suvorova Z. (2016) *Vivchennya spetsifichnoi aktivnosti antifungal'nih likars'kih zasobiv (metodichni rekomendatsii)* [Study of specific activity of antifungal drugs (the guideline)]. S. Kiiv: MOZ Ukraini, DP "Derzhavni ekspertinii tsentr MOZ Ukraini", 75 p. (in Ukrainian)
9. O'Toole G.A. (1999) Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in enzymology*, vol. 310, pp. 91–109.
10. (2015) *Derzhavna Farmakopeya Ukraini 2-e vid.* [State Pharmacopoeia of Ukraine, second edition] Harkiv: Derzhavne pidpriemstvo "Ukrains'kii naukovii farmakopeinii tsentr yakosti likars'kih zasobiv", vol. 1, 1128 p. (in Ukrainian)
11. Halafyan A.A. (2007) *Statistica 6. Statisticheskii analiz danih* [Statistica 6. Statistical data analysis]. M.: Binom-Press, 512 p. (in Russian)
12. Richard J. Gillis., Barbara H. Iglewski (2004) Azithromycin retards *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J. Clin Microbiol.*, no 12, pp. 5842–5845.
13. Obad J., Šušković J., Kos B. (2015) Antimicrobial activity of ibuprofen: new perspectives on an "Old" non-antibiotic drug. *Eur J. Pharm Sci.*, vol. 71, pp. 93–98.
14. Rešliński A., Dąbrowiecki S., Głowacka K. (2015) The impact of diclofenac and ibuprofen on biofilm formation on the surface of polypropylene mesh. *Hernia*, vol. 19, no 2, pp. 179–185.