

УДК 579.8:615.281.015.8:615.322

DOI <https://doi.org/10.32689/2663-0672-2024-4-9>

### Марина МІШИНА

доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д.П. Гриньова, Харківський національний медичний університет, [mm.mishina@knmu.edu.ua](mailto:mm.mishina@knmu.edu.ua)  
ORCID: 0000-0001-6484-4198

### Юлія МОЗГОВА

кандидат медичних наук, доцент, доцент кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д.П. Гриньова, Харківський національний медичний університет, [ya.mozghova@knmu.edu.ua](mailto:ya.mozghova@knmu.edu.ua)  
ORCID: 0000-0001-6770-9397

### Світлана МАЛАНЧУК

кандидат біологічних наук, доцент, доцент кафедри інфекційних хвороб та клінічної імунології, Харківський національний медичний університет імені В.Н. Каразіна, [s.malanchuk@karazin.ua](mailto:s.malanchuk@karazin.ua)  
ORCID: 0000-0002-9376-3693

### Ірина МАРЧЕНКО

доктор філософії в галузі охорона здоров'я за спеціальністю «Медицина», доцент, доцент кафедри мікробіології, вірусології та імунології ім. проф. Д.П. Гриньова, Харківський національний медичний університет, [ia.marchenko@knmu.edu.ua](mailto:ia.marchenko@knmu.edu.ua)  
ORCID: 0000-0001-5583-9768

### Юрій КОТ

кандидат біологічних наук, доцент кафедри біохімії, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, [kot.juriy@gmail.com](mailto:kot.juriy@gmail.com)  
ORCID: 0000-0003-2591-4098

### Юрій МІШИН

аспірант кафедри загальної та клінічної патологічної фізіології ім. А.О. Альперна, Харківський національний медичний університет, [utmishyn.po22@knmu.edu.ua](mailto:utmishyn.po22@knmu.edu.ua)  
ORCID: 0000-0003-2226-2944

## ВИЗНАЧЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ ДІЇ НОВИХ КОМПОЗИЦІЙ НА ОСНОВІ ДІНДОЛІЛМЕТУНУ НА СФОРМОВАНІ БІОПЛІВКИ МІКРООРГАНІЗМІВ

**Актуальність теми дослідження.** Резистентність до антимікробних препаратів становить глобальну загрозу громадському здоров'ю, яка пронизує всі сфери сучасної медицини, використання комбінацій лікарських засобів для повторної сенсibiliзації резистентних штамів є перспективним засобом обійти застійний процес відкриття ліків.

Тому метою дослідження було визначити антимікробну дію композицій на основі 3,3'-дііндолілметану (DIM) з протимікробними препаратами *in vitro* на добові біоплівки еталонних та клінічних, полірезистентних штамів мікроорганізмів.

**Матеріали та метод дослідження.** Ідентифікацію мікроорганізмів проводили за допомогою наборів «MIKROLATEST®». Чутливість клінічних штамів мікроорганізмів до антимікробних препаратів вивчали за допомогою мікротестсистеми з напівкількісною реєстрацією результатів «MIKROLATEST SensiLaTest MIC» (ERBA, Lahema). Аналіз результатів проводили за допомогою автоматичного аналізатора «Multiskan EX» (mun 355).

**Результати та їх обговорення.** Встановлено, що дослідні композиції на основі DIM з офлоксацином або діоксидином виявилися ефективними по відношенню до еталонних та клінічних штамів. Введення цих дослідних композицій у бактеріальні біоплівки призводило до ушкодження цілісності біоплівок дослідних штамів та мали місце морфологічні відмінності від контрольних добових біоплівок. Візуалізація біоплівок через 24 години після додавання офлоксацину або діоксидину показала утворення біоплівки, майже подібної до такої в контролі, але було зафіксовано часткове руйнування цілісності біоплівок ізолятів. Так, при застосуванні дослідної композиції «офлоксацин+DIM+розчинна основа» частка клітин з ушкодженою оболонкою складала 69,4%; а при додаванні дослідного зразку «діоксидин+ DIM+розчинна основа частка клітин з ушкодженою оболонкою складала 61,8%». Додавання зразків, що містили «DIM+розчинна основа» та тільки «розчинну основу» без додавання протимікробного препарату спричиняло часткове руйнування добової біоплівки.

**Висновки.** Досліджуючи вплив DIM у складі нових композицій з антибіотиками, які найчастіше використовуються при лікуванні гнійно-запальних захворювань, на сформовані резистентними штамми цільні біоплівки, які є причиною летальних наслідків, встановлено, що композиції з DIM здатні впливати на утворені мікроорганізмами біоплівки шляхом їх руйнування. Таким чином, DIM має властивості, які пригнічують процес формування біоплівки та руйнують вже сформовані цільні біоплівки.

**Ключові слова:** дііндолілметан, ізоляти, біоплівки, нові антимікробні композиції.

**Maryna Mishyna, Yuliya Mozgova, Svitlana Malanchuk, Iryna Marchenko, Yurii Kot, Yurii Mishyn.**  
**DETECTION OF ANTIMICROBIAL EFFECT OF NEW COMPOSITIONS WITH DIINDOLIMETHANE ON FORMED MICROBIAL BIOFILMS**

**Introduction.** Antimicrobial resistance is a global threat to public health, which permeates all domains of modern medicine, the use of drug combinations to re-sensitize resistant strains has emerged as a promising means to bypass the stagnant drug discovery pipeline.

**The aim** of the study was to determine the antimicrobial effect of compositions based on 3,3'-diindolylmethane (DIM) with antimicrobial drugs *in vitro* on daily biofilms of reference and clinical, multi-resistant strains of microorganisms.

**Materials and methods.** Identification of microorganisms was carried out using the «MIKROLATEST®» kits. The sensitivity of clinical strains to antimicrobial drugs was studied using a microtest system with semi-quantitative registration of results «MIKROLATEST SensiLaTest MIC» (ERBA, Lahema). Analysis of the results was provided using an automatic analyzer «Multiskan EX» (type 355).

**Research results and their discussion.** It was found that the experimental compositions based on DIM with ofloxacin or dioxidine were effective against reference and clinical strains. The introduction of these experimental compositions into bacterial biofilms led to damage of its integrity and formation of morphological differences from the control daily biofilms. Visualization of biofilms in 24 hours after the addition of ofloxacin or dioxidine showed the formation of a biofilm almost similar to the control one, but partial destruction of its integrity was recorded. Thus, when using the experimental composition «ofloxacin + DIM + soluble base» the proportion of cells with a damaged membrane was 69.4%, and when adding the experimental sample «dioxidine + DIM + soluble base» the proportion of cells with a damaged membrane was 61.8%. Adding samples containing «DIM + soluble base» and only «soluble base» without antimicrobial drugs caused partial destruction of the daily biofilm.

**Conclusions.** Investigating the effect of DIM in new compositions with antimicrobials, which are most often used in the treatment of purulent-inflammatory diseases, on dense biofilms formed by resistant strains, which are the cause of lethal consequences, it was found that compositions with DIM are able to affect the biofilms formed by microorganisms by destroying them. Thus, DIM has properties that inhibit the process of biofilm formation and destroy already formed dense biofilms.

**Key words:** diindolylmethane, isolates, biofilms, new antimicrobial compositions.

**Вступ.** З часом неправильне використання антибіотиків призводить до формування антимікробної резистентності з подальшою неефективністю лікування, збільшенням витрат на лікування та підвищенням смертності [2]. Як зазначають Cook M.A. та Wright G.D. [3], резистентність до антимікробних препаратів становить глобальну загрозу громадському здоров'ю, яка пронизує всі сфери сучасної медицини, а Tuers M. та співав. [11] підкреслюють, що використання комбінацій лікарських засобів для повторної сенсibiлізації резистентних штамів є перспективним засобом обійти застійний процес відкриття ліків. Штами, стійкі до багатьох класів антибіотиків, з'явилися серед основних грамполозитивних і грамнегативних видів, включаючи *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* *Enterobacteriaceae* і *Neisseria gonorrhoeae*. У деяких грамнегативних мікроорганізмів резистентність може включати більшість або навіть усі доступні антимікробні варіанти, що призводить до надзвичайно стійких або повністю стійких фенотипів. Ця так звана «криза резистентності до антибіотиків» ускладнюється відставанням у відкритті та розробці антибіотиків, які мали місце в останні роки, і ставить під загрозу важливу роль, яку відіграють антибіотики в сучасній медичній практиці [7]. У листі ВООЗ [12] зазначено, що критично необхідна інновація у відкритті антибактеріальних ліків протидіятиме зростанню тенденції до мультирезистентних (MDR), широкої лікарської стійкості (XDR) і навіть загальної лікарської стійкості (PDR), особливо грамнегативних бактерій.

Theuretzbacher U. та Piddock L.J.V. [10] говорять, що глобальна криза лікарської стійкості, невелика

кількість нових препаратів для лікування інфекцій, викликаних найбільш стійкими патогенами, а також наукові проблеми у відкритті та ранній розробці нових антибіотиків надихнули дослідників на пошук нових способів лікування бактеріальних інфекцій. Традиційний антибіотичний підхід до лікування інфекцій, викликаних грамполозитивними або грамнегативними бактеріями, полягає у пошуку малих молекул, які або пригнічують ріст, або вбивають бактерії. Існує широко визнана потреба в нових антибактеріальних агентах для вирішення глобального зростання резистентності, і ця потреба в нових агентах особливо актуальна для лікування резистентних до антибіотиків грамнегативних бактерій [9].

Резистентність до антимікробних препаратів є основною загрозою як з точки зору виникнення, так і складності. Однією з причин неефективності сучасних методів лікування бактеріальних захворювань є наявність захисних і стійких структур біоплівки [4]. У дослідженнях Shirinzadeh H. та співав. [8] щодо розробки нових протимікробних препаратів показано, що індол та його похідні утворюють важливий клас сполук. І оскільки індоли широко поширені в природі (навіть у шкірі людини), є припущення, що індол та його похідні можуть контролювати утворення біоплівки бактерій [5]. Недавні дослідження підтвердили, що похідні індолу мають багатообіцяючу антимікробну дію проти різних мікроорганізмів [1].

Тому **метою дослідження** було визначити антимікробну дію композицій на основі 3,3'-дііндоліметану (DIM) з протимікробними препаратами *in vitro* на добові біоплівки еталонних та клінічних, полірезистентних штамів мікроорганізмів.

**Матеріал та методи дослідження.** Антимікробну дію композицій досліджено на клінічних штаммах, які виділені з венфлонів, дренажних конструкцій, катетерів, з клінічного матеріалу від пацієнтів з гнійно-запальними процесами (штами ізольовані в бактеріологічній лабораторії Державної установи «Інститут дерматології та венерології Національної академії медичних наук України» та Комунального некомерційного підприємства Харківської обласної Ради «Обласна клінічна лікарня» та надані для дослідження згідно з діючими договорами) та на референтних штаммах мікроорганізмів, які одержані з Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України (табл. 1).

Ідентифікацію мікроорганізмів проводили за допомогою наборів «MIKROLATEST®». Суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин готували за допомогою електронного приладу Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema a.s., Чехія) за шкалою McFarland згідно з інструкцією до приладу. Чутливість клінічних штамів мікроорганізмів до антимікробних препаратів вивчали за допомогою мікротестсистеми з напівкількісною реєстрацією результатів «MIKROLATEST SensiLaTest MIC» (ERBA, Lahema). Після інокуляції дослідних штамів, планшети поміщали у вологу камеру в термостат при температурі 37 °C протягом 24 год (для бактерій) та 48 год (для мікроскопічних грибів). Урахування і аналіз результатів проводили за допомогою автоматичного аналізатора «Multiskan EX» (тип 355).

Синхронізація періодичних культур дослідних штамів проводилася після встановлення кінетики

росту асинхронної культури (метод Мітчисона і Вінсента). Дослідження утворення біоплівок вивчали за допомогою визначення здатності штамів бактерій до адгезії на поверхні полістиролових планшетів [6]. Культури вирощувалися за загальноприйнятими у мікробіології методами на рекомендованих для кожної родини бактерій поживних середовищах. Вимірювання оптичної щільності початкової бактеріальної суспензії проводили на «Densi-La-Meter» та доведення концентрації відповідно до ступенів за McFarland за допомогою суспензійного середовища. У якості негативного контролю вносилося 200 мкл поживного бульйону й суспензійного середовища. Кількість інокульованих планктонних клітин підраховувалася на фотометрі «Multiskan EX 355» при довжині хвилі 540 нм і виражалася в умовних одиницях оптичної щільності. Через 24 години інкубації у вологому контейнері під закритою кришкою планшета проводили підрахунок кількості клітин. Для цього у комірки вносили 200 мкл фосфатного буферу й 15 мкл 1% спиртового розчину кристалвіолету (генціанвіолету) та інкубували 45 хвилин при кімнатній температурі. Після триразового промивання фосфатним буфером у комірки для екстракції фарби з біоплівки додавали 250 мкл 96% етилового спирту та інкубували ще 45 хвилин при кімнатній температурі й вимірювали оптичну щільність цього розчину при довжині хвилі 540 нм.

Для візуалізації сформованих біоплівок мікроорганізмів їх вирощували у чашках Петрі на покривному склі. Біоплівки мікроорганізмів фарбували

Таблиця 1

## Походження дослідних (полірезистентних) та еталонних штамів

№	Клінічні штами (ізоляти)	Діагноз
1	<i>Escherichia coli</i> S:CL10TZR	перитоніт, сепсис
2	<i>Staphylococcus aureus</i> № 551	позалікарняна двобічна субтотальна пневмонія
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> № 1779	після операційна пневмонія, сепсис
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> S:CL10	легеневий абсцес
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i> № 1745	п/операц. ускладнення, сепсис
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 3	політравма, п/операц. ускладнення, сепсис
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S:CL10	ранова двобічна пневмонія
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 10	вибухова травма, гнійне п/о перац. ускладнення, перитоніт, двобічна субтотальна пневмонія сепсис
	Референс – штами	
1	<i>Escherichia coli</i> № 25922 (F50) = NCDC F 50	одержані з Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 5055 = SS B 5055	
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 27853 = NCDCF-51 (7419)	
4	<i>Staphylococcus aureus</i> № 25923 = NCDC 25923 = F-49	
5	<i>Streptococcus pyogenes</i> IBC (№ 1) = GICK 130001	
6	<i>Candida albicans</i> CCM 885	

барвником LIVE/DEAD® (Syto 9/пропідіум іодид) з розрахунку 3 мкл суміші барвника на 1 мл фізіологічного розчину (0,9% NaCl) з метою оцінки життєздатності клітин та DAPI для візуалізації ДНК, поліцукридного каркасу матриксу. Після додавання барвника до біоплівки, інкубували у темряві протягом 20 і 40 хв відповідно і переглядали у скануючому мікроскопі Leica DM LS із флуоресценцією. Довжини хвиль λ збудження/випускання для Syto 9 становлять 480/500 нм, для пропідіум йодиду – 490/635 нм, для DAPI – 555/580.

Дослідні композиції: № 1.1 (О) – Офлоксацину 0,10% 3,3'-дііндолілметану 1,00% бутилгідроксіанізолу 0,02% бутилгідрокситолуолу 0,10% макро голу 20 цетостеарилового ефіру 15,00% води до 100,00%; № 1.2 (ОК) – Офлоксацину 0,10% бутилгідроксіанізолу 0,02% бутилгідрокситолуолу 0,10% макро голу 20 цетостеарилового ефіру 15,00% води до 100,00%; № 2.1 (Д) – Діоксидину 1,00% 3,3'-дііндолілметану 1,00% бутилгідроксіанізолу 0,02% бутилгідрокситолуолу 0,10% макро голу 20 цетостеарилового ефіру 15,00% води до 100,00%; № 2.2 (ДК) – Діоксидину 1,00% бутилгідроксіанізолу 0,02% бутилгідрокситолуолу 0,10% макро голу 20 цетостеарилового ефіру 15,00% води до 100,00%; № 3 (КК) – 3,3'-дііндолілметану 1,00% бутилгідроксіанізолу 0,02%, бутилгідрокситолуолу 0,10% макро голу 20 цетостеарилового ефіру 15,00% води до 100,00%; № 4 (основа) – бутилгідроксіанізолу 0,02%, бутилгідрокситолуолу 0,10% макро голу 20 цетостеарилового ефіру 15,00% води до 100,00%.

**Результати дослідження.** У склад дослідних композицій офлоксацин був обраний тому, що він є одним з основних антибіотиків вибору при гнійно-запальних процесах, які потенційно опосередковані утворенням щільних біоплівок полірезистентними штамми з механізмом бактерицидної дії, який пов'язаний з інгібуванням активності ДНК-гірази, що призводить до припинення реплікації ДНК бактерій. Механізмом дії діоксидину є здатність активізувати процеси перекисного окислення. Препарат порушує біосинтез ДНК, спричинює глибокі структурні зміни в цитоплазмі мікробної клітини, що призводить до її загибелі. Активність діоксидину посилюється в анаеробному середовищі (при проникненні всередину біоплівки) за рахунок індукції створення активних форм кисню, що є специфічним для всіх ди-*N*-окисів хіноксаліну з протимікробною активністю, зазначений механізм дії практично виключає можливість розвитку резистентності мікроорганізмів (в тому числі їх госпітальних штамів) до діоксидину.

В результаті проведеного дослідження було встановлено, що дослідні композиції 1.1 та 2.1 виявилися ефективними по відношенню до еталонних

та клінічних штамів. Однак, залежно від походження штамів дія зразків різнилася (табл. 2). Так, композит 1.1 володів найкращою антибіоплівочною активністю по відношенню до штамів *Klebsiella pneumoniae* S:CL10, *Klebsiella pneumoniae* № 1779, *Pseudomonas aeruginosa* NCDCF-51 (7419), *Pseudomonas aeruginosa* S:CL10, *Pseudomonas aeruginosa* № 3, *Staphylococcus aureus* NCDC 25923 = F-49 та *Candida albicans* CCM 885. Після інокуляції дослідного зразка 1.1 на добові біоплівки дослідних штамів через 24 години інкубації їх щільність знижувалась у 21,1 рази *Klebsiella pneumoniae* S:CL10, у 16,7 рази *Pseudomonas aeruginosa* NCDCF-51 (7419), у 11,9 рази *Pseudomonas aeruginosa* S:CL10, у 9,6 рази *Staphylococcus aureus* NCDC 25923 = F-49, 8,2 рази *Candida albicans* CCM 885, у 5,8 рази *Pseudomonas aeruginosa* № 10 порівняно з показниками щільності контрольних біоплівок, а за впливу композиції 2.1 – щільність добових біоплівок цих штамів була знижена у 4,6 рази *Klebsiella pneumoniae* S:CL10, у 9,9 рази *Pseudomonas aeruginosa* NCDCF-51 (7419), у 6,4 рази *Pseudomonas aeruginosa* S:CL10, у 6,6 рази *Staphylococcus aureus* NCDC 25923 = F-49, 7,7 рази *Candida albicans* CCM 885, у 4,2 рази *Pseudomonas aeruginosa* № 10.

Композиція 2.1 найефективніше сприяла зниженню щільності біоплівок таких штамів, як: *Escherichia coli* № 25922, *Escherichia coli* S:CL10TZR, *Staphylococcus aureus* № 551, *Streptococcus pyogenes* IBC (№ 1), *Klebsiella pneumoniae* № 1745. Показник щільності біоплівок був знижений за дії зразку 2.1: у 10,2 рази *Escherichia coli* № 25922, у 10,4 рази *Escherichia coli* S:CL10TZR, у 9,1 рази *Staphylococcus aureus* № 551, у 8,2 рази *Streptococcus pyogenes* IBC (№ 1), у 17,7 рази *Klebsiella pneumoniae* № 1745 порівняно з показниками щільності контрольних біоплівок, а за впливу композиції 1.1 – щільність добових біоплівок цих штамів була знижена: у 9,9 рази *Escherichia coli* № 25922, у 7,4 рази *Escherichia coli* S:CL10TZR, у 7,9 рази *Staphylococcus aureus* № 551, у 3,4 рази *Streptococcus pyogenes* IBC (№ 1), у 11,8 *Klebsiella pneumoniae* № 1745.

Майже однакову протимікробну дію спричиняли дослідні зразки по відношенню до *Klebsiella pneumoniae* № 1779: за впливу зразка 1.1 щільність біоплівки була знижена у 10,8 рази, а за дії зразка 2.1 – у 10,7 рази; та *Pseudomonas aeruginosa* № 3: за впливу обох зразків щільність біоплівки знижувалась у 8,1 рази.

Антибактеріальний ефект композицій через 48 годин інкубації зростає, а через 72 години незначно знижується і відповідає показникам дослідження, проведеного через 24 години дії дослідних зразків на добові біоплівки. Цікавим є той факт, що зразок № 3 спричиняє більш виражений антимікробний ефект на ізоляти *Pseudomonas*

Таблиця 2

## Показник оптичної щільності біоплівки за впливу дослідних композитів

Дослідний штамп	M±m ( $\Delta_z$ )	K	1.1	1.2	2.1	2.2	3	4
1	2	3	4	5	6	7	8	9
24 год								
<i>Escherichia coli</i> № 25922	Середнє	3,145	0,317	0,531	0,310	0,641	0,928	1,641
	$\Delta_z$	0,404	0,130	0,184	0,050	0,177	0,261	0,395
<i>Escherichia coli</i> S:CL10TZR	Середнє	3,048	0,410	0,691	0,294	0,688	0,964	1,301
	$\Delta_z$	1,624	0,146	0,209	0,132	0,202	0,252	0,417
<i>Staphylococcus aureus</i> NCDC 25923 = F-49	Середнє	2,583	0,270	0,445	0,390	0,523	0,899	1,320
	$\Delta_z$	0,761	0,182	0,123	0,056	0,135	0,492	0,183
<i>Staphylococcus aureus</i> № 551	Середнє	3,030	0,381	0,611	0,335	0,527	0,886	1,456
	$\Delta_z$	0,562	0,214	0,400	0,035	0,114	0,114	0,278
<i>Streptococcus pyogenes</i> IBC (№ 1)	Середнє	2,938	0,869	1,031	0,359	1,102	2,032	2,116
	$\Delta_z$	0,790	0,223	0,231	0,107	0,486	1,280	0,471
<i>Candida albicans</i> CCM 885	Середнє	2,278	0,279	0,426	0,295	0,575	0,836	1,571
	$\Delta_z$	1,599	0,100	0,233	0,129	0,136	0,445	0,528
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 5055 = SS B 5055	Середнє	3,202	0,163	0,525	0,368	0,616	0,695	1,388
	$\Delta_z$	0,163	0,014	0,192	0,130	0,375	0,217	0,518
<i>Klebsiella pneumoniae</i> № 1779	Середнє	3,337	0,309	0,600	0,311	0,606	0,911	1,602
	$\Delta_z$	0,370	0,133	0,337	0,091	0,190	0,457	0,432
<i>Klebsiella pneumoniae</i> S:CL10	Середнє	3,336	0,158	0,430	0,720	0,492	0,659	1,295
	$\Delta_z$	0,203	0,099	0,060	0,188	0,332	0,217	0,427
<i>Klebsiella pneumoniae</i> № 1745	Середнє	3,397	0,289	0,578	0,192	0,501	0,718	1,579
	$\Delta_z$	0,383	0,131	0,301	0,061	0,157	0,223	0,047
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCDCF-51 (7419)	Середнє	3,253	0,195	0,722	0,329	0,515	0,671	0,951
	$\Delta_z$	0,541	0,050	0,269	0,109	0,134	0,123	0,310
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 3	Середнє	3,323	0,412	0,712	0,410	0,671	0,819	1,066
	$\Delta_z$	0,423	0,089	0,130	0,195	0,043	0,530	0,287
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S:CL10	Середнє	2,711	0,226	0,475	0,424	0,527	0,480	0,876
	$\Delta_z$	0,610	0,137	0,116	0,150	0,201	0,217	0,141
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 10	Середнє	1,593	0,277	0,394	0,380	0,675	0,449	1,128
	$\Delta_z$	0,402	0,170	0,069	0,036	0,146	0,044	0,404
48 год								
<i>Escherichia coli</i> № 25922	Середнє	3,147	0,315	0,503	0,221	0,630	0,931	1,622
	$\Delta_z$	0,396	0,130	0,249	0,047	0,157	0,285	0,429
<i>Escherichia coli</i> S:CL10TZR	Середнє	3,077	0,396	0,696	0,232	0,681	0,977	1,324
	$\Delta_z$	1,671	0,126	0,210	0,128	0,257	0,266	0,458
<i>Staphylococcus aureus</i> NCDC 25923 = F-49	Середнє	2,634	0,292	0,455	0,328	0,533	0,901	1,342
	$\Delta_z$	0,755	0,185	0,171	0,076	0,085	0,497	0,163
<i>Staphylococcus aureus</i> № 551	Середнє	3,082	0,378	0,616	0,299	0,563	0,904	1,466
	$\Delta_z$	0,562	0,199	0,414	0,041	0,123	0,151	0,292
<i>Streptococcus pyogenes</i> IBC (№ 1)	Середнє	3,041	0,876	1,048	0,319	1,115	2,021	2,207
	$\Delta_z$	0,867	0,257	0,279	0,098	0,381	1,276	0,558
<i>Candida albicans</i> CCM 885	Середнє	2,394	0,278	0,430	0,269	0,603	0,833	1,592
	$\Delta_z$	1,852	0,094	0,238	0,108	0,147	0,439	0,534
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 5055 = SS B 5055	Середнє	3,436	0,164	0,488	0,333	0,629	0,700	1,472
	$\Delta_z$	0,185	0,016	0,161	0,145	0,379	0,219	0,574
<i>Klebsiella pneumoniae</i> № 1779	Середнє	3,617	0,312	0,638	0,287	0,640	0,908	1,645
	$\Delta_z$	0,441	0,136	0,386	0,088	0,199	0,436	0,416
<i>Klebsiella pneumoniae</i> S:CL10	Середнє	3,301	0,159	0,414	0,679	0,501	0,625	1,358
	$\Delta_z$	0,209	0,101	0,049	0,070	0,312	0,077	0,484

Продовження таблиці 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i> № 1745	Середнє	3,371	0,295	0,586	0,183	0,534	0,714	1,616
	$\Delta_z$	0,371	0,130	0,297	0,056	0,147	0,222	0,072
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCDCF-51 (7419)	Середнє	3,083	0,193	0,718	0,314	0,548	0,686	0,987
	$\Delta_z$	0,514	0,046	0,268	0,101	0,143	0,143	0,302
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 3	Середнє	3,296	0,411	0,715	0,391	0,758	0,825	1,099
	$\Delta_z$	0,216	0,087	0,135	0,180	0,030	0,545	0,292
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S:CL10	Середнє	2,805	0,223	0,473	0,412	0,524	0,486	0,890
	$\Delta_z$	0,731	0,139	0,140	0,129	0,206	0,203	0,081
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 10	Середнє	1,630	0,274	0,399	0,367	0,733	0,452	1,158
	$\Delta_z$	0,413	0,166	0,094	0,051	0,191	0,046	0,442
72 год								
<i>Escherichia coli</i> № 25922	Середнє	3,237	0,313	0,546	0,280	0,641	0,926	1,626
	$\Delta_z$	0,720	0,132	0,195	0,080	0,179	0,280	0,462
<i>Escherichia coli</i> S:CL10TZR	Середнє	3,619	0,399	0,684	0,270	0,687	0,965	1,327
	$\Delta_z$	0,573	0,127	0,186	0,114	0,246	0,263	0,423
<i>Staphylococcus aureus</i> NCDC 25923 = F-49	Середнє	2,686	0,290	0,400	0,358	0,526	0,916	1,390
	$\Delta_z$	0,834	0,184	0,138	0,049	0,086	0,430	0,236
<i>Staphylococcus aureus</i> № 551	Середнє	3,129	0,375	0,600	0,315	0,552	0,909	1,502
	$\Delta_z$	0,422	0,197	0,415	0,039	0,121	0,135	0,309
<i>Streptococcus pyogenes</i> IBC (№ 1)	Середнє	3,102	0,854	1,040	0,343	1,109	2,035	2,228
	$\Delta_z$	0,950	0,215	0,252	0,087	0,392	1,259	0,535
<i>Candida albicans</i> CCM 885	Середнє	2,437	0,278	0,430	0,288	0,601	0,840	1,599
	$\Delta_z$	1,867	0,102	0,230	0,111	0,135	0,452	0,521
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 5055 = SS B 5055	Середнє	3,288	0,171	0,507	0,348	0,637	0,713	1,517
	$\Delta_z$	0,294	0,050	0,147	0,123	0,394	0,220	0,601
<i>Klebsiella pneumoniae</i> № 1779	Середнє	3,508	0,314	0,564	0,302	0,628	0,935	1,684
	$\Delta_z$	0,398	0,144	0,224	0,086	0,210	0,452	0,397
<i>Klebsiella pneumoniae</i> S:CL10	Середнє	3,402	0,158	0,426	0,714	0,477	0,630	1,410
	$\Delta_z$	0,465	0,100	0,048	0,033	0,222	0,084	0,525
<i>Klebsiella pneumoniae</i> № 1745	Середнє	3,379	0,297	0,582	0,182	0,524	0,732	1,603
	$\Delta_z$	0,331	0,149	0,298	0,069	0,150	0,222	0,147
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCDCF-51 (7419)	Середнє	3,167	0,197	0,704	0,326	0,526	0,691	0,983
	$\Delta_z$	0,492	0,050	0,302	0,111	0,127	0,149	0,303
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 3	Середнє	3,506	0,414	0,720	0,402	0,731	0,822	1,085
	$\Delta_z$	0,510	0,097	0,136	0,191	0,023	0,558	0,282
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S:CL10	Середнє	2,750	0,222	0,485	0,431	0,526	0,492	0,893
	$\Delta_z$	0,663	0,139	0,148	0,114	0,196	0,199	0,088
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> № 10	Середнє	1,631	0,274	0,399	0,379	0,717	0,447	1,151
	$\Delta_z$	0,417	0,165	0,100	0,046	0,184	0,051	0,456

Примітки.

1. Відмінність дослідних груп від контрольної –  $p < 0,001$ ;2. Відмінність дослідної групи 1.1 від 2.1 –  $p < 0,05$ .

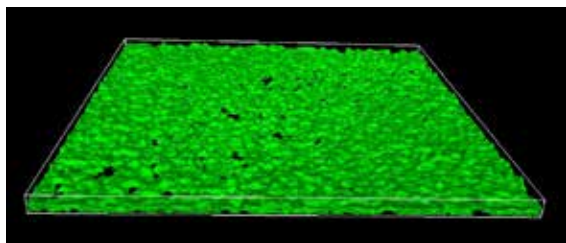
*aeruginosa* S:CL10 й *Pseudomonas aeruginosa* № 10, ніж зразок 2.2 у всі терміни спостереження, для інших штамів мікроорганізмів такий ефект не виявлено.

Серед усіх полірезистентних штамів, взятих в дослідження, найагресивнішим був ізолят *Pseudomonas aeruginosa* № 10 з танатологічного (секційного) матеріалу, тому антимікробна дія

дослідних препаратів на сформовану добову біоплівку за допомогою скануючої мікроскопії вивчалася саме на моделі *Pseudomonas aeruginosa* № 10.

За допомогою оброблення барвником LIVE/DEAD® добової біоплівки ізолятів *Pseudomonas aeruginosa* в контрольному зразку (добова сформована біоплівка *Pseudomonas aeruginosa* № 10) було візуалізовано потужний поліцукридний

матрикс щільної біоплівки, що є матеріалом, який *Pseudomonas aeruginosa* виділяють для того, щоб збудувати Quorum sensing, де поліцукрид зволожує біоплівку, утримує вологу, сорбує токсини, не пропускає протимікробні препарати (рис. 1).



**Рис. 1. Сформована добова біоплівка *Pseudomonas aeruginosa* № 10**

Введення дослідних зразків, у склад яких входить DIM у бактеріальні біоплівки призводило до руйнування (ушкодження цілісності) біоплівок *Pseudomonas aeruginosa* № 10 та спостерігалися морфологічні відмінності від контрольної добової сформованої біоплівки: танатологічний ізолят *P. aeruginosa* (планктонна форма існування) сформував кулеподібну (випуклі подовжені клітини) структуру біоплівки порівняно з більш плоскою морфологією добової біоплівки без дії препаратів.

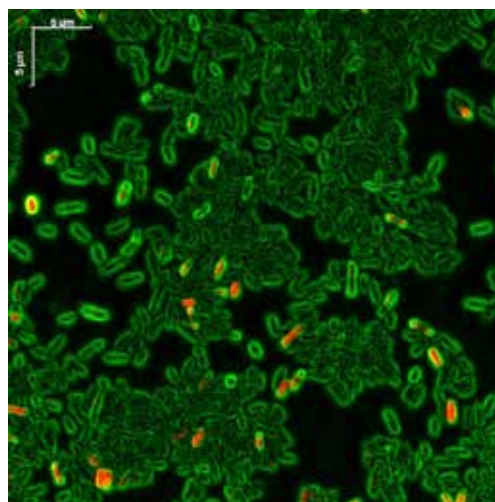
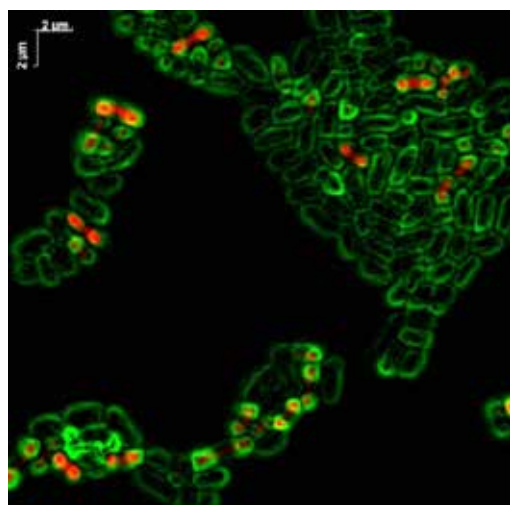
Результати додавання дослідних композицій такі: візуалізація біоплівок через 24 години після додавання офлоксацину (зразок 1.2) або діоксидіну (зразок 2.2) показала утворення біоплівки, майже подібної до такої в контролі, але було зафіксовано часткове руйнування цілісності біоплівки ізоляту *Pseudomonas aeruginosa* № 10. Додавання зразків, що містили тільки DIM (зразок 3) та розчинну основу (зразок 4) без додавання протимікробного препарату спричинили часткове руйнування добової

біоплівки. Можливо, це сталося через відрив біоплівки від поверхні, що призвело до вимивання планктонних бактерій. Синергетичне застосування DIM у комбінації з офлоксацином (зразок 1.1) або з діоксидіном (зразок 2.1) призвело до руйнування/порушення цілісності біоплівки, різниця виявилася у кількості мертвих (червоних) клітин порівняно з кількістю живих (зелених) планктонних клітин, що входили до складу кворуму (рис. 2-4).

Відповідно до цих спостережень було встановлено, що при застосуванні дослідної композиції 1.1, частка клітин з ушкодженою оболонкою складала 69,4%; а при додаванні дослідного зразку 2.1 частка клітин з ушкодженою оболонкою складала 61,8% (частка клітин з ушкодженою оболонкою контрольної біоплівки – 0,7%). Товщина контрольної біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* № 10 – 18,3 мкм, товщина біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* № 10 після впливу зразка 1.1 – 5,1 мкм, а після впливу зразка 2.1 – 6,7 мкм.

**Висновки.** Біоплівка є складною структурою, яка утворюється на поверхні слизових оболонок, ран, вогнищ запалення завдяки прикріпленню мікроорганізмів. Багато гнійно-запальних захворювань викликані антибіотикорезистентними штамми мікроорганізмів, які зазвичай формують щільні біоплівки, і це є серйозною проблемою щодо прогнозу та результату терапії.

Досліджуючи вплив DIM у складі нових композицій з антибіотиками, які найчастіше використовуються при лікуванні гнійно-запальних захворювань, на сформовані резистентними штамми щільні біоплівки, які є причиною летальних наслідків, встановлено, що композиції з DIM здатні впливати на утворені мікроорганізмами біоплівки шляхом їх руйнування. Таким чином, DIM має



**Рис. 2. Дія композицій (1.1 та 1.2) на сформовану добову біоплівку *Pseudomonas aeruginosa***

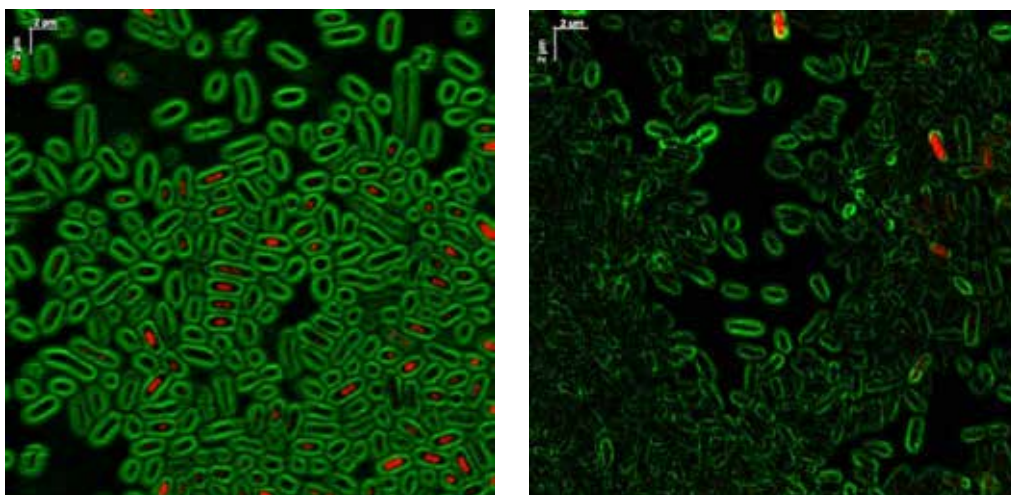


Рис. 3. Дія композицій (2.1 та 2.2) на сформовану добову біоплівку *Pseudomonas aeruginosa*

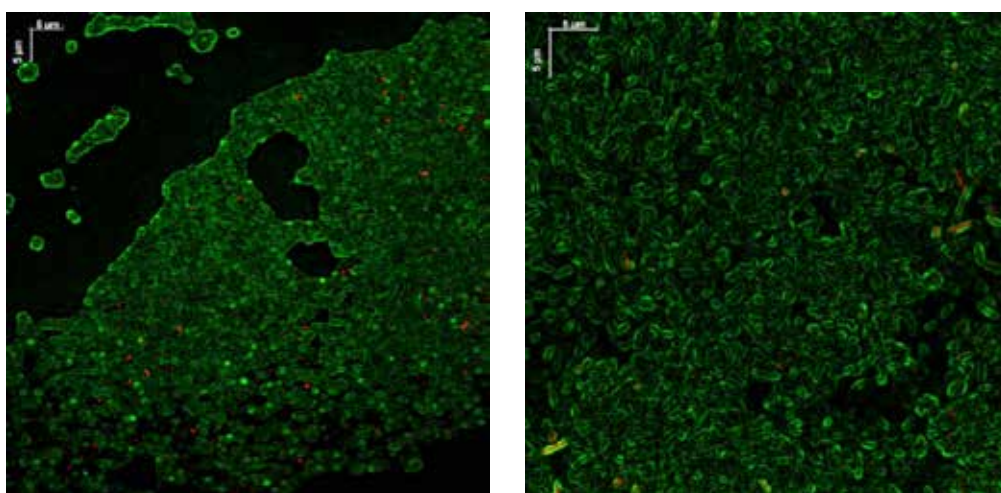


Рис. 4. Дія зразків (3 та 4) на сформовану добову біоплівку *Pseudomonas aeruginosa*

властивості, які пригнічують процес формування біоплівки та руйнувати вже сформовані щільні біоплівки.

Дослідні композиції 1.1 та 2.1 демонструють високу протимікробну ефективність *in vitro* проти всіх дослідних еталонних та полірезистентних клінічних штамів за дії на добові сформовані біоплівки, а також призводять до руйнування добових біоплівок, сформованих мультирезистентним танатологічним ізолятом *Pseudomonas aeruginosa* № 10 на 78% та 62% відповідно, але не знищують у повному об'ємі планктонні клітини, що входили до кворуму. Невідомо, чи можуть утворювати нові

біоплівки планктонні клітини, які залишилися живими після дії дослідних композицій, можливо DIM впливає на фактори патогенності бактерій, які беруть участь у формуванні біоплівок.

**Перспективи подальших досліджень.** Цікаво було би виявити стадії формування біоплівки, на яких відбувається найбільші зміни балансу мертві/живі клітини та виявити активність продукції ферментів агресії та токсинування планктонними клітинами, які піддавалися впливу композицій, що містять DIM, але залишилися живими. Це сприятиме розумінню антибіоплівкового ефекту композицій, що містять DIM.



**Література:**

1. Al-Qawasmeh R. A., Huesca M., Nedunuri V., Peralta R., Wright J., Lee Y., Young A. Potent antimicrobial activity of 3-(4,5-diaryl-1H-imidazol-2-yl)-1H-indole derivatives against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2010. Vol. 20. № 12. P. 3518–3520. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.04.137>
2. Bruyndonckx R., Adriaenssens N., Versporten A., Hens N., Monnet D. L., Molenberghs G., Goossens H., Weist K., Coenen S., ESAC-Net study group. Consumption of antibiotics in the community, European Union/European Economic Area, 1997–2017. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2021. Vol. 76. № 12 (Suppl 2). P. ii7–ii13. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab172>
3. Cook M. A., Wright G. D. The past, present, and future of antibiotics. *Science translational medicine*. 2022. Vol. 14. № 657. eabo7793. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abo7793>
4. Golberg K., Markus V., Kagan B.E., Barzanizan S., Yaniv K., Terali K., Kramarsky-Winter E., Marks R.S., Kushmaro A. Anti-Virulence Activity of 3,3'-Diindolylmethane (DIM): A Bioactive Cruciferous Phytochemical with Accelerated Wound Healing Benefits. *Pharmaceutics*. 2022 Vol. 14. № 5. P. 967. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14050967>
5. Kim Y. G., Lee J. H., Park S., Lee J. The Anticancer Agent 3,3'-Diindolylmethane Inhibits Multispecies Biofilm Formation by Acne-Causing Bacteria and *Candida albicans*. *Microbiology spectrum*. Vol. 10. № 1. e0205621. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02056-21>
6. O'Toole G. A., Kaplan H. B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annual review of microbiology*. 2000. Vol. 54. P. 49–79.
7. Rossolini G. M., Arena F., Pecile P., Pollini S. Update on the antibiotic resistance crisis. *Current opinion in pharmacology*. 2014. Vol. 18. P. 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.09.006>
8. Shirinzadeh H., Süzen S., Altanlar N., Westwell A.D. Antimicrobial Activities of New Indole Derivatives Containing 1,2,4-Triazole, 1,3,4-Thiadiazole and Carbothioamide. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*. 2018. Vol. 15. № 3. P. 291–297. <https://doi.org/10.4274/tjps.55707>
9. Theuretzbacher U., Bush K., Harbarth S., Paul M., Rex J. H., Tacconelli E., Thwaites, G. E. Critical analysis of antibacterial agents in clinical development. *Nature reviews. Microbiology*. 2020. Vol. 18. № 5. P. 286–298. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0340-0>
10. Theuretzbacher U., Piddock L. J. V. Non-traditional Antibacterial Therapeutic Options and Challenges. *Cell host & microbe*. 2019. Vol. 26. № 1. P. 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.004>
11. Tyers M., Wright G. D. Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. *Nature reviews. Microbiology*. 2019. Vol. 17. № 3. P. 141–155. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0141-x>
12. WHO priority pathogen list for R&D. 2017. URL: [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf)