

УДК 577.86:615.281.015.8:577.182.54

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология

DOI: 10.37903/vsgma.2023.1.5 EDN: CPUUVI

**ИЗМЕНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГРАМПЛОЖИТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ К ДОКСИЦИКЛИНУ В ПРИСУТСТВИИ ЦИНКА АСПАРТАТА И ТРИПТОФАНА**

© Артюх Т.В., Шейбак В.М., Островская О.Б.

*Гродненский государственный медицинский университет, 230009, Республика Беларусь, Гродно, ул. Горького, 80**Резюме*

**Цель.** Оценить эффекты L-триптофана и цинка аспартата на антибактериальную активность доксициклина по отношению к клиническим штаммам *S. aureus* и *S. haemolyticus* в состоянии планктона и в составе биопленок.

**Методика.** В ходе проведения исследования определяли минимальную ингибирующую концентрацию (МИК<sup>90</sup>) доксициклина и его комбинаций с триптофаном и цинка аспартатом по отношению к планктонным формам исследуемых штаммов *S. aureus* 2738 и *S. haemolyticus* 2642 на детекторе мутности суспензий DEN-1 Biosan. Микробные биопленки культивировали в иммунологических планшетах в статических условиях. МИК препаратов по отношению к микроорганизмам определяли по восстановлению ХТТ на основе 1% резазурина. Визуализацию биопленок осуществляли с использованием трансмиссионной электронной микроскопии JEM 1011 (JEOL, Япония). Данные исследований обрабатывали средствами MS Excel 2010, а также пакета для статистической обработки данных Statistica 10, с использованием многофакторного дисперсионного анализа.

**Результаты.** Добавление в среду культивирования триптофана и цинка аспартата в концентрациях 0,2-2000 мкг/мл повышает антибактериальную активность доксициклина в отношении планктонных форм *S. aureus* и *S. haemolyticus*  $p < 0,05$ . Добавление в среду триптофана и цинка аспартата в рабочей концентрации 1000 мкг/мл в 2 раза повышает антибактериальную активность доксициклина в отношении биопленок *S. aureus* и *S. haemolyticus* *in vitro*.

**Заключение.** Добавление триптофана и цинка аспартата повышает антибактериальный и антибиопленочный эффект доксициклина, что позволяет рассматривать их в качестве модуляторов антибактериальной активности.

*Ключевые слова:* цинка аспартат, триптофан, доксициклин, планктонные формы, биопленки

**CHANGING THE SENSITIVITY OF GRAM-POSITIVE MICROORGANISMS TO DOXYCYCLINE IN THE PRESENCE OF ZINC ASPARTATE AND TRYPTOPHAN**

Artyukh T.V., Sheibak V.M., Ostrovskaya O.B.

*Grodno State Medical University, 80, Gorkogo St., 230009, Grodno, Republic of Belarus**Abstract*

**Objective.** To evaluate the effects of L-tryptophan and zinc aspartate on the antibacterial activity of doxycycline in relation to clinical strains of *S. aureus* and *S. haemolyticus* in the state of plankton and in biofilms.

**Methods.** During the study, the minimum inhibitory concentration (MIC<sup>90</sup>) of doxycycline and its combinations with tryptophan and zinc aspartate were determined in relation to the planktonic forms of the studied strains *S. aureus* 2738 and *S. haemolyticus* 2642 on the turbidity detector of suspensions DEN-1 Biosap. Microbial biofilms were cultured in immunological tablets under static conditions. The MIC of drugs in relation to microorganisms was determined by the reduction of XT based on 1% resazurin. The biofilms were visualized using transmission electron microscopy JEM 1011 (JEOL, Japan). The research data were processed by means of MS Excel 2010, as well as a package for statistical data processing Statistica 10, using multivariate analysis of variance.

**Results.** The addition of tryptophan and zinc aspartate to the culture medium at concentrations of 0.2-2000 mcg/ml increases the antibacterial activity of doxycycline against planktonic forms of *S. aureus* and *S. haemolyticus*  $p < 0.05$ . The addition of tryptophan and zinc aspartate to the medium at a working concentration of 1000 mcg/ml increases the antibacterial activity of doxycycline against *S. aureus* and *S. haemolyticus* biofilms *in vitro* by 2 times.

**Conclusions.** The addition of tryptophan and zinc aspartate increases the antibacterial and antibiotic film effect of doxycycline, which allows them to be considered as modulators of antibacterial activity.

**Keywords:** zinc aspartate, tryptophan, doxycycline, planktonic forms, biofilms

## Введение

На сегодняшний день одной из наиболее острых проблем в области медицины является повышение резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Лечение антибиотиками прочно заняло одно из ведущих мест в комплексном лечении заболеваний, основным этиологическим фактором которых являются патогенные и условно патогенные микроорганизмы. Последствием масштабного применения антибиотиков стало появление возбудителей болезней, обладающих мультирезистентностью [10]. Результаты исследований механизмов резистентности микроорганизмов все чаще указывают на микробные биопленки, как на важнейший аспект формирования устойчивости бактерий к факторам иммунной защиты, ультрафиолету, дегидратации, вирусам, а также к антибактериальным препаратам [1]. Биопленки (Biofilms) – это микробные сообщества, окруженные защитным экзополисахаридным матриксом. 97% бактерий в естественных условиях существуют в составе биопленок. По данным CDC (Centers for Disease Control), Атланта, в 80% заболеваний бактериальной этиологии речь идет о биопленочных микробных инфекциях: тканевых и ассоциированных с медицинскими устройствами, которые с трудом поддаются лечению. Поэтому рецидивизирующую бактериальную инфекцию следует рассматривать как биопленочную инфекцию – полимикробный синдром, характеризующийся значительным увеличением анаэробной нагрузки, с возможным доминирующим патогенным штаммом [3].

О широком распространении биопленок стало известно в 2000-2010 годах, в то время, как изолированные (планктонные) формы микроорганизмов были открыты в 1676 году. В результате информационного пробела большинство накопленных знаний о свойствах микроорганизмов относятся к их планктонным формам. Допустимые значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибиотиков по 3-м мировым системам глобального мониторинга резистентности также определяются по отношению к изолированным формам микроорганизмов. Отсутствие данных о минимальных биопленкоподавляющих концентрациях (МБПК) в инструкциях по применению антибактериальных средств связано с тем, что для ингибирования микроорганизмов в составе биопленки по исследованиям *in vitro* требуются до 100 раз большие дозы антибактериальных препаратов по сравнению с их планктонными аналогами [1]. Это переводит антибиотики в неэффективные препараты для лечения биопленочных инфекций по причине токсичности.

Антибиотикорезистентность устанавливается на основании МПК, которые в свою очередь являются лишь точками вероятности успеха лечения, независимо от задействованных механизмов резистентности [10]. Существование в составе биопленок является основным механизмом выживания микроорганизмов в неблагоприятных условиях. Таким образом воздействие на микроорганизмы антибиотиками, которые эффективны лишь в отношении изолированных форм, способствует распространению антибиотикорезистентности, а также хронизации и рецидивированию инфекционных процессов. Вышесказанное диктует необходимость поиска средств, усиливающих антибактериальный эффект широко используемых антибиотиков в отношении микроорганизмов в составе биопленок.

В качестве средств, способных повышать активность антибиотиков в исследованиях *in vitro* рассматриваются биологически активные вещества (БАВ), являющихся природными соединениями и обладающих минимальной токсичностью для макроорганизма [9].

В литературе отсутствуют данные о возможном участии аминокислот в разрушении биопленки в синергизме с антибиотиками. Между тем, БАВ способны оказывать подавляющее действие на

жизнедеятельность бактерий как самостоятельные вещества (антимикробные препараты), а также в качестве адъювантов при антибактериальной терапии. Данные эффекты могут заключаться в детергентном воздействии БАВ на структурные элементы капсулы и/или цитоплазматической мембраны, либо другие функциональные компоненты бактериальных клеток [8]. В настоящее время D-аминокислоты, рассматриваются как составляющие элементы бактериальной клеточной стенки, что отражает их контроль над различными формами существования микроорганизмов (планктонными и биопленочными) [7].

Бактериальный пептидогликан, важный функциональный элемент в биосинтезе стенки бактериальной клетки, содержит в себе аминокислотные составляющие (триптофан). Кроме того, экзогенные аминокислоты, такие как метионин, триптофан и фенилаланин, при включении в бактериальный пептидогликан заменяют L-аланин в положении 1 и D-аланин в положении 4 и 5 в конечном положении, что приводит к гибели бактерий [8]. Один из возможных механизмов действия аминокислот и АМП (антимикробных препаратов) на биопленки заключается в том, что аминокислоты диспергируют микробную биопленку, высвобождая сидячие клетки, тем самым обеспечивая антибиотиком более эффективное проникновение и уничтожение микроорганизмов. Бактерии связаны с биопленкой через волокна целлюлозы, встроенные в пептидогликан клеточной стенки. Было обнаружено, что аминокислоты предотвращают образование биопленок у *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus mutans*. Включение аминокислот в пептидогликан (во время его биосинтеза) нарушает связь между микрофибриллами и микробными клетками [6].

Изучение бактериостатических эффектов биологически активных веществ по отношению к широкому спектру бактериальных патогенов и механизмов их реализации имеет первостепенное значение, с помощью которого можно повышать активность антибактериальной терапии.

Цель исследования – оценить эффекты L- триптофана и цинка аспартата на антибактериальную активность доксициклина по отношению к клиническим штаммам *S. aureus* и *S. haemolyticus* в состоянии планктона и в составе биопленок.

## Методика

Все эксперименты выполнялись в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.1890-04 для применения в микробиологических лабораториях. Интерпретацию исследований выполняли в соответствии с клиническими рекомендациями определения чувствительности микроорганизмов (версия 2018-03), основанном на стандарте, предложенном Европейским комитетом по определению чувствительности к антибиотикам (EUCAST) EDef 7.2. Используемые в исследовании штаммы были изолированы у пациентов с клиническими признаками вагинита УЗ «Гродненская университетская клиника». Идентификация и типирование микроорганизмов производилось на микробиологическом анализаторе Vitek 2 Compact фирмы «BioMérieux».

Для приготовления рабочего раствора действующих веществ использовали доксициклин в капсулах по 100 мг ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов». По воздействию на планктонные формы исследованы 4 варианта десятикратных разведений: 1 – доксициклин в концентрации (1000 – 0,1 мкг/мл); 2 – доксициклин (1000 – 0,1 мкг/мл) и триптофан (2000 – 0,2 мкг/мл); 3 – доксициклин (1000 – 0,1 мкг/мл) и цинка аспартат (2000 – 0,2 мкг/мл); 4 – доксициклин (1000 – 0,1 мкг/мл) и смесь триптофана (2000 - 0.2 мкг/мл) и цинка аспартата (2000 - 0.2 мкг/мл). МПК<sup>90</sup> доксициклина и его комбинаций с триптофаном и цинка аспартатом по отношению к планктонным формам микроорганизмов *S. aureus* 2738 и *S. haemolyticus* 2642 определяли методом серийных разведений в бульоне [5].

Использовали суточную культуру *S. aureus* и *S. haemolyticus* выращенную на скошенном мясопептонном агаре в концентрации  $1.5 \times 10^8$  колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл ед. (0,5 ед. МакФарланда) в стерильном физиологическом растворе хлорида натрия. Концентрацию микробных тел контролировали измерением оптической плотности растворов по шкале McFarland на детекторе мутности суспензий DEN-1 Biosan до и после инкубации  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , 24 часа. Затем проводили посев из пробирок на мясопептонный агар в чашки Петри для регистрации минимальной бактерицидной концентрации и оценки возможной нежелательной мутности исследуемых соединений. Экспозиция 24 ч. при  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Биопленки выращивали в системе иммунологических планшетов в статических условиях 5 суток, при  $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , время экспозиции 24 ч. по адаптированной методике, описанной Caiazza и O'Toole, для микропланшетов Qu et al., 2016. В каждую лунку вносили по 100 мкл питательного бульона Мюллера-Хинтона, 20 мкл взвеси микроорганизмов и медные сеточки для формирования биопленки и последующей просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Медные сеточки диаметром 3,5 мм, покрывали формваровой плёнкой [2].

Использовали суточную культуру микроорганизмов в концентрации 0,5 ед. МкФ. Ежедневно производили удаление планктонных форм: извлекали бульон, промывали лунки фосфатным буферным раствором (рН 7,2-7,4) затем вносили свежую питательную среду и продолжали инкубировать, а также делали отбор сеточек для исследования ультраструктуры биопленки с помощью электронного микроскопа JEM 1011 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 KV. Для изучения активности препаратов на микроорганизмы в составе биопленки на 4-е сутки после промывки поставили двойные разведения доксициклина и его комбинаций с триптофаном и цинка аспаратом: 1 – доксициклин в двойных разведениях (5000-600 мкг/мл); 2 – доксициклин в двойных разведениях (5000-600 мкг/мл) + триптофан 1000 мкг/мл; 3 – доксициклин в двойных разведениях (5000-600 мкг/мл) + цинка аспарат 1000 мкг/мл (Macia et al., 2014). Через 24 часа каждую лунку промывали буферным раствором. Производили отбор 10 препаратов-сеточек, для каждого образца и делали по 10 фотографий в последовательном случайном поле зрения электронного микроскопа. После забора сеточек, вносили свежую питательную среду и 1% раствор резазурина, регистрировали МИК. Для определения МИК исследуемых веществ на микроорганизмы в составе биопленки применяли модификацию метода определения метаболической активности биопленок с использованием анализа восстановления ХТТ (2,3-бис (2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил) -5- [карбонил (фениламино)] - 2Н-гидроксид тетразолия) на основе 1% резазурина (Alamar Blue) по методике, описанной Pierce et al.

Величины МИК воздействующих веществ по отношению к планктонным формам и микроорганизмам в составе биопленок выражали в мкг/мл. Показатели бактериального роста выражали в ед. МкФ (при необходимости результаты могут быть переведены в КОЕ). Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью пакетов прикладных программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 10 с использованием многофакторного дисперсионного анализа. Различия между сравниваемыми параметрами считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты исследования и их обсуждение

Эффекты присутствия триптофана и цинка аспартата на чувствительность планктонных форм *S. aureus* и *S. haemolyticus* к доксициклину представлены на рис. 1 и 2.

Доксициклин ингибирует рост планктонной формы *S. aureus* в концентрациях 1000-100 мкг/мл. При снижении концентрации до 10-0,1 мкг/мл наблюдается обратный эффект, стимуляция роста бактериальной культуры (до 3,0 ед. МкФ) ( $9 \times 10^8$  КОЕ) ( $p < 0,05$ ) при контроле 1,9 ед. МкФ. Триптофан и цинка аспарат оказывают модулирующее действие на чувствительность к доксициклину, во всех исследуемых концентрациях (рис. 1).

Наиболее значимые различия в эффектах присутствия триптофана и цинка аспартата на чувствительность *S. aureus* наблюдаются при воздействии доксициклина 1 мкг/мл и БАВ 2 мкг/мл (рис.1). *S. aureus* проявляет наибольшую чувствительность в данной концентрации к доксициклину в присутствии цинка аспартата, мутность бактериальной культуры 0,54 [0,44; 0,54] ед. МкФ или  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем 1,9 ед.; к доксициклину в присутствии триптофана 1,62 [0,52; 0,72] ед. МкФ или  $4,5 \times 10^8$  КОЕ/мл ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем 1,9 ед. МкФ.; к доксициклину в присутствии смеси триптофана и цинка аспартата 1,86 [1,76; 1,96] ед. МкФ или  $5 \times 10^8$  КОЕ/мл ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем 1,9 ед. МкФ; в присутствии доксициклина рост *S. aureus* составил 3,02 [2,92; 3,12] ед. МкФ или  $9 \times 10^8$  КОЕ/мл ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем 1,9 ед. МкФ (рис.1). Самой эффективной среди 4-х комбинаций препаратов в концентрации доксициклин/БАВ 1/2 мкг/мл является доксициклин с цинка аспаратом, в сравнении с доксициклином данная комбинация эффективнее на 83%; комбинация с триптофаном увеличивает эффективность доксициклина по отношению к *S. aureus* на 47%; комбинация со смесью триптофана и цинка аспартата на 39% (рис. 1)

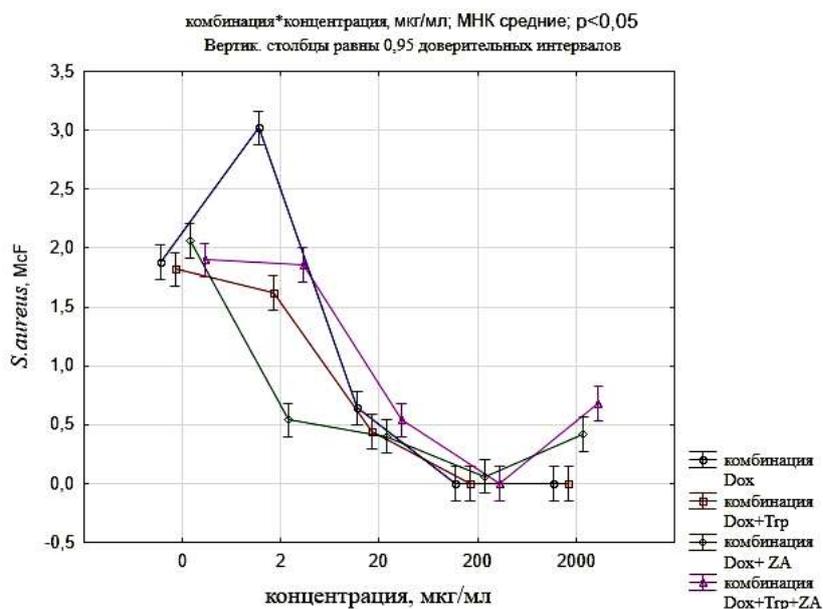


Рис. 1. График зависимости роста *S. aureus* от комбинаций препаратов и их концентраций

На рост планктонной формы *S. haemolyticus* доксициклин проявляет ингибирующий эффект в концентрации 100 мкг/мл (таб. 1). Наиболее значимые эффекты БАВ также наблюдается в концентрации 2 мкг/мл. *S. haemolyticus* проявляет наибольшую чувствительность в данной концентрации к доксициклину в присутствии смеси триптофана и цинка, мутность бактериальной культуры 0,76 ед. [0,70; 0,80] ед. МкФ ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем 2,33 [2,20; 2,46] ед. МкФ; на втором месте по эффективности комбинация доксициклин + смесь триптофана и цинка аспартата 0,88 [0,80; 0,90] ед. МкФ ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем 2,33 ед. МкФ; в присутствии цинка аспартата, мутность бактериальной культуры 1,20 [0,44; 0,54] ед. МкФ ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем 2,33 ед. МкФ; в присутствии доксициклина рост составил 1,38 [1,30; 1,40] ед. МкФ ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем 2,33 ед. МкФ (рис. 2).

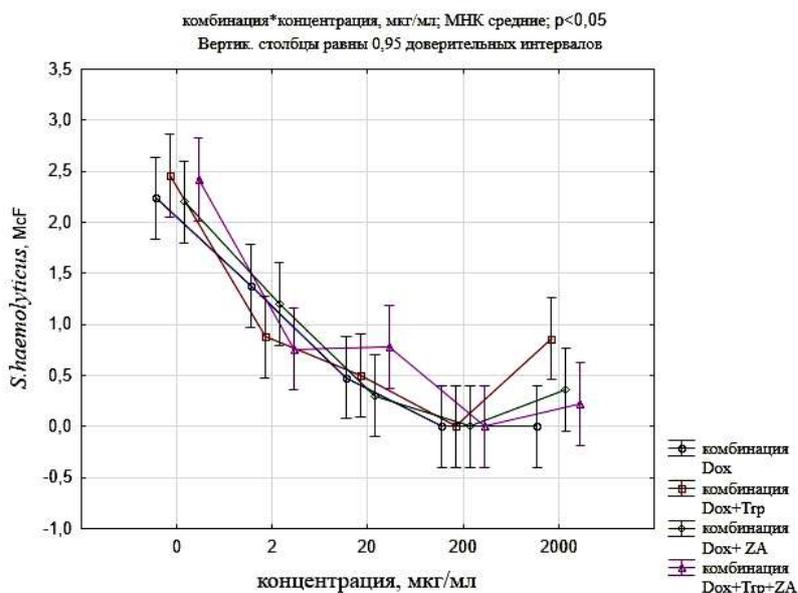


Рис. 2. График зависимости роста *S. haemolyticus* от комбинаций препаратов и их концентраций

Наиболее выраженный антибактериальный эффект триптофана и цинка аспартата по отношению к *S. haemolyticus* наблюдается в комбинации доксициклина со смесью триптофана и цинка аспартата в концентрации 2 мкг/мл. является. В сравнении с доксициклином данная комбинация эффективнее на 45%; комбинация с триптофаном увеличивает эффективность доксициклина на 37%; комбинация с цинка аспартатом увеличивает эффективность доксициклина на 14% (рис. 2). Эффекты присутствия триптофана, цинка аспартата, а также смеси (триптофан+ цинка аспартат) на чувствительность *S. aureus* и *S. haemolyticus* в составе моно- и микст-биопленок отражены на рисс. 3 и 4, в табл. 1.

Электронно-микроскопическое изучение микроорганизмов: *S. aureus* 2738 и *S. haemolyticus* 2642 показало, что они способны образовывать био пленки (рис. 3).

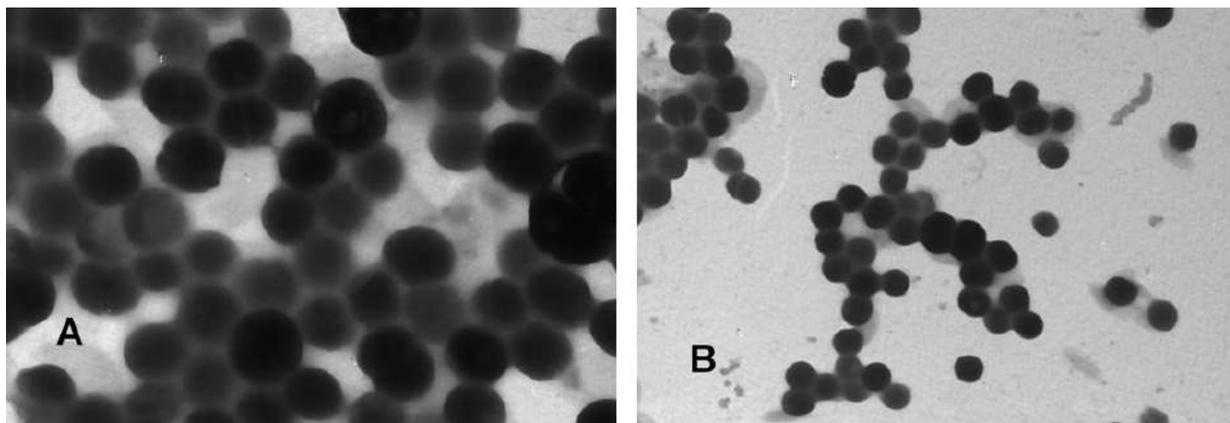


Рис. 2. Образцы 5-дневных био пленок; А – монобио пленка *S. aureus* + доксициклин 600 мкг/мл; Мерный отрезок равен 1 мкм; В – монобио пленка *S. aureus* + доксициклин 600 мкг/мл + триптофан 1000 мкг/мл; Мерный отрезок равен 2 мкм

Очевидно образование электронноплотных структур с обильным количеством клеток, адгезированных к поверхности формваровой пленки и друг к другу. Кокки в био пленке объединены рыхлым внеклеточным веществом (полисахаридные фибриллы и внеклеточная ДНК). Признаками образования истинной био пленки в отличие от колоний микроорганизмов на агаре является наличие внеклеточного матрикса, а также адгезия - образование био пленки (обратимая и необратимая стадии) [3]. Данные признаки обнаруживаются и при микроскопии моделей био пленок (рис. 3). Морфологические исследования показывают, что образцы био пленок, которые культивировали с доксициклином в присутствии 1000 мкг/мл БАВ (2, 3 препараты) имеют признаки более обширного разрушения по сравнению с био пленками, подвергшимися воздействию только доксициклина. Доксициклин в присутствии триптофана и цинка аспартата вызывал выраженную деградацию био пленки, деформацию бактериальных клеток, отсутствие клеток в стадии деления и исчезновение экзополисахаридного матрикса.

ХТТ тест выявил следующие закономерности: МИК доксициклина для био пленок *S. aureus*, *S. haemolyticus* 1200 мкг/мл; МИК доксициклина с триптофаном 1000 мкг/мл  $\leq$  600 мкг/мл; МИК доксициклина с цинка аспартатом 1000 мкг/мл  $\leq$  600 мкг/мл; МИК доксициклина в присутствии смеси триптофана 1000 мкг/мл и цинка аспартата 1000 мкг/мл  $\leq$  600 мкг/мл. Комбинация доксициклина с триптофаном, цинка аспартатом, смесью триптофана и цинка аспартата 1000 мкг/мл в 2 раза повышает чувствительность *S. aureus*, *S. haemolyticus* в составе био пленок (рис. 4, табл. 1).

Результаты данного исследования показывают, что БАВ (триптофан и цинка аспартат) напрямую или через адьювантный эффект повышают активность доксициклина по отношению к планктонным и их био пленочным формам *S. aureus* и *S. haemolyticus*. Степень повышения чувствительности к доксициклину зависит от вида микроорганизма, его формы существования (планктонная или био пленочная), комбинации БАВ (триптофан, цинка аспартат, смесь) и концентрации БАВ. Также необходимо отметить отсутствие синергетических эффектов триптофана и цинка аспартата (комбинация 4) в повышении эффективности антибактериального эффекта доксициклина по отношению к планктонной форме *S. aureus* и его вероятное наличие по отношению к планктонной форме *S. haemolyticus*



Рис. 4. ХТТ анализ в модификации с 1% резазурином при экспозиции 3 часа

Таблица 1. Эффект добавления БАВ (1000 мкг/мл) на чувствительность к доксициклину *S. aureus*, *S. haemolyticus* в составе биопленок при экспозиции 60 минут

Состав биопленки	Контроль (м/о без препаратов)	1. Дох 1200/600 мкг/мл	2. Дох+Трп 1200/600 мкг/мл	3. Дох+ЗА 1200/600 мкг/мл	4. Дох+Трп+ЗА 1200/600 мкг/мл
N	3	3	3	3	3
<i>S.aureus</i>	P	C*/P#	C*/C*	C*/C*	C*/C*
<i>S.haemolyticus</i>	P	C*/P#	C*/C*	C*/C*	C*/C*
<i>S.aureus</i> + <i>S.haemolyticus</i>	P	C*/P#	C*/C*	C*/C*	C*/C*

Примечание: P – розовый цвет; C – синий цвет; достоверные изменения в сравнении с контролем (\*); с группой 2, 3, 4 мкг/мл (#)

Установленные закономерности могут быть использованы в качестве теоретической основы для разработки способов повышения эффективности АМП в терапии бактериальных инфекций, биопленочных инфекций (непосредственно тканевых и опосредованных инфекций, связанных с колонизацией патогенов на поверхности медицинских устройств и катетеров). А также для более четкого понимания функционирования и роли микробных биопленок в течении инфекционных процессов.

## Выводы

1. Исследуемые клинические изоляты: *S. aureus* 2738 и *S. haemolyticus* 2642 способны образовывать биопленки.
2. Триптофан и цинка аспартат в концентрации 2 мкг/мл повышают антимикробную активность доксициклина по отношению к планктонным формам *S. aureus* и *S. haemolyticus*.
3. Триптофан и цинка аспартат в концентрации 1000 мкг/мл по результатам изображений ПЭМ и ХТТ анализа способствуют разрушению биопленок *S. aureus* и *S. haemolyticus*.

## Литература (references)

1. Артюх Т. В. Особенности резистентности клинических изолятов *E.coli* и *C.albicans* образующих биопленку // Вестник Витебского Государственного Медицинского Университета. – 2021. – Т. 20, № 1. – С. 46-54. [Artjuh T.V. Vestnik Vitebskogo Gosudarstvennogo Medicinskogo Universiteta. Vitebsk State Medical University Bulletin. – 2021. – V.20, N1. – P. 46-54. (in Russian)]

2. Головин С.Н., Титова С.В., Симонова И.Р. Способ получения образцов биоплёнок холерных вибрионов для исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии // Патент РФ на изобретение №218.016.7736 Опубликовано 02.08.2018. Бюллетень №22. [Golovin S.N., Titova S.V., Simonova I.R. Sposob polucheniya obrazcov biopljonok holernyh vibrionov dlja issledovaniya metodom transmissionnoj jelektronnoj mikroskopii. Method for obtaining samples of biofilms of *Vibrio cholerae* for study by transmission electron microscopy // Patent of Russian Federation N218.016.7736. Publication 02.08.2018. Bulletin N22. (in Russian)]
3. Каркимбаева Г.А. Биопленка, как один из факторов высокой вирулентности микроорганизмов, выделенных из системы корневых каналов у детей // Вестник Казахского Национального Медицинского Университета. – 2014. – №2. – С. 153-157. [Karkimbaeva G.A. *Vestnik Kazahskogo Nacional'nogo Medicinskogo Universiteta*. Bulletin of the Kazakh National Medical University. – 2021. – N2. – P. 153-157. (in Russian)]
4. Марданова А.М. Биопленки: основные принципы организации и методы исследования. – Казань: Инстит. фонд. мед. и биол., 2016. – 44 с. [Mardanova A.M. *Bioplenki: osnovnye principy organizacii i metody issledovaniya*. Biofilms: basic principles of organization and research methods. – Kazan: Institute. fund. med. and biol., 2016. – 44 p. (in Russian)]
5. Тапальский Д.В., Бильский И.А. Определение чувствительности к антибиотикам методом микроразведений в бульоне: модификация, доступная для всех // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия – 2017. – Т. 20, № 1. – С. 62-67. [Tapal'skij D.V., Bil'skij I.A. "*Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*". *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. – 2017. – Vol. 20, N1. – P. 62-67. (in Russian)]
6. Chen D. et al. Characteristics and influencing factors of amyloid fibers in *S. mutans* biofilm // *AMB Express*. – 2019. – Vol. 9, N1. – P. 1145-1156.
7. Chen X. Influence of biofilm growth age, media, antibiotic concentration and exposure time on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm removal in vitro // *BMC Microbiology*. 19.12.21. URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7444035/>.
8. Idrees M. Multimodal Role of Amino Acids in Microbial Control and Drug Development // *Antibiotics*. 21.12.21. URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7345125/>.
9. Gallego-Hernandez A.L. et al. Upregulation of virulence genes promotes *Vibrio cholerae* biofilm hyperinfectivity // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2020. – V. 117, N20 – P. 11010-11017.
10. Teresa G.G. Antibiotic resistance: Time of synthesis in a post-genomic age // *Computational and Structural Biotechnology Journal*. – 2021. – V.19. – P. 3110-3124.

### Информация об авторах

*Артюх Татьяна Валерьевна* – магистр медицинских наук, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга, Гродненский Государственный Медицинский Университет. E-mail: [taniaartsikh@gmail.com](mailto:taniaartsikh@gmail.com)

*Шейбак Владимир Михайлович* – доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга, Гродненский Государственный Медицинский Университет. E-mail: [vsheibak@gmail.com](mailto:vsheibak@gmail.com)

*Островская Оксана Борисовна* – кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга, старший научный сотрудник группы морфологии с электронной микроскопией научно-исследовательской лаборатории, Гродненский Государственный Медицинский Университет. E-mail: [Astrowskaja@gmail.com](mailto:Astrowskaja@gmail.com)

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.