

Биопленочные инфекции между Сциллой и Харибдой: взаимодействие между антимикробными пептидами хозяина и антибиотиками

Эта статья опубликована в журнале Dove Press
«Инфекции и резистентность к лекарственным препаратам»

Сергей Черныш*,
Наталья Гордя*,
Дмитрий Тулин,
Андрей Яковлев

Лаборатория биофармакологии
и иммунологии насекомых,
биологический факультет
Санкт-Петербургского государственного
университета, Санкт-Петербург, Россия

*Эти авторы внесли равный вклад
в данную работу

Цель: Целью настоящего исследования является повышение активности антибиотиков против биопленок. Мы выдвинули гипотезу, что для этой цели можно использовать комплекс антимикробных пептидов (АМП) иммунной системы хозяина, и проверили это предположение на моделях биопленок.

Методы: Из гемолимфы зараженных бактериями личинок красноголовой синей падальницы *Calliphora vicina* был выделен FLIP7 — комплекс АМП, содержащий комбинацию дефензинов, цекропинов, диптерицинов и пролин-богатых пептидов. Было изучено его комплексное взаимодействие с антибиотиками различных классов в биопленках и планктонных культурах *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii* методом «шахматной доски» с проведением анализа жизнеспособности клеток с триметилтетразолий-хлоридом и анализа эрадикации биопленки с окрашиванием кристаллическим фиолетовым и последующим микроскопированием.

Результаты: Мы обнаружили, что FLIP7 демонстрирует: высокий уровень синергизма (индекс фракционной ингибирующей концентрации <0,25) с меропенемом, амикацином, канамицином, ампициллином, ванкомицином и цефотаксимом; синергизм с клиндамицином, эритромицином и хлорамфениколом; аддитивное действие с оксациллином, тетрациклином, цiproфлоксацином и гентамицином; отсутствие взаимодействия с полимиксином В. Взаимодействие в планктонных клеточных моделях было существенно слабее, чем в биопленках тех же штаммов. Анализ кривых «доза — эффект» свидетельствовал о том, что персистентные клетки, вероятно, являются мишенью синергетического воздействия FLIP7. Анализ эрадикации биопленки показал, что это воздействие также вызвало полное разрушение биопленочного материала *S. aureus* и *E. coli*. Это воздействие позволяло снизить эффективную концентрацию антибиотика для устранения биопленки до уровня, гораздо низшего, чем клинически достижимый (в случае меропенема, ампициллина, цефотаксима и оксациллина — на 2—3 порядка).

Выводы: FLIP7 представляет собой высокоэффективную антимикробную систему хозяина, которая помогает антибиотикам справиться с биопленочным барьером за счет сенсбилизации персистеров и разрушения материала биопленки. Он перспективен для лечения биопленочных инфекций как синергист различных низкомолекулярных антибиотиков.

Ключевые слова: антимикробные пептиды насекомых, антибиотики, синергия, биопленки, персистеры, *Calliphora vicina*

Введение

Большинство бактерий для выживания в организме хозяина образуют биопленки. Эти биопленки представляют собой фиксированные многоклеточные сообщества, заключенные в полимерный матрикс. Биопленки вызывают более 80% микробных инфекций, служащих причиной появления незаживающих ран, язв и повреждений кожи, слизистых оболочек и внутренних органов.¹ Все больший массив данных также свидетельствует о важной роли биопленок в возникновении болезней, которые обычно не считаются инфекционными, таких как онкологические^{2–4} и сердечно-сосудистые^{5,6} заболевания. Более того, биопленки, которые образуются на поверхности катетеров, имплантов и других медицинских

Корреспонденцию направлять по
адресу: Сергею Чернышу, Лаборатория
биофармакологии и иммунологии
насекомых, биологический факультет
Санкт-Петербургского государственного
университета, ул. Ботаническая, 17,
Санкт-Петербург, 198504 Россия.
Тел. +7 921 958 5235
Факс +7 812 428 9076
e-mail: sichernysh1951@gmail.com

устройств, в значительной степени влияют на заболеваемость и экономический ущерб, вызываемый бактериальными инфекциями.⁷ Переход планктонных бактерий в биопленки обеспечивает микроорганизмам многофакторную защиту от иммунной системы хозяина и позволяет им находиться в организме неограниченное время.^{8,9} Еще один клинически важный фактор биопленочных инфекций — повышение резистентности к антибиотикам и антисептикам.^{10–11} Растущее число антибиотикорезистентных штаммов еще больше усложняет задачу лечения биопленок. Таким образом, поиск новых способов лечения биопленочных инфекций является одной из значимых составляющих прогресса в области здравоохранения.

За последние тридцать лет внимание привлекли антимикробные пептиды (АМП) животных как многообещающая основа для разработки новых антибактериальных средств. У животных, растений, грибов и микроорганизмов было выявлено более 2600 последовательностей АМП, токсичных для планктонных бактерий.¹⁵ Гораздо меньше известно об антибиотических АМП, хотя некоторые из них проявляют высокую активность в отношении бактериальных биопленок, действуя против клеток и/или разрушая матрикс.^{16–19} При помощи метода «шахматной доски» удалось выявить двухкомпонентные комбинации АМП — АМП^{20,21} и АМП — антибиотик^{17,19,22} с синергетическим действием против биопленок. Однако дальнейший прогресс в разработке таких комбинаций сопряжен с существенными техническими сложностями, поскольку следует оценивать не только тип взаимодействия (синергизм, аддитивное действие, антагонизм), но и другие параметры, такие как спектр антимикробного действия, токсичность, скорость развития резистентности и т. д. С этой точки зрения поиск комбинаций, состоящих из трех и более компонентов, кажется практически неразрешимой задачей.

В то же время в иммунных системах многоклеточных животных для выживания организма хозяина используются многокомпонентные системы АМП, оптимизированные путем естественного отбора по всем параметрам. Хотя идея использования природных комплексов АМП в качестве основы для разработки антимикробных средств кажется привлекательной с различных точек зрения, ей до сих пор не уделяли должного внимания. Лишь недавно основные преимущества этого подхода получили экспериментальное подтверждение. В частности, в экспериментальных эволюционных исследованиях было показано, что, в отличие от традиционных антибиотиков, ни у одного из исследованных видов грамотрицательных бактерий не сформировалась резистентность к комплексам АМП хозяина — падальницы *Calliphora vicina* и других мух семейства Calliphoridae.²³ Еще одно исследование показало, что комплекс *C. vicina*, содержащий сочетание четырех семейств АМП (дефензины, цекропины, диптерицины и пролин-богатые пептиды), активен в отношении не только планктонных бактерий, но и их биопленок.²⁴ Таким образом, комплекс природных

АМП превосходит традиционные антибиотики как минимум по двум показателям: способности препятствовать развитию приобретенной резистентности и эффективности в отношении биопленок. Возникает вопрос, возможно ли скомбинировать преимущества комплексов АМП хозяина и антибиотиков, тем самым положив начало наиболее эффективному подходу к лечению биопленочных инфекций.

В настоящем исследовании мы пытались найти ответ на этот вопрос, изучив взаимодействие комплекса АМП *C. vicina*, также называемого FLIP7 (Fly Larvae Immune Peptides — иммунопептиды личинок мухи), и антибиотиков основных классов при помощи метода «шахматной доски» и моделей биопленок *in vitro*, сформированных клинически релевантными патогенами *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*.

Материалы и методы

Комплекс АМП *C. vicina*

Образец FLIP7 был выделен из гемолимфы личинок красноголовой синей падальницы *C. vicina* на стадии диапаузы. Личинки были заражены штаммом M17 *E. coli* («Микроген», Москва, Россия) с целью вызвать иммунный ответ и оставлены на ночь при температуре 25 °C. Гемолимфу собирали в охлажденные на льду пробирки через прокол кутикулы, замораживали и хранили при –70 °C до использования. Размороженную гемолимфу подкисляли 0,1% трифторуксусной кислотой (ТФУ) до конечной концентрации 0,05%, а нерастворенные частицы удаляли путем центрифугирования (30 минут при 8000 G при 4 °C). Супернатант наносили на картриджи с обращенной фазой Sep-Pak C18 (Waters Corporation, Милфорд, штат Массачусетс, США) после стабилизации 0,05% ТФУ из расчета 5 мл/г сорбента. Соединения с высокой степенью гидрофильности удаляли путем промывания картриджа 0,05% ТФУ. Сорбированные на картридже соединения элюировали 50% раствором ацетонитрила, подкисленным 0,05% ТФУ, лиофилизировали на вакуумной сушилке FreeZone (Labconco, Канзас-Сити, штат Миссури, США) и хранили при –70 °C. Перед использованием лиофилизированный образец растворяли в деионизированной воде (50 мг/мл), стерилизовали фильтрованием через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Milliex-GS; Merck Millipore, Биллерика, штат Массачусетс, США) и замораживали при температуре –70 °C.

Образец, использованный в настоящей работе, был подробно охарактеризован в нашей предыдущей статье при помощи сочетания методов жидкой хроматографии / масс-спектрометрии и метода транскриптома.²⁴ Было расшифровано десять пептидов насекомых из четырех семейств АМП (дефензины, цекропины, диптерицины и пролин-богатые пептиды), при этом некоторые дополнительно выявленные в комплексе АМП описаны не были. В базе данных мРНК, изолированных из зараженных бактериями личинок *C. vicina*, которая доступна по адресу

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX2523753> (номер заявки SRR5210297), прогнозируется наличие дополнительных изоформ АМП, особенно разнообразных в семействе диптерицинов.

Антибиотики

В опытах были использованы следующие лекарственные средства серийного производства: аминогликозиды — амикацина сульфат («Синтез», Курган, Россия), канамицина сульфат («Синтез») и гентамицина сульфат (AppliChem, Дармштадт, Германия), пенициллин естественного происхождения оксациллин натрия («Синтез»), аминопенициллин ампициллин натрия («Синтез»), карбапенем меропенема тригидрат (AstraZeneca, Кембридж, Соединенное Королевство), цефалоспоринового поколения цефотаксим натрия («Аболмед», Москва, Россия), полипептид естественного происхождения полимиксина В сульфат (AppliChem), гликопептид ванкомицин («Красфарма», Красноярск, Россия), линкозамид клиндамицина сульфат (Nemopharm, Вршац, Сербия), макролид эритромицина фосфат («Синтез»), фторхинолон второго поколения ципрофлоксацина гидрохлорид (AppliChem), хлорамфеникола натрия сукцинат (AppliChem), тетрациклина гидрохлорид (AppliChem) и антисептик бензалкония хлорид (Fluka, Букс, Швейцария). Антибиотики растворяли в стерильной деионизированной воде в концентрации 10, 1 и 0,1 мг/мл, делили на аликвоты объемом по 0,05 мл и хранили при -70°C до использования. Хлорамфеникол и тетрациклин растворяли в 50% растворе этилового спирта в стерильной деионизированной воде.

Бактерии

В качестве модели бактерий, образующих биопленки, использовались штаммы *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27583, а также клинические штаммы *S. aureus* 203, *K. pneumoniae* 145 и *A. baumannii* 28. Состав генома *E. coli* ATCC 25922 и *P. aeruginosa* ATCC 27583 с комментариями доступен по ссылкам <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP009072> и <http://www.pseudomonas.com/strain/show/3104>, соответственно. Состав генома *A. baumannii* 28 доступен на странице https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_MAF00000000. Определение геномной последовательности штамма позволяет прогнозировать резистентность к аминогликозидам, бета-лактамам и хлорамфениколу. Клинический штамм *K. pneumoniae* 145 был получен из клиники хирургии Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова (Санкт-Петербург, Россия), а штаммы *A. baumannii* 28 и *S. aureus* 203 — из коллекции Северо-западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова и Института экспериментальной медицины (Санкт-Петербург, Россия), соответственно. Профили антибиотикорезистентности клинических штаммов определялись в соответствии с рекомендациями.⁴⁷ По результатам исследования диско-диффузионным методом штаммы классифицировали как чувствительные, умеренно резистентные или резистентные к тому или иному антибиотику. Для определения профиля резистентности *K. pneumoniae* 145 применялись следующие антибиотики: амикацин, амоксициллин / клавулановая кислота,

гентамицин, имипенем, меропенем, цефепим, цефоперазон, цефоперазон/сульбактам, цефотаксим, цефтазимид, ципрофлоксацин, пиперациллин / тазобактам и тигециклин (Oxoid Limited, Бейзингсток, Соединенное Королевство). Была выявлена резистентность штамма ко всем исследованным антибиотикам, кроме имипенема, меропенема и тигециклина. Исследования штамма *S. aureus* 203 показали его чувствительность ко всем использованным антибиотикам.

Образование биопленки

Приготовление суточных биопленок проводилось в соответствии с ранее описанной процедурой, что обеспечивало образование плотной биопленки штаммами, используемыми в опытах.²⁴ Образование биопленки подтверждалось окрашиванием суточной биопленки красителем кристаллический фиолетовый. Бактерии выращивались в 5 мл жидкой питательной среды LB (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс, США) в течение 18—20 часов при 37°C . После инкубации в течение ночи культуры разводили до 5×10^5 КОЕ/мл с измерением по оптической плотности (ОП). В каждую лунку 96-луночного плоскостонного планшета из полистирола (Sarstedt AG & Co., Нюмбрехт, Германия) инокулировали аликвоты разведенной бактериальной суспензии объемом по 100 мкл и инкубировали во влажной камере в течение 24 часов при 37°C . Отрицательным контролем служила жидкая питательная среда LB.

Тест на уничтожение клеток с ТТХ

Для оценки воздействия антимикробных агентов на жизнеспособность бактерий биопленки использовали стандартный тест с триметилтетразолий-хлоридом (ТТХ), аналогичный описанному ранее.²⁴ Суточные биопленки, образовавшиеся в 96-луночном микротитровальном планшете для культур клеток, трижды промывали 200 мкл стерильного забуференного физиологического раствора (PBS) для удаления неприкрепившихся бактерий, а затем высушивали на воздухе. В каждую лунку добавляли антимикробный препарат, растворенный в 100 мкл жидкой питательной среды LB (Thermo Fisher Scientific), после чего планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37°C во влажной камере. Затем добавляли 11 мкл 0,2% ТТХ («Ленреактив», Санкт-Петербург, Россия) до конечной концентрации 0,02%. После инкубирования при 37°C в течение 1 часа измерялась OD_{540} на автоматическом фотометре для микропланшет Epoch (BioTek Instruments, Винуски, штат Вермонт, США). Среднее значение OD_{540} для клеток 48-часовых биопленок без обработки антимикробным препаратом применяли в качестве контроля. Каждый опыт проводился в виде двух независимых анализов. Минимальная концентрация, подавляющая образование биопленки (МВІС), определялась как МВІС₉₀ — концентрация, уменьшающая окрашивание при помощи ТТХ на 90% по сравнению с контролем.

Тест на эрадикацию биопленки с кристаллическим фиолетовым

Использовался стандартный тест на эрадикацию биопленки с кристаллическим фиолетовым с небольшими модификациями,

как описано ранее.²⁴ Этот метод позволяет определить общее количество биопленочного материала, связавшегося с красителем, включая внеклеточные и клеточные компоненты. Суточные биопленки, образовавшиеся в 96-луночном микротитровальном планшете для культур клеток, трижды промывали 200 мкл стерильного раствора PBS, а затем высушивали на воздухе. В каждую лунку добавляли по 100 мкл антимикробного состава, растворенного в жидкой питательной среде LB (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния, США), после чего планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37 °С. Затем отработанную среду удаляли, а планшеты трижды промывали 200 мкл раствора PBS, высушивали на воздухе и окрашивали 0,1% раствором кристаллического фиолетового в воде («Ленреактив», Санкт-Петербург, Россия) в течение ровно 2 минут. Окрашенные биопленки трижды промывали 200 мкл раствора PBS, высушивали на воздухе и растворяли в 200 мкл 95% этилового спирта в течение 1 часа. Затем количество связанного с биопленкой красителя измеряли при OD₅₇₀ с помощью фотометра Epoch (BioTek Instruments). Каждый опыт проводился в виде двух независимых анализов. Минимальная эрадикационная концентрация для биопленки определялась как МВЕС₉₀ — концентрация антимикробного препарата, уменьшающая связывание кристаллического фиолетового в образовавшихся биопленках на 90% по сравнению с контролем, который не был обработан антимикробным препаратом.

Оценка жизнеспособности планктонных клеток

Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) для планктонных клеток использовался стандартный метод микроразведений в соответствии с рекомендациями.⁴⁸ Первичный инокулят выращивался на твердой питательной среде — агаре LB (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния, США). Отдельные колонии собирали, переносили в жидкую среду (основа бульон Луриа, 25 г/л) и инкубировали в течение ночи при 37 °С. В отдельные лунки 96-луночного культурального планшета (Sarstedt, Ньютон, штат Северная Каролина, США), содержащие по 100 мкл жидкой питательной среды LB (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния, США) с удваивающимися разведениями антимикробных препаратов инокулировали примерно по 5 × 10⁵ КОЕ/мл исследуемых бактерий. Микротитровальные планшеты инкубировали в течение 20 часов при 37 °С. Жизнеспособность клеток определялась методом с ТТХ, как описано выше. МИК оценивали по МИК₉₀ — концентрации, уменьшающей окрашивание ТТХ на 90% по сравнению с контролем, который не был обработан антимикробным препаратом.

Комплекс АМП и исследования взаимодействия с антибиотиками

Для определения типа и количественных характеристик взаимодействия между комплексом АМП *S. vicina* и антибиотиками различных классов использовалось титрование методом «шахматной доски» с некоторыми модификациями.²⁴

Суточные биопленки, образовавшиеся в 96-луночном микротитровальном планшете для культур клеток, трижды промывали 200 мкл стерильного PBS, а затем высушивали на воздухе. В другом 96-луночном планшете были подготовлены комбинации FLIP7 и антибиотиков таким образом, чтобы в горизонтальных рядах лунок располагались двукратные разведения FLIP7, а в вертикальных рядах — двукратные разведения антибиотиков. Затем по 100 мкл содержимого каждой лунки этого микропланшета переносили в микропланшет с биопленкой и инкубировали в течение 24 часов при 37 °С. Состояние биопленки оценивали с помощью методов с ТТХ и кристаллическим фиолетовым, как описано выше. Каждый эксперимент проводился в виде двух независимых параллельных опытов. В опытах с планктонными культурами разведения FLIP7 и антибиотика объединяли по 25 мкл в лунках микропланшета в соответствии со схемой, и в каждую лунку добавляли по 50 мкл бактериальной суспензии с концентрацией клеток 10⁶ КОЕ/мл. Микропланшет инкубировали в течение 24 часов при 37 °С, а затем содержимое лунок окрашивали ТТХ, как описано выше.

Воздействие комбинаций изучали путем определения индекса фракционной ингибирующей концентрации для каждой комбинации (иФИК) по следующей формуле: [(МИК препарата А в комбинации) / (МИК препарата А при применении отдельно)] + [(МИК препарата В в комбинации) / (МИК препарата В при применении отдельно)]. В тестах с ТТХ и кристаллическим фиолетовым вместо МИК применялись показатели МВЕС₉₀ и МВЕС₉₀. Комбинация считалась синергетической при иФИК менее 0,5, нейтральной при ФПК 0,50—4.0 и антагонистической при иФИК более 4. Соотношение МВЕС₉₀ биопленки и МИК₉₀ планктонной культуры, определенное в анализе на жизнеспособность клеток с ТТХ использовалось в качестве количественной характеристики связанной с биопленками резистентности (BRR).

Микроскопирование биопленок

Каждый из 6-луночных микротитровальных планшетов для культуры клеток (Falcon; Becton Dickinson Labware, Франклин-Лейкс, штат Нью-Джерси, США) покрывали покровным стеклом размером 24 × 24 мм (Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Брауншвейг, Германия). В лунки вносили по 2,8 мл суспензии *S. aureus* 203, приготовленной как указано в разделе «Образование биопленки», и планшеты инкубировались в течение 24 часов при 37 °С. Затем суточные биопленки трижды промывали 3 мл стерильного PBS для удаления неприкрепившихся клеток, и заливали свежую питательную среду (контроль) или среду с добавлением FLIP7, меропенема или комбинации обоих препаратов. Планшеты инкубировали в течение еще 24 часов при 37 °С, затем снимали покровные стекла с планшетов, промывали в PBS, помещали вверх дном на предметное стекло и делали фотографии через микроскоп Leica DMI 2500 (Leica Microsystems, Вецлар, Германия) с использованием оптики Номарского с увеличением × 400 и × 1000.

Статистические методы

Статистическая обработка данных проводилась при помощи программного обеспечения Primer of Biostatistics, версия 4.03. Статистическая достоверность различий определялась при помощи дисперсионного анализа и z-критерия, результаты считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Количественное описание профилей BRR

Для анализа резистентности моделей биопленок к антибиотикам использовалось соотношение $MBIC_{90}$ биопленки и $МИК_{90}$ планктонных клеток как количественная характеристика, здесь называемая BRR. Полученные значения BRR (Таблица 1) показывают, что бактерии в форме биопленки обладают повышенной резистентностью к большинству исследованных антибиотиков по сравнению с планктонными клетками того же штамма. Однако уровень BRR колеблется в широких пределах в

зависимости от типа антибиотика и типа бактерий. Максимальное увеличение BRR было зарегистрировано для *S. aureus*, особенно к меропенему (более чем в 2 000 раз), ампициллину, амикацину и канамицину. Существенное увеличение BRR также отмечалось к ванкомицину, бензалкония хлориду и эритромицину (в 10—84 раз). Резистентность к оксациллину и хлорамфениколу лишь слегка превышала уровень резистентности планктонных клеток (в 1,25—2,4 раза).

Биопленки *E. coli* продемонстрировали наибольшее увеличение резистентности к меропенему (в 125 раз) и менее существенное — к цефотаксиму и полимиксину В (в 21—31 раз), тогда как резистентность к ципрофлоксацину, тетрациклину, гентамицину и хлорамфениколу лишь немного отличалась от уровня планктонных клеток.

Резистентность к меропенему также была изучена для *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *K. pneumoniae*. Биопленки *P. aeruginosa* и *A. baumannii* показали среднее увеличение резистентности в 11—20 раз, тогда как у *K. pneumoniae* резистентность выросла в 703 раза.

Таблица 1 Связанная с биопленками резистентность и взаимодействие FLIP7 с антибиотиком в биопленках (анализ ТТХ)

Штамм/антибиотик	Количественная оценка BRR ¹			Взаимодействие FLIP7 и антибиотика в биопленках			
	$МИК_{90}$ (мкг/мл) планктонных клеток (мкг/мл)	$MBIC_{90}$ биопленки (мкг/мл)	BRR ¹	иФИК	Тип взаимодействия	$MBIC_{90}$ антибиотика в присутствии FLIP7 (мкг/мл) ²	Кратность снижения концентрации ³
<i>Staphylococcus aureus</i>							
Меропенем	0,02 ± 0,02	>50	>2000	0,168	син.	<0,1	>500
Амикацин	1,88 ± 0,00	>500	>266	0,087	син.	1,5 ± 0,0	>333
Канамицин	3,51 ± 1,17	>500	>142	0,107	син.	3,0 ± 0,0	>168
Ампициллин	0,03 ± 0,01	19,5 ± 3,94	650	<0,208	син.	<1,0	>24
Ванкомицин	0,41 ± 0,19	34,4 ± 15,6 ⁴	83,9	0,165	син.	1,5 ± 0,9	22,9
Бензалкония хлорид	0,30 ± 0,00	12,0 ± 0,00	40	0,749	адд.	2,25 ± 0,75	5,3
Клиндамицин	75,0 ± 0,0	>250	>3	0,355	син.	10,0 ± 2,0	>25
Эритромицин	0,94 ± 0,00	9,4 ± 0,00	10	0,422	син.	0,45 ± 0,15	20,9
Оксациллин	0,05 ± 0,00	0,12 ± 0,00	2,4	0,583	адд.	0,01 ± 0,003	9,2
Тетрациклин	0,12 ± 0,00	0,15 ± 0,00	1,25	<0,749	адд.	<0,10	>1,5
Хлорамфеникол	4,70 ± 0,00	5,0 ± 0,00	1,1	0,417	син.	1,0 ± 0,5	5,0
<i>Escherichia coli</i>							
Меропенем	0,03 ± 0,00	3,75 ± 0,00	125	0,297	син.	<0,02	>188
Цефотаксим	0,09 ± 0,00	2,81 ± 0,94	31,2	0,179	син.	0,07 ± 0,01	40
Полмиксин В	0,34 ± 0,11	7,03 ± 2,34	20,7	1,042	ОВ	9,4 ± 0,0	0,75
Ципрофлоксацин	0,03 ± 0,00	0,06 ± 0,00	2	0,542	адд.	<0,02	>3
Тетрациклин	0,46 ± 0,00	0,9 ± 0,30	1,9	0,708	адд.	0,15 ± 0,0	6
Гентамицин	4,70 ± 0,00	6,25 ± 3,13	1,3	0,794	адд.	0,6 ± 0,0	10,4
Хлорамфеникол	4,69 ± 0,00	3,0 ± 0,00	0,6	0,667	адд.	1,50	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
Меропенем	0,94 ± 0,31	10,9 ± 1,6	11,6	0,407	син.	2,4 ± 0,0	4,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>							
Меропенем	0,01 ± 0,00	7,03 ± 2,34	703	0,583	адд.	0,25 ± 0,05	28,1
<i>Acinetobacter baumannii</i>							
Меропенем	0,88 ± 0,13	9,4 ± 0,0	10,7	0,370	син.	1,2 ± 0,0	7,8

Примечания: ¹Связанная с биопленками резистентность определялась как отношение $MBIC_{90}$ антибиотика к $МИК_{90}$ планктонных клеток.

² $MBIC_{90}$ антибиотика в комбинации с концентрацией FLIP7, вызывающей наибольшее снижение концентрации.

³Соотношение $MBIC_{90}$ антибиотика при отсутствии и в присутствии концентрации FLIP7, вызывающей наибольшее снижение концентрации антибиотика.

⁴Различие с $МИК_{90}$ планктонной культуры было статистически недостоверным ($P = 0,161$). Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка.

Сокращения: ТТХ — триметилтетразолий-хлорид; BRR — связанная с биопленкой резистентность; МИК — минимальная ингибирующая концентрация; $MBIC$ — минимальная концентрация, подавляющая образование биопленки; иФИК — индекс фракционной ингибирующей концентрации; син. — синергизм; адд. — аддитивное действие; ОВ — отсутствие взаимодействия.

Таким образом, на моделях биопленок было показано повышение резистентности по сравнению с планктонными клетками того же штамма, однако уровень резистентности отдельных антибиотиков сильно колебался. Максимальное увеличение BRR было обнаружено для меропенема, который в то же время был очень эффективен в отношении планктонных клеток.

Взаимодействие FLIP7 и антибиотиков (анализ на жизнеспособность клеток с ТТХ)

Для исследования взаимодействия FLIP7 и антибиотиков мы исследовали антимикробную активность 1 827 комбинаций с различными видами антибиотиков и концентрациями компонентов при помощи стандартного метода «шахматной доски». Результаты теста приведены в Таблице 1 (столбцы 5—8). Значения иФИК биопленки *S. aureus* показали высокую степень синергизма (иФИК <0,25) FLIP7 с меропенемом, амикацином, канамицином, ампициллином и ванкомицином. Все эти антибиотики также отличались высокой степенью BRR. В то же время антибиотики с низким уровнем BRR и антисептик бензалкония хлорид показали гораздо более высокие значения иФИК и, соответственно, меньшее взаимодействие с FLIP7.

У *E. coli* наибольший синергизм был обнаружен для меропенема и цефотаксима, где были показаны максимальные уровни BRR, тогда как антибиотики с низкой BRR показали отсутствие синергизма. На фоне других антимикробных препаратов полимиксин В выделялся очевидным ростом BRR и отсутствием взаимодействия с FLIP7. Синергизм меропенема и FLIP7 также был существенным в экспериментах с биопленками *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, хотя у *K. pneumoniae* они взаимодействовали на уровне аддитивности.

Кратность снижения концентрации антибиотика в присутствии эффективной концентрации FLIP7 (столбец 8 Таблицы 1) является еще одной важной характеристикой антимикробного взаимодействия. Наибольшая кратность снижения концентрации отмечалась у биопленки *S. aureus* при обработке меропенемом, амикацином или канамицином (более чем в 142—500 раз). Кратность снижения концентрации других антибиотиков и антисептика бензалкония хлорида колебалась от 5 до более чем 25 раз. У *E. coli* меропенем показал наибольшую кратность снижения концентрации (более чем в 188 раз). Снижение МВІС₉₀ других антибиотиков также было достоверным, за исключением полимиксина В. Использование FLIP7 также позволило снизить эффективную концентрацию меропенема для *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *A. baumannii*, хотя и не столь существенно, как для *S. aureus* и *E. coli*.

Параллельно с экспериментами на биопленках взаимодействие FLIP7 и антибиотиков изучалось на планктонных культурах тех же штаммов (Таблица 2). В целом взаимодействие FLIP7 и антибиотиков в планктонных культурах было существенно слабее, чем в биопленках, и в основном носило аддитивный характер. Уменьшение взаимодействия было особенно заметно

у антибиотиков с высокой BRR. При анализе кратности снижения концентрации была выявлена сходная тенденция с некоторыми исключениями. Так, у полимиксина В не было выявлено взаимодействия с FLIP7 в биопленке *E. coli*, тогда как в планктонной культуре взаимодействие было явно выражено. Более существенная кратность снижения концентрации в культуре планктонных клеток *E. coli* по сравнению с биопленками была также отмечена для тетрациклина и хлорамфеникола. Для *A. baumannii* была выявлена сходная степень синергизма в пленочном и планктонном состоянии и даже более высокая кратность снижения концентрации у планктонных клеток.

Кривые «доза — эффект» отражают еще одну важную характеристику взаимодействия FLIP7 и антибиотиков: способность уничтожать нечувствительные к антибиотикам клетки-персистеры, которая была особенно выражена в биопленках *S. aureus* (Рисунок 1). Меропенем вызывал дозозависимое снижение выживаемости клеток в диапазоне концентрации от 0,1 до 0,8 мкг/мл, дальнейшее же повышение концентрации не приводило к снижению выживаемости. В соответствии с общепринятым пониманием,²⁶ это свидетельствует о наличии в популяции нечувствительных к антибиотикам персистентных клеток. При применении комбинации меропенема с эффективной концентрацией FLIP7 метаболически активные клетки были полностью уничтожены (или их количество сокращалось до неопределяемого уровня), начиная с концентрации 0,1 мкг/мл. Тот же эффект наблюдался в экспериментах с другими антибиотиками с высоким уровнем BRR: амикацином, ампициллином и канамицином. При использовании антибиотиков с низкой или нулевой BRR (оксациллином, хлорамфениколом), персистентные бактерии в биопленке обнаружены не были. Для антибиотиков со средним уровнем BRR (10—84 раз) было выявлено наличие в популяции клеток с умеренной резистентностью к ванкомицину, бензалкония хлориду и эритромицину (данные не показаны). Кривые «доза — эффект» антибиотиков с высокой BRR меропенема и цефотаксима для *E. coli* также свидетельствовали о наличии персистентных клеток, которые уничтожались комбинацией антибиотиков с FLIP7, тогда как на соответствующих кривых антибиотиков с низкой BRR ципрофлоксацина и хлорамфеникола персистентных клеток обнаружено не было (Рисунок 2). Персистеры не были явно обнаружены в биопленках *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *A. baumannii* после обработки меропенемом (данные не показаны).

Взаимодействие FLIP7 и антибиотиков (тест на эрадикацию биопленки с окрашиванием кристаллическим фиолетовым)

Взаимодействие FLIP7 и антибиотиков также изучалось путем окрашивания биопленок кристаллическим фиолетовым (тест на эрадикацию биопленки). Всего было исследовано 862 комбинации, которые применялись в соответствии

Таблица 2 Взаимодействие FLIP7 и антибиотиков в планктонных клетках (анализ ТТХ)

Штамм/антибиотик	МИК ₉₀ антибиотика (мкг/мл)	МИК ₉₀ антибиотика в присутствии FLIP7 (мкг/мл) ¹	иФИК	Тип взаимодействия	Кратность снижения концентрации ²
<i>Staphylococcus aureus</i>					
Меропенем	0,02 ± 0,02	<0,002	0,667	адд.	>10
Амикацин	1,88 ± 0,00	0,36 ± 0,12	0,833	адд.	5,2
Канамицин	3,51 ± 1,17	<0,1	0,527	адд.	>35,1
Ампициллин	0,03 ± 0,01	0,007 ± 0,001	0,542	адд.	4,3
Ванкомицин	0,41 ± 0,19	0,12 ± 0,00	0,589	адд.	3,4
Бензалкония хлорид	0,30 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,750	адд.	2,0
Клиндамицин	75,0 ± 0,0	4,70 ± 0,00	0,729	адд.	15,9
Эритромицин	0,94 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,589	адд.	31,3
Оксациллин	0,05 ± 0,00	0,014 ± 0,002	1,042	ОВ	3,6
Хлорамфеникол	4,70 ± 0,00	0,60 ± 0,00	0,418	син.	7,8
<i>Escherichia coli</i>					
Меропенем	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	1,085	ОВ	1,0
Цефотаксим	0,09 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,415	син.	4,5
Полимиксин В	0,34 ± 0,11	<0,02	0,339	син.	17,0
Ципрофлоксацин	0,03 ± 0,00	0,015 ± 0,00	0,666	адд.	2,0
Тетрациклин	0,46 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,729	адд.	15,3
Гентамицин	4,69 ± 0,00	3,53 ± 1,17	1,085	ОВ	1,3
Хлорамфеникол	4,69 ± 0,00	0,30 ± 0,00	0,670	адд.	15,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
Меропенем	0,94 ± 0,31	0,48 ± 0,00	0,516	адд.	2,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>					
Меропенем	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	1,042	ОВ	1,0
<i>Acinetobacter baumannii</i>					
Меропенем	0,88 ± 0,13	0,03 ± 0,01	0,393	Син.	29,3

Примечания: ¹МИК₉₀ антибиотика в комбинации с концентрацией FLIP7, вызывающей наибольшую кратность снижения концентрации антибиотика.

²Соотношение МИК₉₀ антибиотика при отсутствии и в присутствии концентрации FLIP7, вызывающей наибольшую кратность снижения концентрации антибиотика. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка.

Сокращения: ТТХ — триметилтетразолий-хлорид; МИК — минимальная ингибирующая концентрация; МВІС — минимальная концентрация, подавляющая образование биопленки; иФИК — индекс фракционной ингибирующей концентрации; син. — синергизм; адд. — аддитивное действие; ОВ — отсутствие взаимодействия.

со стандартным методом «шахматной доски». Анализ показателей иФИК и кратности снижения концентрации дал результаты, практически аналогичные полученным методом ТТХ (Таблица 3). В биопленке *S. aureus* комплекс FLIP7 показал высокий уровень синергизма и кратности снижения концентрации с меропенемом, амикацином и канамицином и более низкий уровень — в комбинации с хлорамфениколом. У *E. coli* взаимодействие с меропенемом и цефотаксимом носило синергетический характер, тогда как в комбинации с ципрофлоксацином эффект был лишь аддитивным. Синергизм с меропенемом также был обнаружен у *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, тогда как у *K. pneumoniae* взаимодействие носило лишь аддитивный характер.

Анализ кривых «доза — эффект» показал, что меропенем, амикацин и канамицин не способны разрушить материал биопленки *S. aureus*, хотя они почти полностью уничтожили этот материал в присутствии эффективной концентрации FLIP7 (Рисунок 3). В отличие от этих антибиотиков, хлорамфеникол эффективно разрушал биопленочный материал в концентрации 2 мкг/мл и выше. При этих условиях комбинации с FLIP7 повышали эффект антибиотика в диапазоне его низких концентраций. В

экспериментах с *E. coli* (Рисунок 4) были получены сходные результаты: FLIP7 значительно повышал ограниченную способность меропенема и цефотаксима разрушать материал биопленки и усиливал действие подпороговых концентраций ципрофлоксацина. Потенцирование эффекта меропенема также было явно выражено в биопленках *P. aeruginosa* и *A. baumannii* и в меньшей степени, но также достоверно — в *K. pneumoniae*.

Микроскопия биопленок

Кроме получения количественных данных при помощи тестов с ТТХ и кристаллическим фиолетовым, изменения в состоянии биопленки наблюдались на уровне световой микроскопии. В качестве модели была выбрана биопленка *S. aureus*, обработанная только меропенемом (0,2 мкг/мл) или меропенемом в той же концентрации и FLIP7 (125 мкг/мл). Были выбраны концентрации активных веществ с высокой степенью синергизма на основании результатов испытаний методом «шахматной доски», описанных выше. Данные тестов с ТТХ и кристаллическим фиолетовым показали, что эта комбинация вызывает полное подавление метаболической активности и разрешение биопленочного материала, соответственно. На основании этих данных ожидалось, что обработка биопленки

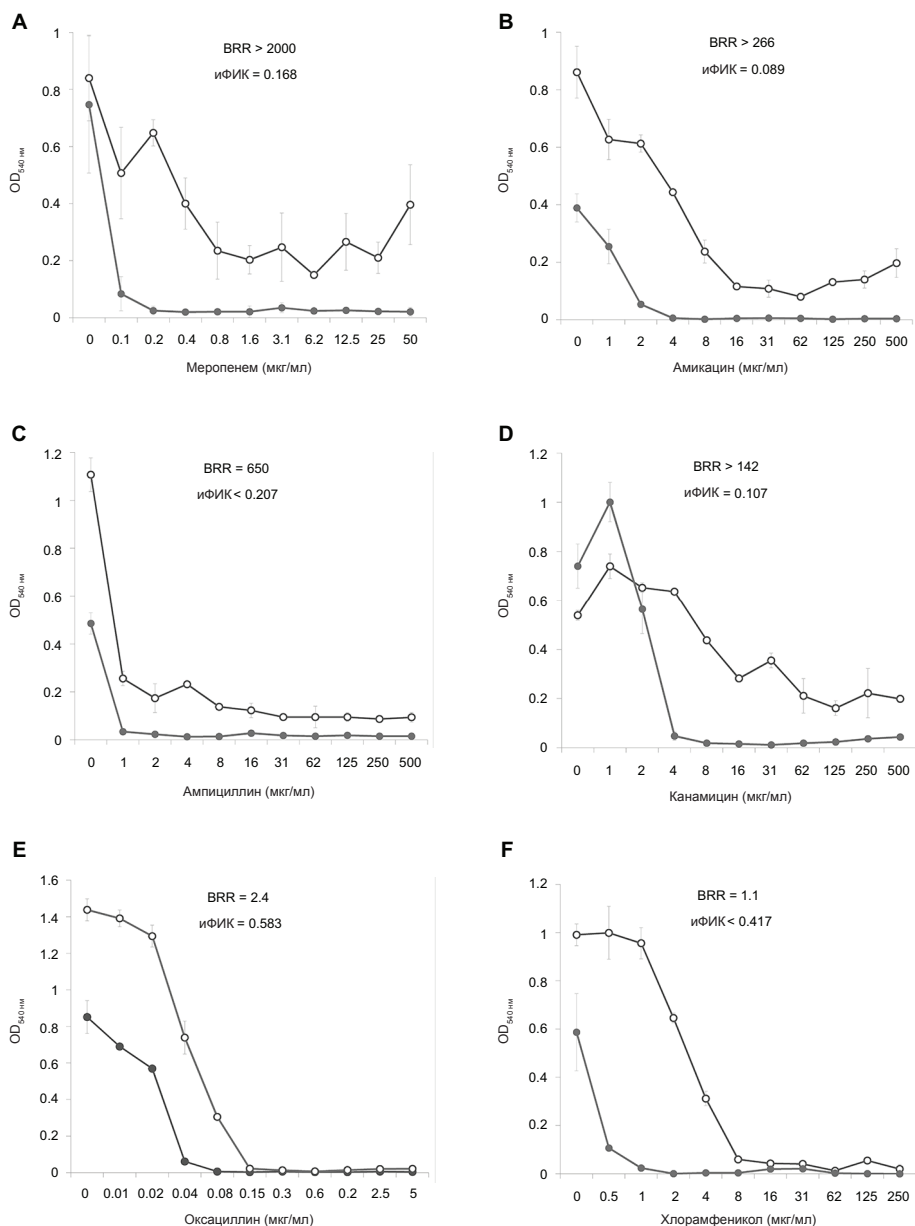


Рисунок 1 Кривые «доза — эффект» антибиотиков при использовании отдельно и в комбинации с FLIP7 против биопленки *Staphylococcus aureus* (метод с ТТХ).

Примечания: (A) Меропенем и меропенем + FLIP7 125 мкг/мл; (B) амикацин и амикацин + FLIP7 250 мкг/мл; (C) ампициллин и ампициллин + FLIP7 125 мкг/мл; (D) канамицин и канамицин + FLIP7 250 мкг/мл; (E) оксациллин и оксациллин + FLIP7 250 мкг/мл; (F) хлорамфеникол и хлорамфеникол + FLIP7 125 мкг/мл. Белые круги — антибиотик, черные — антибиотик + FLIP7; ось Y — оптическая плотность (среднее \pm среднеквадратическая ошибка). Эффективная концентрация FLIP7 определялась отдельно для каждого антибиотика на основании анализов методом «шахматной доски».

Сокращения: ТТХ — триметилтетразолий-хлорид; OD — оптическая плотность; BRR — связанная с биопленкой резистентность; иФИК — индекс фракционной ингибирующей концентрации.

комбинацией препаратов приведет к гибели живых клеток и разрушению биопленочного материала, что можно было бы наблюдать микроскопически. Результаты микроскопического анализа вполне соответствовали ожиданиям (Рисунок 5). В контрольном образце бактерии сформировали многослойную биопленку, прочно прикрепленную к поверхности стекла и состоящую из клеток правильной округлой формы без признаков повреждения. Обработка одним только меропенемом вызывала сильное истончение слоя клеток, представленного

преимущественно поврежденными клетками неправильной формы, хотя внешне нормальные клетки (предположительно персистеры) в биопленке также присутствовали. После обработки комбинацией препаратов на стекле оставалось лишь незначительное количество мертвых или явно поврежденных «призрачных» клеток. После такой обработки живых неповрежденных клеток не обнаруживалось. Таким образом, микроскопическое исследование давало независимое подтверждение результатов спектрофотометрического анализа.

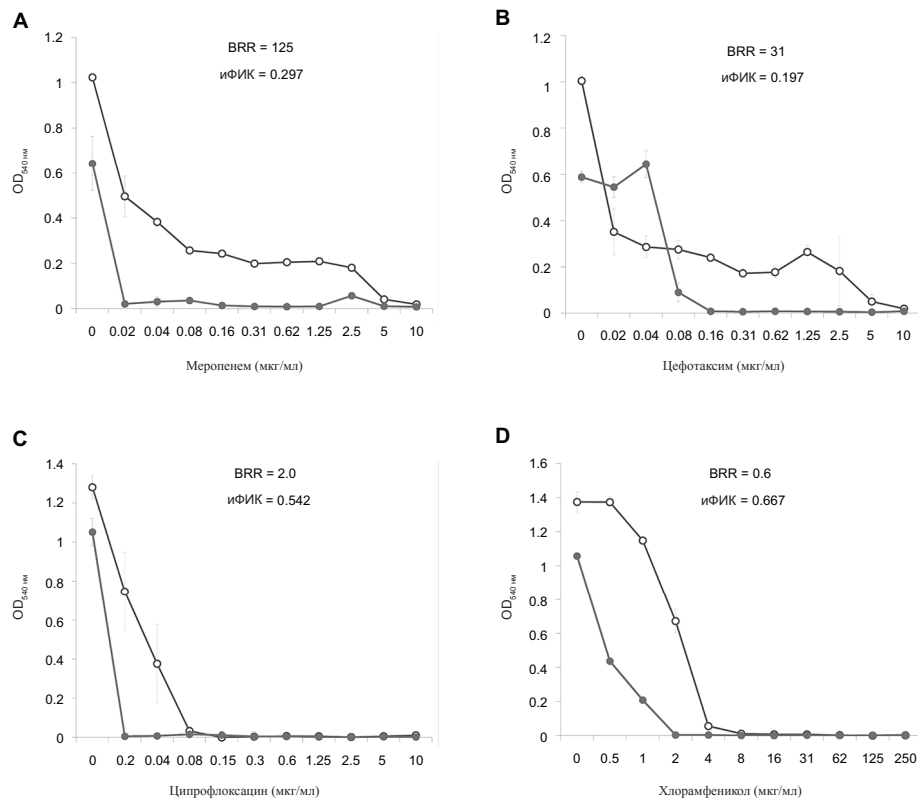


Рисунок 2 Кривые «доза — эффект» антибиотиков при использовании отдельно и в комбинации с FLIP7 против биопленки *Escherichia coli* (метод с ТТХ).

Примечания: (А) Меропенем и меропенем + FLIP7 500 мкг/мл; (В) цефотаксим и цефотаксим + FLIP7 500 мкг/мл; (С) ципрофлоксацин и ципрофлоксацин + FLIP7 500 мкг/мл; (D) хлорамфеникол и хлорамфеникол + FLIP7 250 мкг/мл.

Сокращения: ТТХ — триметилтетразолий-хлорид; OD — оптическая плотность; BRR — связанная с биопленкой резистентность; иФИК — индекс фракционной ингибирующей концентрации.

Таблица 3 Взаимодействие FLIP7 и антибиотиков в тесте на эрадикацию биопленки с окрашиванием кристаллическим фиолетовым

Штамм/антибиотик	иФИК	Тип взаимодействия	МВЕС ₉₀ антибиотика (мкг/мл)	МВЕС ₉₀ антибиотика в присутствии FLIP7 (мкг/мл) ¹	Кратность снижения концентрации ²
<i>Staphylococcus aureus</i>					
Меропенем	0,169	син.	>50	0,15 ± 0,0	>333
Амикацин	0,024	син.	>500	1,5 ± 0,0	>333
Канамицин	0,137	син.	>500	3,5 ± 0,5	>143
Хлорамфеникол	0,438	син.	3,0 ± 1,0	<0,5	>6
<i>Escherichia coli</i>					
Меропенем	0,349	син.	2,19 ± 0,31	0,03 ± 0,0	73
Цефотаксим	0,397	син.	1,56 ± 0,31	0,1 ± 0,02	16
Ципрофлоксацин	0,583	адд.	0,06 ± 0,0	<0,02	>3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
Меропенем	0,282	син.	9,4 ± 0,0	2,36 ± 0,0	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>					
Меропенем	0,624	адд.	6,25 ± 0,0	1,17 ± 0,0	5
<i>Acinetobacter baumannii</i>					
Меропенем	0,291	син.	9,4 ± 0,0	1,37 ± 0,19	7

Примечания: ¹МВЕС₉₀ антибиотика в комбинации с FLIP7, вызывающей наибольшее снижение концентрации антибиотика.

²Соотношение МВЕС₉₀ антибиотика при отсутствии и в присутствии концентрации FLIP7, вызывающей наибольшее снижение концентрации антибиотика. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка.

Сокращения: иФИК — индекс фракционной ингибирующей концентрации; МВЕС — минимальная эрадикационная концентрация для биопленки; син. — синергизм; адд. — аддитивное действие.

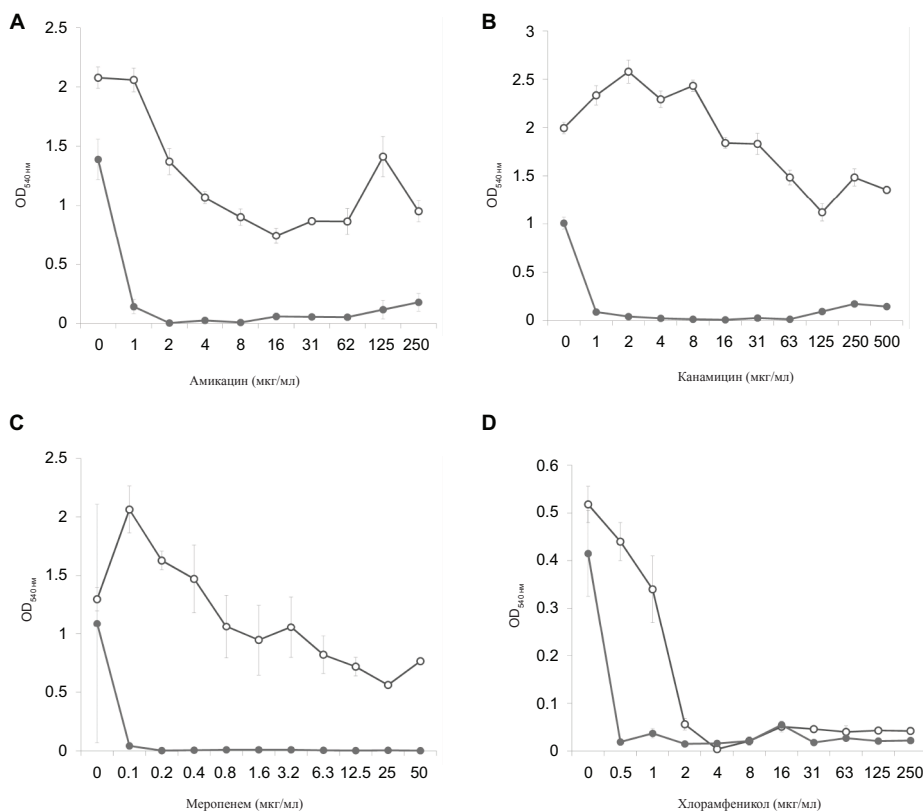


Рисунок 3 Кривые «доза — эффект» антибиотиков при использовании отдельно и в комбинации с FLIP7 против биопленки *Staphylococcus aureus* (метод с кристаллическим фиолетовым).

Примечания: (А) амикацин и амикацин + FLIP7 500 мкг/мл; (В) канамицин и канамицин + FLIP7 500 мкг/мл; (С) меропенем и меропенем + FLIP7 250 мкг/мл; (D) хлорамфеникол и хлорамфеникол + FLIP7 250 мкг/мл.

Белые круги — антибиотик, черные — антибиотик + FLIP7-

Сокращения: OD — оптическая плотность.

Обсуждение

Наряду с растущей распространенностью антибиотикорезистентных штаммов BRR представляет собой одну из основных проблем в борьбе с бактериальными инфекциями. На стадии разработки находятся различные подходы к лечению биопленочных инфекций, однако пока проблема остается нерешенной.^{14,15,27}

Изучая иммунитет насекомых, мы заметили, что насекомые реагируют на инфекцию одновременным синтезом не одного, а нескольких АМП. Особенно широкий спектр и высокая концентрация АМП были обнаружены в гемолимфе зараженных бактериями личинок красноголовой синей падальницы *C. vicina*. Комплекс АМП *C. vicina* содержит четыре семейства АМП: дефензины, цекропины, диптерицины и пролин-богатые пептиды.^{23,24} АМП со сходной структурой и функциями в различных комбинациях были обнаружены и у многих других насекомых.^{28,29} Дефензины представляют собой пептиды трехмерной структуры, содержащие элементы альфа-спираль и бета-слой, соединенные тремя дисульфидными мостиками и преимущественно проявляющие активность в отношении грамположительных бактерий путем разрушения / повышения проницаемости бактериальной клеточной стенки. Цекропины — это линейные амфипатические

альфа-спиральные пептиды, особенно активные против грамотрицательных бактерий и обладающие, как известно, каналообразующими и повышающими проницаемость клеточной мембраны свойствами. Диптерицины являются членами семейства глицин-богатых АМП, избирательно токсичных для некоторых грамотрицательных бактерий за счет разрушения клеточной стенки. Пролин-богатые пептиды *Calliphora* принадлежат к семейству пролин-/аргинин-богатых АМП. В отличие от дефензинов, цекропинов и диптерицинов, пролин-/аргинин-богатые АМП вызывают гибель бактерий за счет нарушения синтеза ДНК и/или белка. Таким образом, FLIP7 содержит три структурно различных семейства разрушающих клеточную мембрану АМП, мишенью которых являются преимущественно мембраны грамотрицательных (цекропины, диптерицины) или грамположительных (дефензины) бактерий, и одну группу, воздействующую на внутриклеточные мишени (пролин-богатые пептиды). С механистической точки зрения эта композиция выглядит как хорошо организованная система взаимодополняющих элементов, совместная работа которых защищает организм хозяина от различных потенциально опасных бактерий.

В настоящей работе мы изучали взаимодействие FLIP7 и антибиотиков на нескольких моделях зрелых биопленочных и

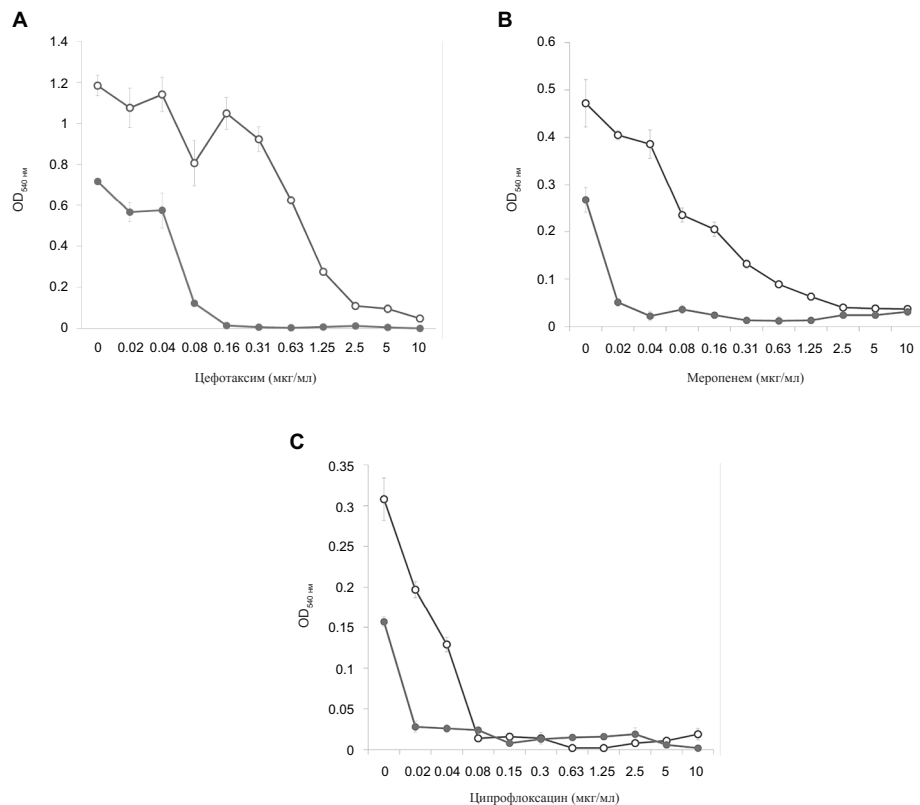


Рисунок 4 Кривые «доза — эффект» антибиотиков при использовании отдельно и в комбинации с FLIP7 против биопленки *Escherichia coli* (метод с кристаллическим фиолетовым).

Примечания: (A) Цефотаксим и цефотаксим + FLIP7 500 мкг/мл; (B) меропенем и меропенем + FLIP7 500 мкг/мл; (C) ципрофлоксацин и ципрофлоксацин + FLIP7 250 мкг/мл. Белые круги — антибиотик, черные — антибиотик + FLIP7.

Сокращения: OD — оптическая плотность.

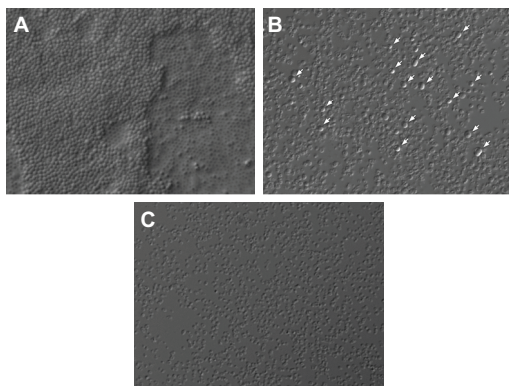


Рисунок 5 Микроскопия биопленки *Staphylococcus aureus* (в режиме Номарки с увеличением $\times 1000$).

Примечания: Суточные биопленки формировались на покровном стекле и обрабатывались следующим образом: (A) контроль; (B) после обработки меропенемом 0,2 мкг/мл и (C) после обработки меропенемом 0,2 мкг/мл + FLIP7 125 мкг/мл. В контрольном образце бактерии образовали многослойную биопленку, состоящую из живых клеток правильной формы. Обработка меропенемом приводила к гибели большинства бактерий, однако часть клеток (предположительно персистеры) выжили (выжившие клетки обозначены стрелками). После обработки комбинацией препаратов на стекле признаков живых клеток обнаружено не было.

планктонных культур *in vitro*. Как и ожидалось, бактерии в состоянии биопленки показали более высокую резистентность к антибиотикам по сравнению с планктонными клетками того же штамма. Однако уровень BRR колебался в широких пределах в

зависимости от типа антибиотика и вида микроорганизма. Биопленка *S. aureus* стала практически полностью нечувствительной к бета-лактамам меропенему и ампициллину, а также аминогликозидам амикацину и канамицину, которые эффективно уничтожали планктонные клетки. Средний уровень BRR был обнаружен для ванкомицина, эритромицина и антисептика бензалкония хлорида, тогда как у других антибиотиков (оксациллин, тетрациклин и хлорамфеникол) BRR была выражена слабо. Также различные уровни BRR были обнаружены у биопленки *E. coli*.

Эксперименты методом «шахматной доски» на моделях биопленок показали положительное взаимодействие FLIP7 с почти всеми антибиотиками для всех бактерий, используемых в эксперименте, за исключением полимиксина В для *E. coli*. У *S. aureus* была выявлена высокая степень синергизма FLIP7 (иФИК < 0,25) с пятью антибиотиками из 11 использованных (Таблица 1). В публикациях о биопленках *S. aureus* мы определили значения иФИК 37 различных двухкомпонентных комбинаций АМП — антибиотик.^{30–32} иФИК < 0,25 были зарегистрированы только в двух случаях: синтетический аналог цебропина А + ципрофлоксацин³⁰ и пептид 1080 + цефтазидим.³² Сравнение с литературными данными показало, что высокая степень синергизма с антибиотиками гораздо чаще встречается у FLIP7, чем у отдельных

АМП, указанных выше (45% против 5%, $P = 0,005$, z -критерий).

Взаимодействие с планктонными моделями клеток было в большинстве случаев существенно слабее, чем в биопленках тех же штаммов, и никогда не достигало высокого уровня синергизма. Это наблюдение согласуется с тем фактом, что высокий уровень синергизма наблюдался только у антибиотиков с высоким уровнем BRR. Если антибиотик не сталкивался с барьером в виде BRR (планктонные клетки) или этот барьер был слабым (антибиотики с низкой BRR), сила взаимодействия существенно снижалась. С этой точки зрения FLIP7 можно считать синергистом, который помогает антибиотикам преодолеть барьер BRR.

Анализ кривых «доза — эффект» указывает на то, что персистерные клетки могут являться возможной мишенью синергетического воздействия FLIP7. Известно, что двухфазный характер кривой свидетельствует о наличии в популяции персистерных клеток, нечувствительных к антибиотикам.³³ В биопленке *S. aureus* кривые «доза — эффект» антибиотиков с высокой BRR/высоким синергизмом (меропенем, ампициллина, амикацина и канамицина) имели характерную двухфазную форму (Рисунок 1). Использование комбинации этих антибиотиков с FLIP7 привело к полному уничтожению выживших клеток, выявляемых методом с ТТХ, тогда как применением одного только антибиотика добиться этого не удавалось. Кривые «доза — эффект» антибиотиков с минимальным уровнем BRR (оксациллин, хлорамфеникол) не показывали наличия персистерных клеток в популяции биопленки. Сходная картина наблюдалась в биопленке *E. coli*: комбинация FLIP7 и антибиотиков вызывала подавление персистеров во всех случаях, когда такие клетки были обнаружены в популяции (Рисунок 2).

Однако тест с ТТХ позволяет обнаружить лишь метаболически активные клетки и может не выявить персистерные клетки. Микроскопический анализ биопленки *S. aureus*, обработанной высоко синергетической комбинацией FLIP7 и меропенем, подтвердил результаты теста с ТТХ (Рисунок 5). После обработки мы не смогли обнаружить живые клетки, хотя после обработки биопленки только меропенемом они были заметны. Демонстрация этого факта подтверждает возможность полного уничтожения бактериальных клеток биопленки комбинацией FLIP7 и антибиотика и соответственно, профилактики рецидива болезни.

Тест на эрадикацию биопленки показал еще один возможный механизм взаимодействия. В этом тесте связывание кристаллического фиолетового прямо пропорционально общему содержанию всех компонентов биопленки (внеклеточного матрикса, мертвых и живых клеток). Связывание красителя резко снижалось после обработки биопленок *S. aureus* и *E. coli* комбинацией FLIP7 и антибиотиков по сравнению с обработкой одним только антибиотиком (Рисунки 3 и 4). Сходные результаты были получены в исследовании воздействия меропенем на биопленки *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, хотя у *K. pneumoniae* этот эффект был менее выражен. Полное разрушение биопленки очевидно означает уничтожение внеклеточного матрикса, который, наряду с персистерами, играет ключевую роль в защите биопленки от

повреждающего воздействия антибиотиков. Таким образом, разрушение матрикса является еще одним возможным механизмом взаимодействия FLIP7 и антибиотиков.

Подводя итог всему вышесказанному, можно сделать вывод, что FLIP7 представляет собой высокоэффективную природную антимикробную систему, которая помогает антибиотикам преодолеть прочные барьеры биопленки путем сенсibilизации персистерных клеток и разрушения материала биопленки. Система состоит из четырех семейств АМП с определенными структурами и механизмами действия. Неизбежно возникает вопрос, целесообразно ли с технической и экономической точки зрения использовать столь сложную систему в медицинской практике. Даже если теоретически возможно синтезировать все активные компоненты этого комплекса, стоимость производства такого искусственного препарата, вероятно, будет неприемлемо высока. Поэтому мы предпочли использовать биотехнологии для параллельного биосинтеза натуральных АМП в культуре *C. vicina*. Эта технология также позволяет обеспечить рентабельное производство с изменяемым объемом производимых АМП, состав которых идентичен натуральному FLIP7.³⁴

Еще одна проблема связана с подбором подходящего партнера FLIP7 среди традиционных антибиотиков. Суда по результатам исследования, для этой цели хорошо подходит стандартный метод «шахматной доски». В настоящее время бета-лактамы меропенем и ампициллин, аминогликозиды амикацин и канамицин, гликопептид ванкомицин и цефалоспорины цефотаксим являются, по всей видимости, наиболее подходящими кандидатами с точки зрения уровня синергизма.

На сегодняшний день эти и многие другие антибиотики успешно применяются для лечения инфекций на ранних стадиях. На более поздних стадиях, сопровождающихся образованием биопленки, их использование гораздо менее эффективно даже при использовании максимально возможной дозировки. Синергетический эффект FLIP7 позволяет снизить эффективную против биопленок концентрацию антибиотика до уровня гораздо меньшего, чем клинически достижимый (Таблица 4). С этой точки зрения, наилучшими партнерами для FLIP7 при обработке биопленок *S. aureus* и/или *E. coli* являются меропенем, ампициллин, оксациллин, ципрофлоксацин и цефотаксим, концентрации которых, эффективные против биопленок, можно снизить на 2—3 порядка по сравнению с клинически достижимыми концентрациями. Приемлемая ширина «терапевтического окна» также характерна для ванкомицина, амикацина, гентамицина и тетрациклина, у которых клинически достижимая концентрация превышает необходимую для разрушения биопленки более чем в 20 раз. Биопленки *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* также можно сделать чувствительными к воздействию антибиотика при помощи FLIP7, однако на данный момент существуют данные только относительно меропенема.

При оценке перспектив клинического применения FLIP7 следует уделять внимание всей совокупности его качеств, которые хорошо отвечают задачам лечения инфекций, вызванных био-

Таблица 4 Терапевтические окна антибиотиков, используемых в комбинации с FLIP7

Антибиотик	Клинически достижимая концентрация ¹		Терапевтическое окно ²	
	мкг/мл	Референсное значение		
Меропенем	40	35	<i>Staphylococcus aureus</i>	>300
			<i>Escherichia coli</i>	>1500
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	125
			<i>Acinetobacter baumannii</i>	25
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12.5
Ампициллин	281	36	<i>S. aureus</i>	>281
Цефотаксим	41	37	<i>E. coli</i>	586
Оксациллин	64	38	<i>S. aureus</i>	6400
Ванкомицин	53	39	<i>S. aureus</i>	35
Амикацин	45	40	<i>S. aureus</i>	30
Канамицин	16	41	<i>S. aureus</i>	5.5
Гентамицин	14	42	<i>E. coli</i>	23
Эритромицин	6,5	43 ³	<i>S. aureus</i>	14
Ципрофлоксацин	6,7	44	<i>E. coli</i>	>335
Тетрациклин	5	45	<i>S. aureus</i>	>50
			<i>E. coli</i>	33
Хлорамфеникол	20	46	<i>S. aureus</i>	20
			<i>E. coli</i>	13

Примечания: ¹Концентрация препарата в плазме C_{max} при внутривенном введении.

²Соотношение клинически достижимой концентрации и MBC_{90} антибиотика в присутствии FLIP7. Значения MBC_{90} получены из Таблицы 1.

³Концентрация препарата в плазме C_{max} при введении перорально.

Сокращения: MBC — минимальная подавляющая биопленку концентрация.

пленками: эффективность в отношении планктонных и биопленочных бактерий различных видов; сенсбилизация персистерных клеток к воздействию антибиотиков; способность разрушать материал биопленки; высокий синергизм с антибиотиками различных классов. Способность предотвращать возникновение резистентности у грамотрицательных бактерий²³ и низкая токсичность для клеток человека²⁴ дополняют перечень преимуществ FLIP7 как основы для будущей разработки новых антибактериальных препаратов.

Благодарности

Это исследование было выполнено с использованием гранта от Российского научного фонда (<http://rscf.ru/>, номер гранта 16-14-00048). Спонсор не принимал участия в определении дизайна исследования, сборе данных, их анализе, принятии решения о публикации либо подготовке рукописи настоящей статьи. Авторы благодарны ресурсным центрам «Развитие молекулярных и клеточных технологий», «Химический анализ и исследование материалов» и «Коллекции культур микроорганизмов» научного парка Санкт-Петербургского государственного университета за техническую помощь.

Предоставление информации

С. Ч. и Н. Г. являются изобретателями патента RU2447896 «Антимикробный материал» (патентообладатель — компания «Аллофарм»). С. Ч. — акционер компании «Аллофарм».

Д. Т. и А. Я. не имеют конфликта интересов в отношении настоящей работы.

Список литературы

1. Grants.nih.gov [homepage on the Internet]. Grants and fundings. Bethesda, MD: National Institutes of Health (NIH) [updated September 25, 2015; cited October 15, 2017]. Available from: <https://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-03-047.html>. Accessed January 3, 2018.
2. Pinto-Santini D, Salama NR. The biology of *Helicobacter pylori* infection, a major risk factor for gastric adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(8):1853–1858.
3. Collins D, Hogan AM, Winter DC. Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2011;12(5):504–512.
4. Johnson CH, Dejea CM, Edler D, et al. Metabolism links bacterial biofilms and colon carcinogenesis. *Cell Metab.* 2015;21(6):891–897.
5. Fong IW. New perspectives of infections in cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rev.* 2009;5(2):87–104.
6. Lanter BB, Sauer K, Davies DG. Bacteria present in carotid arterial plaques are found as biofilm deposits which may contribute to enhanced risk of plaque rupture. *mBio.* 2014;5(3):e01206–e01214.
7. Aslam S. Effect of antibacterials on biofilms. *Am J Infect Control.* 2008;36(10):S175.e9–S175.e11.
8. Bryers JD. Medical biofilms. *Biotechnol Bioeng.* 2008;100(1):1–18.
9. Leid JG. Bacterial biofilms resist key host defenses. *Microbe.* 2009;4(2):66–70.
10. López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(7):a000398.
11. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(4):322–332.
12. Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endod Topics.* 2012;22(1):2–16.
13. Römling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med.* 2012;272(6):541–561.
14. Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention – a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol.* 2016;198(1):1–15.
15. Wu H, Moser C, Wang HZ, Høiby N, Song ZJ. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci.* 2015;7(1):1–7.

16. Di Luca M, Maccari G, Maisetta G, Batoni G. BaAMPs: the database of biofilm-active antimicrobial peptides. *Biofouling*. 2015;31(2):193–199.
17. Stempel N, Strehmel J, Overhage J. Potential application of antimicrobial peptides in the treatment of bacterial biofilm infections. *Curr Pharm Des*. 2015;21(1):67–84.
18. Batoni G, Maisetta G, Esin S. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1858(5):1044–1060.
19. Pletzer D, Coleman SR, Hancock RE. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr Opin Microbiol*. 2016;33:35–40.
20. Rahnamaeian M, Cytryńska M, Zdybicka-Barabas A, et al. Insect antimicrobial peptides show potentiating functional interactions against Gram-negative bacteria. *Proc Biol Sci*. 2015;282(1806):20150293.
21. Yu G, Baeder DY, Regoes RR, Rolff J. Combination effects of antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(3):1717–1724.
22. Dosler S, Karaaslan E, Alev Gerceker A. Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. *J Chemother*. 2016;28(2):95–103.
23. Chernysh S, Gordya N, Suborova T. Insect antimicrobial peptide complexes prevent resistance development in bacteria. *PLoS One*. 2015;10(7):e0130788.
24. Gordya N, Yakovlev A, Kruglikova A, et al. Natural antimicrobial peptide complexes in the fighting of antibiotic resistant biofilms: *Calliphora vicina* medicinal maggots. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173559.
25. Leber A. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 4th ed. Washington, DC: ASM Press; 2016:5.16.1–5.16.23.
26. Lewis K. Persister cells and the paradox of chronic infections. *Microbe*. 2010;5(10):429–437.
27. Ciofu O, Rojo-Moliner E, Macià MD, Oliver A. Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS*. 2017;125(4):304–319.
28. Bulet P, Stöcklin R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett*. 2005;12(1):3–11.
29. Mylonakis E, Podsiadlowski L, Muhammed M, Vilcinskas A. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2016;371(1695):20150290.
30. Mataraci E, Dosler S. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(12):6366–6371.
31. Hwang IS, Hwang JS, Hwang JH, et al. Synergistic effect and antibiofilm activity between the antimicrobial peptide coprisin and conventional antibiotics against opportunistic bacteria. *Curr Microbiol*. 2013;66(1):56–60.
32. Reffuveille F, de la Fuente-Núñez C, Mansour S, Hancock RE. A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(9):5363–5371.
33. Kim KP, Kim YG, Choi CH, et al. In situ monitoring of antibiotic susceptibility of bacterial biofilms in a microfluidic device. *Lab Chip*. 2010;10(23):3296–3299.
34. Chernysh SI, Gordja NA. The immune system of maggots of the blow fly (*Calliphora vicina*) as a source of medicinal drugs. *J Evol Biochem Physiol*. 2011;47(6):524–533.
35. Ikawa K, Nakashima A, Morikawa N, et al. Clinical pharmacokinetics of meropenem and biapenem in bile and dosing considerations for biliary tract infections based on site-specific pharmacodynamic target attainment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(12):5609–5615.
36. Pacifici GM. Clinical pharmacology of ampicillin in neonates and infants: effects and pharmacokinetics. *Int J Pediatr*. 2017;5(12):6383–6410.
37. Patel KB, Nicolau DP, Nightingale CH, Quintiliani R. Pharmacokinetics of cefotaxime in healthy volunteers and patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1995;22(1–2):49–55.
38. Nessler N, Verdier MC, Launey Y, et al. High-dose continuous oxacillin infusion results in achievement of pharmacokinetics targets in critically ill patients with deep sternal wound infections following cardiac surgery. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(9):5448–5455.
39. James JK, Palmer SM, Levine DP, Rybak MJ. Comparison of conventional dosing versus continuous-infusion vancomycin therapy for patients with suspected or documented gram-positive infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(3):696–700.
40. Burdet C, Pajot O, Couffignal C, et al. Population pharmacokinetics of single-dose amikacin in critically ill patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Eur J Clin Pharmacol*. 2015;71(1):75–83.
41. Aung TY, Thwin MH, Zin T, Nwe Oo K, Aye NN, Sin S. Comparative pharmacokinetics of kanamycin between multi-drug resistant tuberculosis patients and healthy volunteers. *Int J Med Pharm*. 2014;2(2):45–59.
42. Medellín-Garibay SE, Rueda-Naharro A, Peña-Cabía S, García B, Romano-Moreno S, Barcia E. Population pharmacokinetics of gentamicin and dosing optimization for infants. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(1):59482–59489.
43. Josefsson K, Bergan T, Magni L. Dose-related pharmacokinetics after oral administration of a new formulation of erythromycin base. *Br J Clin Pharmacol*. 1982;13(5):685–691.
44. Lipman J, Scribante J, Gous AG, Hon H, Tshukutsoane S. Pharmacokinetic profiles of high-dose intravenous ciprofloxacin in severe sepsis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(9):2235–2239.
45. Agwuh KN, MacGowan A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(2):256–265.
46. Ambrose PJ. Clinical pharmacokinetics of chloramphenicol and chloramphenicol succinate. *Clin Pharmacokinet*. 1984;9(3):222–238.
47. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A8. Wayne, PA: NCCLS; 2003.
48. Clinical Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 10th edition, M07-A10. Wayne, PA: CLSI; 2015.

Infection and Drug Resistance

Publish your work in this journal

Infection and Drug Resistance is an international, peer-reviewed open-access journal that focuses on the optimal treatment of infection (bacterial, fungal and viral) and the development and institution of preventive strategies to minimize the development and spread of resistance. The journal is specifically concerned with the epidemiology of antibiotic

resistance and the mechanisms of resistance development and diffusion in both hospitals and the community. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/infection-and-drug-resistance-journal>

Dovepress