

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідних робіт Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України»: «Дослідження особливостей взаємодій антимікробних пептидів з мішенями», № державної реєстрації 0110U001413.

**Вступ.** Боротьба з інфекціями, етіологічним чинником яких є *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), нині розглядається як актуальний напрям сучасної медицини. Адже цілий ряд механізмів адаптації та виживання бактерії, природна стійкість до декількох класів антибіотиків несуть у собі небезпеку для життя хворих і розглядаються у світі як загроза громадському здоров'ю [1,2].

Клінічно важливою особливістю вказаних бактерій є висока швидкість розвитку резистентності до різноманітних класів протимікробних засобів. В останнє десятиріччя процент пан-антибіотикорезистентних штамів невинно зростає [3]. Іншою не менш важливою особливістю штамів *P. aeruginosa* є надзвичайно висока здатність до формування біоплівки, структура та фізіологічні властивості якої забезпечують підвищену стійкість до протимікробних препаратів та допомагають подолати захисні сили макроорганізму при інфекції. Стан біоплівки сприяє збереженню метаболічно неактивної частини популяції, що має дуже низький рівень чутливості до впливу більшості антибіотиків [4,5]. Показано, що чутливість бактерій у планктонній формі та у формі біоплівки значно відрізняється – мінімальні інгібуючі концентрації антимікробних агентів зростають у 100-1000 разів [6]. Тобто, навіть адекватна антибіотикотерапія не завжди здатна зупинити інфекцію на етапі формування біоплівки, тому розробка ефективних засобів, що здатні блокувати цей процес є надзвичайно актуальною.

У останні роки у світі спостерігається підвищений інтерес до поліміксинів (антибіотиків з класу катіонних пептидних антибіотиків), що викликаний відсутністю нових антибіотиків, до яких були б чутливі полірезистентні штами грам-негативних бактерій. Більшість грам-негативних бактерій є чутливими до поліміксину, а формування резистентності до цих катіонних ліпопептидів відбувається повільно і спостерігається значно рідше у порівнянні з іншими антибіотиками [7]. Оскільки, з огляду на можливу нефротоксичність, просте збільшення дози поліміксинів не є способом оптимізації їх активності проти *P. aeruginosa* у формі біоплівки, великі потенційні можливості може мати комбінована терапія з іншими антибіотиками.

**Мета роботи** – створення та дослідження ефективності комбінації протимікробних препаратів з поліміксинами, що має синергійний протимікробний ефект та інгібує біоплівкоутворення штамів *P. aeruginosa*.

**Об'єкт і методи дослідження.** Активність протимікробних препаратів, що відносять до антисиньогнійних, та їх комбінації з поліміксинами вивчали на референтному штамі *P. aeruginosa* ATCC 27853 та 33 актуальних поліантибіотикорезистентних штамів *P. aeruginosa* диско-дифузійним методом та методом послідовних серійних розведень у рідкому та твердому поживному середовищі Мюллера-Хінтона [8]. Ефект комбінацій оцінювали шляхом визначення індексу FIC (fractional inhibitory concentration) як суму відношень МІК кожної сполуки у комбінації до МІК сполук при використанні окремо. При FIC $\leq$ 0,5 ефект розцінювали як виражений синергійний, при FIC $\leq$ 0,9 – синергійний, при FIC=1,0 – адитивний, при FIC $>$ 1,0 – антагоністичний. Перелік антисиньогнійних препаратів був наступний: аміноглікозиди, фторхінолони, цефалоспорини III-IV поколінь, іміпенем, меропенем. У дослідженні використано поліміксин В сульфатта М (виробник SIGMA-ALDRICH, Швейцарія).

Композиція створена шляхом введення розчину поліміксину В сульфату у тверде поживне середовище (агар Мюллера-Хінтона) методом послідовних серійних розведень. На поверхню агару інокулювали суспензії тест-штамів *P. aeruginosa* у концентрації 0,5 одиниць McFarland. Після підсушування на поверхню агару наносили стандартизовані комерційні диски з іміпенемом. Контролями слугували чашки з агаром Мюллера-Хінтона без протимікробних засобів, засіяні тест-штамами (контроль культури); засіяні чашки з агаром Мюллера-Хінтона без поліміксину з внесеними дисками з іміпенемом та чашки з агаром Мюллера-Хінтона з поліміксином, засіяні тест-штамами без нанесення дисків з іміпенемом. Після інкубації проведено облік результатів шляхом вимірювання зон пригнічення росту навколо дисків та наявності росту тест-штамів на контрольних чашках без дисків з іміпенемом.

Дослідження здатності до формування біоплівок мікроорганізмами проводили планшетним методом згідно з методикою O'Toole G., 1999 [9]. Як рідке поживне середовище використовували трипказо-соевий бульйон, виробництва bioMérieux, Франція. Для візуалізації біоплівок використовували 0,1 % спиртовий розчин барвнику кристал віолету. Оптичну щільність вмісту лунок вимірювали на фотометрі StatFax 303 Plus при довжині хвилі 630 нм. Результати фіксували в одиницях оптичної щільності (OD<sub>630</sub>).

Ефект впливу препаратів на біоплівки, що формувались, оцінювали за індексом інгібування біоплівок, який розраховували за формулою:  $[(OD_{630} \text{ позитивного контролю} - OD_{630} \text{ дослідне}) / OD_{630} \text{ позитивного контролю}] \times 100\%$ . Позитивним ефектом (пригнічення біоплівкоутворення за впливу препарату) вважалося зниження значення  $OD_{630}$  в досліді щодо  $OD_{630}$  позитивного контролю, більш ніж на 25% [10].

Одержані результати статистично обробляли загальноприйнятими методами параметричної та непараметричної статистики за допомогою пакету програм «Statistica v. 8.0». Описова статистика у випадку нормального розподілу величин представлена у вигляді середніх величин (M) та стандартної помилки середнього (m); при дослідженні непараметричних показників – медіана (Me) та інтерквартильний розмах (% 25 – % 75). Відмінності вважались достовірними при  $p < 0,05$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.** Диско-дифузійним методом встановлено, що 96 % полірезистентних штамів *P. aeruginosa* мали чутливість до поліміксину, резистентних штамів не виявлено.

Результати дослідження протимікробної активності комбінацій терапевтичних доз антисиньогнійних препаратів (фторхінолони, аміноглікозиди, цефалоспорини, карбопенемі) з субінгібіторними

**Комбінований ефект дії іміпенему та поліміксину В сульфату на тест-штами *P. aeruginosa***

Препарат або протимікробна композиція	Діаметри зон пригнічення росту тест-штамів		
	<i>P. aeruginosa</i> у мм (M±m)		
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i> № 13	<i>P. aeruginosa</i> № 46
Іміпенем (контроль)	22±1,0	14±0,5	28±1,0
Іміпенем+поліміксин В сульфат 2 мгк/мл	24±2,0	17±1,0	30±2,0
Іміпенем+поліміксин В сульфат 1 мгк/мл	35±3,0*	33±2,0*	37±1,5*
Іміпенем+поліміксин В сульфат 0,5 мгк/мл	40±2,0*	36±3,0*	40±2,0*
Іміпенем+поліміксин В сульфат 0,25 мгк/мл	34±2,0*	30±2,0*	33±1,0*
Поліміксин В сульфат 2 мгк/мл	0	0	0

**Примітка.** \* достовірна різниця між контролем ( $p < 0,05$ ).

досягають концентрацій, при яких формується біоплівка. У результаті значення МІК іміпенему зростають, що супроводжується клінічною неефективністю лікування. Механізм дії представників катіонних поліпептидів пов'язаний з порушенням цілісності зовнішньої мембрани бактерій за типом дії поверхнево активних речовин, тобто шлях для надходження інших протимікробних речовин, зокрема, іміпенему відкритий.

На наступному етапі вивчали вплив комбінації зазначених протимікробних препаратів на процес утворення біоплівки штамми *P. aeruginosa* (таблиця 3).

**Таблиця 1. Комбінований ефект дії протимікробних препаратів на тест-штами *P. aeruginosa* (n=34)**

Антисиньогнійні препарати	Значення індексу FIC у комбінації з поліміксинами (M±m)	
	М	В
Фторхінолони	1,0±0,1	1,0±0,0
Аміноглікозиди	0,96±0,2	0,99±0,01
Цефалоспорини III-IV поколінь	1,0±0,0	1,0±0,0
Меропенем	0,94±0,4	0,92±0,15
Іміпенем	0,75±0,2	0,6±0,1

дозами поліміксинів М та В (від 1,0 до 0,25 мкг/мл) представлені в таблиці 1.

Встановлено адитивність протимікробної дії поліміксинів та антибіотиків усіх інших груп, крім представників карбопенемів, з якими поліміксини показали синергічний ефект. Дія поліміксину В у (79,0±3,3)% випадках достовірно не відрізнялась від ефекту поліміксину М.

Одержані результати підтверджено у дослідженнях з визначення діаметрів зон затримки росту тест-штамів обраною комбінацією препаратів іміпенему та поліміксину В сульфату у субінгібіруючих концентраціях (таблиця 2).

Поєднане застосування препаратів іміпенему та поліміксину В сульфату у субінгібіруючих концентраціях (від 1,0 до 0,25 мкг/мл) достовірно підвищує активність іміпенему та розцінюється як синергічний ефект. Поясненням отриманого ефекту може бути наступне. Головний механізм стійкості *P. aeruginosa* до іміпенему пов'язаний з порушенням проникності мікробної клітини для антибіотика внаслідок втраченого поринового каналу OprD у результаті мутацій. На фоні дії іміпенему досить швидко відбувається селекція таких мутантів, бактерії розмножуються та

**Таблиця 3. Комбінований ефект дії протимікробних препаратів на біоплівкоутворення штамів *P. aeruginosa* (n=34)**

Препарат	Значення МІК що інгібували біоплівкоутворення, мкг/мл
Іміпенем	2,0 [1,0; 4,0]
Поліміксин	0,5 [0,5; 1,0]
Іміпенем+Поліміксин	0,5 / 0,25 [0,2; 1,0] / [0,1; 0,25]

Відзначено, що субінгібіруюча концентрація катіонного поліпептиду від 1,0 до 0,5 мкг/мл запобігає процесу утворення біоплівок тест-штамами *Pseudomonas aeruginosa*.

**Висновки.** Поєднане застосування препаратів іміпенему у терапевтичних дозах та поліміксинів у субінгібіруючих концентраціях (від 1,0 до 0,25 мкг/мл) достовірно підвищує активність іміпенему та розцінюється як синергічний ефект. Розроблена композиція пригнічує процес біоплівкоутворення бактерій.

**Перспективи подальших досліджень.** Отримані результати дають перспективу для подальшого детального вивчення дії поліміксинів у різноманітних комбінаціях з протимікробними препаратами для терапії синьогнійної інфекції, викликані поліантибіотикорезистентними штамми *Pseudomonas aeruginosa*.

## Література

1. Moradali MF, Ghods S, Rehm B. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;2:7-39.
2. Thaden JT, Park LP, Maskarinec SA, Ruffin F, Fowler VG Jr, van Duin D. Results from a 13-Year Prospective Cohort Study Show Increased Mortality Associated with Bloodstream Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Compared to Other Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6):71-6.
3. Salmanov AG, Verner OM. Antibiotic resistance nosocomial strains of *Pseudomonas aeruginosa* in Ukrainian surgical department: results of prospective multicentre study (2011-2015) (Ukr). *International Journal of Antibiotics and Probiotics.* 2017;1(1):49-63.
4. Tolker-Nielsen T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *APMIS.* 2014;122:1-51.
5. Lee K, Yoon SS. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol.* 2017;27(6):1053-64.
6. Brady AJ, Laverty G, Gilpin DF, Kearney P, Tunney M. Antibiotic susceptibility of planktonic- and biofilm-grown staphylococci isolated from implant-associated infections: should MBEC and nature of biofilm formation replace MIC? *Journal of Medical Microbiolog.* 2017;66(4):461-9.
7. Giamarellou H. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36(2):50-4.
8. Expert policy of the European Committee for the determination of antimicrobial susceptibility (EUCAST). Version 2.0, 2011. Available from: [http://www.eucast.org/expert\\_rules](http://www.eucast.org/expert_rules)
9. O'Toole GA, Pratt GL, Watnick AP. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in Enzymology.* 1999;310:91-109.
10. Stepanovic S, Vukovic D, Hala V, Di Bonaventura G, Djukic S, Irvovic IC, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 2007;115:891-9.

### ІНГІБУВАННЯ БІОПЛІВКОУТВОРЕННЯ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* СИНЕРГІЧНОЮ КОМБІНАЦІЄЮ ПРОТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ

Скляр Н. І., Лісняк Ю. В., Саркіс-Іванова В. В., Маркович І. Г., Піддубна Т. Л.

**Резюме.** Метою роботи було вивчення комбінованої дії поліміксинів з основними антисиньогнійними препаратами на циркулюючі штами *P. aeruginosa*. Експериментально досліджені можливі ефекти комбінації терапевтичних доз антибіотиків різних груп (фторхінолони, аміноглікозиди, цефалоспорины, карбопенем) з субінгібіторними дозами поліміксинів М та В (від 1,0 до 0,25 мкг/мл). Встановлено адитивність протимікробної дії поліміксинів та антибіотиків усіх інших груп, крім представників карбопенемів, з якими поліміксини показали синергічний ефект. Дія поліміксину В у (79.0±3.3)% випадках достовірно не відрізнялась від ефекту поліміксину М. Відзначено, що субінгібуюча концентрація катіонного поліпептиду від 0,1 до 0,25 мкг/м у комбінації з іміпенемом від 0,5 до 1,0 мкг/мл запобігає процесу утворення біоплівки тест-штамами *P. aeruginosa*. Таким чином, стратегія антисиньогнійної терапії сьогодні може базуватись на застосуванні катіонних поліпептидів поліміксинів. Збільшення дози поліміксинів не є способом оптимізації їх активності проти *P. aeruginosa* у формі біоплівки, великі потенційні можливості максимізувати ефективність поліміксинів при мінімізації небезпеки появи резистентності до них може мати комбінована терапія з іншими антибіотиками. При цьому, як відомо, запобігання утворення біоплівки потребує менших концентрацій антибіотику, ніж знищення уже утвореної біоплівки.

**Ключові слова:** синергічна комбінація, *Pseudomonas aeruginosa*, поліміксини, інгібування біоплівкоутворення.

### ИНГИБИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* СИНЕРГИЧЕСКОЙ КОМБИНАЦИЕЙ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Скляр Н. И., Лисняк Ю. В., Саркис-Иванова В. В., Маркович И. Г., Поддубная Т. Л.

**Резюме.** Целью работы было изучение комбинированного действия полимиксинов с основными антисинегнойными препаратами на циркулирующие штаммы *P. aeruginosa*. Экспериментально исследованы возможные эффекты комбинации терапевтических доз антибиотиков различных групп (фторхинолоны, аминогликозиды, цефалоспорины, карбопенемы) с субингибиторными дозами полимиксинов М и В (от 1,0 до 0,25 мкг/мл). Установлено аддитивность противомикробного действия полимиксинов и антибиотиков всех групп, кроме представителей карбопенемов, с которыми полимиксины показали синергический эффект. Действие полимиксина В в (79.0 ± 3.3)% случаев достоверно не отличалась от эффекта полимиксина М. Отмечено, что субингибирующая концентрация катионного полипептида от 0,1 до 0,25 мкг/м в комбинации с имипенемом от 0,5 до 1,0 мкг/мл предотвращает процесс образования биопленок тест-штаммами *P. aeruginosa*. Таким образом, стратегия антисинегнойной терапии сегодня может базироваться на применении катионных полипептидов полимиксинов. Увеличение дозы полимиксинов не является способом оптимизации их активности против *P. aeruginosa* в форме биопленки, большие потенциальные возможности максимизировать эффективность полимиксинов при минимизации опасности появления резистентности к ним может иметь комбинированная терапия с антибиотиками. При этом, как известно, предотвращение образования биопленки требует меньших концентраций антибиотика, чем уничтожение уже созданной биопленки.

**Ключевые слова:** синергическое сочетание, *Pseudomonas aeruginosa*, полимиксины, ингибирование биопленкообразования.

### INHIBITION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BIOFILM FORMATION WITH SYNERGIC COMBINATION OF ANTIMICROBIAL AGENTS

Sklyar N. I., Lisnyak Yu. V., Sarkis-Ivanova V. V., Markovich I. G., Pidubna T. L.

**Abstract.** Combatting infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), is now considered to be a topical problem in modern medicine. A number of mechanisms of adaptation and survival of the bacteria and natural resistance to several classes of antibiotics are a danger to the lives of patients and are considered a threat



to public health. Another important feature of *P. aeruginosa* strains is the extremely high ability to form biofilm, the structure and physiological properties of which provide increased resistance to antimicrobial agents and help to overcome the protective forces of the macroorganism during infection. The crisis of monotherapy with anti-pyocyanic agents induces to consider combined antibiotic therapy as one of the effective methods for controlling this disorder.

*The purpose of the study* was to assess the combined effect of polymyxin with major anti-pyocyanic agents on the circulating strains of *P. aeruginosa*.

*Object and methods.* To perform the tasks, the study involved reference strain *P. aeruginosa* ATCC 27854 and 33 circulating strains isolated from clinical material from patients with purulent-inflammatory diseases. The study of the ability to form biofilms by microorganisms was carried out using a plate method according to O'Toole G., 1999. Determination of the sensitivity of the test strains to antimicrobial agents was carried out using Bauer-Kirbi disc diffusion method on Muller-Hinton medium using commercial disks and serial dilutions. The study of the effectiveness of combinations of anti-pyocyanic agents and their effects on biofilm formation of *P. aeruginosa* strains was carried out with the determination of FIC (fractional inhibitory concentration) index. In  $FIC \leq 0.5$  the effect was considered as expressed synergistic, in  $FIC = 1.0$  - additive, with  $FIC > 1.0$  - antagonistic.

*Results.* The disc diffusion method showed that 96% of *P. aeruginosa* strains had a sensitivity to polymyxin, resistant strains were not detected. The possible effects of a combination of therapeutic doses of antibiotics of different groups (fluoroquinolones, aminoglycosides, cephalosporins, carbapenems) with subinhibitory doses of polymyxin M and B (from 1.0 to 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were investigated experimentally. The study showed additional antimicrobial action of polymyxins and antibiotics of all other groups, except for representatives of carbapenems, with which polymyxin showed a synergistic effect. The effect of polymyxin B in (79.0  $\pm$  3.3)% of cases was not significantly different from the effect of polymyxin M. Subinhibitory concentration of cationic polypeptide from 0.1 to 0.25  $\mu\text{g}/\text{m}$  in combination with imipenem from 0.5 to 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  was shown to prevent the formation of biofilms by test strains of *P. aeruginosa*.

Thus, the strategy of anti-pyocyanic therapy today can be based on the use of cationic polypeptides of polymyxin. Increasing the dose of polymyxin is not a way to optimize their activity against *P. aeruginosa* in the form of biofilms; combined therapy with other antibiotics may provide great potential opportunities to maximize the effectiveness of polymyxins in minimizing the risk of developing resistance to them. At the same time, prevention of biofilm formation requires lower concentrations of antibiotics than the destruction of biofilm which has already been formed.

**Key words:** synergistic combination, *Pseudomonas aeruginosa*, polymyxin, inhibition of biofilm formation.

Рецензент – проф. Білаш С. М.  
Стаття надійшла 08.05.2019 року

DOI 10.29254/2077-4214-2019-2-1-150-203-206

УДК 616.895.4+616.891+616.892:616.89-02-058

Скрипніков А. М., Ісаков Р. І., Фисун Ю. О.

ПСИХОСОЦІАЛЬНА ДЕЗАДАПТАЦІЯ ЖІНОК ІЗ ПСИХОГЕННИМИ ДЕПРЕСИВНИМИ РОЗЛАДАМИ

Українська медична стоматологічна академія (м. Полтава)

larysaherasymenko@gmail.com

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Результати дослідження, що представлені, є часткою виконання НДР кафедри психіатрії, наркології та медичної психології Української медичної стоматологічної академії на тему «Психосоціальна дезадаптація при невротичних розладах у жінок (клініко-психопатологічна характеристика, принципи реабілітації та профілактики)», № державної реєстрації 0113U001378.

**Вступ.** Процес адаптації являє собою розробку суб'єктом стратегій і способів оволодіння ситуацією на різних рівнях саморегуляції. Реалізація адаптації запускається появою змін у системі «індивід-середовище», а показником її успішності є можливість виконання основних завдань діяльності [1]. Відповідно, у адаптивній діяльності виділяють дві паралельні тенденції: пристосувальну і перетворюючу. Перша прилаштовує потреби індивіда до навколишнього, а друга навпаки, пристосовує середовище до потреб людини [2].

Результатом пристосувальної чи перетворюючої діяльності є *адаптованість* – реалізація індивідом значимих цілей, максимально гармонійна інтегрованість до системи соціальних зв'язків і відносин,

при збереженні власної ідентичності, психічного і фізичного здоров'я [3].

Якщо ж відповідні механізми не спрацюють, то виникає дисфункція, обумовлена накопиченням нездоланих для системи адаптації перешкод [4].

*Психосоціальна дезадаптація* – збій у механізмах психічного пристосування при гострому або хронічному емоційному стресі, внаслідок чого виникає часткова або повна нездатність пристосовуватись до умов соціального середовища і виконувати звичайну для власного статусу роль у суспільстві через обмеження функціональності психіки [5].

Схематично процес дезадаптації розгортається за принципом «замкненого кола», де пусковим механізмом, як правило, виступає наявність стійкої психотравмуючої ситуації, що призводить до зриву адаптивних механізмів [6]. Порушення адаптації ускладнює вирішення конфліктних ситуацій і проковує розвиток психогенної патології, а психогенії, у свою чергу, поглиблюють дезадаптацію [7].

Великий дослідницький інтерес являє собою проблема психосоціальної дезадаптації хворих на психогенні депресивні розлади [8,9], зокрема, гендерні аспекти цього явища стосовно жінок [10].