БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

DOI: <https://doi.org/10.32839/2304-5809/2021-6-94-25>

УДК 615.281.9+579.61+579.841.1

Гринчук Н.І., Бойко І.О., Вринчану Н.О.

ДУ «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України»

АНТИБІОПЛІВКОВА АКТИВНІСТЬ МЕРОПЕНЕМУ ЩОДО *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Анотація. Не дивлячись на багаточисельні дослідження біоплівки, їх структури, фізіологічних особливостей, проблема терапії пацієнтів з біоплівковими інфекціями залишається актуальною. Обмежена кількість препаратів з антибіоплівковою дією спонукає до пошуку нових сполук з виразною активністю та потребує оцінки специфічної активності впроваджених в клінічну практику антимікробних засобів. Дослідження показали, що представник карбапенемів меропенем порушує плівкоутворення *P. aeruginosa*, обумовлює деструкцію сформованих біоплівок, що підтверджується зменшенням біомаси та кількості життєздатних клітин. За дії меропенему у концентрації 2,0 МІК спостерігається зменшення вмісту загальних полісахаридів, Pel-полісахариду та білка у матриці біоплівок *P. aeruginosa*.

Ключові слова: антимікробні препарати, меропенем, біоплівки, *P. aeruginosa*, матрикс.

Hrynychuk Nataliia, Boiko Iryna, Vrynchanu Nina

SI «Institute of Pharmacology and Toxicology
of National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

ANTIBIOFILM ACTIVITY OF MEROPENEM FOR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Summary. Despite numerous investigations of biofilms, their structure and physiological features, the problem of therapy for patients with biofilm infections remains relevant. A limited number of drugs with antibiofilm activity motivates the search for new compounds, as well as a study of specific inhibitory properties of antimicrobial agents developed and introduced into the clinical practice. Research has shown that meropenem, an antimicrobial drug of the carbapenem group, is active at different stages of *P. aeruginosa* biofilm formation. Meropenem disturbs *P. aeruginosa* biofilm formation: the biomass decreases at 0.5 MIC and 5.0 MIC by 29.0% and 71.9%, respectively. The obtained data are confirmed by the study results using the redox indicator resazurin: at 5.0 MIC viable *P. aeruginosa* cells were not detected. With a decrease in the drug's concentration to 2.0 MIC and 0.5 MIC, a count of metabolically active cells increases by 85.4% and 40.6%, respectively. When exposed to the formed 5-day biofilms, a decrease in the biomass by 71.7% (0.5 MIC) and 48% (5.0 MIC) is recorded, a count of viable cells was 58.9% and 23.8% at 0.5 MIC and 5.0 MIC, respectively. The fluorescence microscopy results showed that meropenem at 5.0 MIC decreased *P. aeruginosa* cells number in the field of view and increased the number of unviable cells (their share reached 27.2%) in comparison with control. Experiments have shown that meropenem affects the structural components of the *P. aeruginosa* biofilm matrix: the content of protein components decreases by 35.4%, total polysaccharides – by 35.6%, Pel polysaccharide – by 48.4%. The antibiofilm effect of meropenem may be due to the action on specific and non-specific adhesion factors (in particular on swimming, swarming and twitching motility of *P. aeruginosa*, which is provided by pili and flagella), Quorum sensing systems (QS), production of the structural components of the matrix. The preservation of the viability of *P. aeruginosa* cells in the formed biofilm is possibly associated with the insufficient susceptibility of metabolically inactive persister cells to the action of the drug, which requires further in-depth study.

Keywords: antimicrobial drugs, meropenem, biofilms, *P. aeruginosa*, matrix.

Постановка проблеми. *P. aeruginosa* – опортуністичний патоген людини, що обумовлює інфекції шкіри та м'яких тканин, органів дихання, сечовидільної системи, ускладнює перебіг післяопераційних ран, є однією із причин виникнення нозокоміальних інфекцій [1; 2]. Синьогнійна паличка колонізує поверхні виробів медичного призначення, спричиняючи девайс-асоційовані інфекції. *P. aeruginosa* зумовлює гострі та хронічні захворювання, останні – завдяки своїй здатності утворювати біоплівки, яким властиві толерантність та стійкість до антимікробних агентів [3–5]. Бактерії, у т.ч. і *P. aeruginosa*, у біоплівках менш чутливі до дії антимікробних препаратів (АМП), виживають за дії у концентраціях, що у 100-1000 разів перевищують мінімальні інгібуючі щодо планктонних клітин. Зниження

активності АМП щодо біоплівкових мікроорганізмів обумовлено обмеженою дифузією препаратів, їх інактивацією, наявністю метаболічно неактивних персистируючих клітин, систем Quorum sensing тощо [6].

Сучасна антимікробна терапія (вибір препаратів, дозування, схеми застосування) ґрунтується на даних чутливості патогена до АМП у планктонній формі. Але відмінності у структурі, фізіології та генетиці планктонних клітин та клітин у складі біоплівки потребують перегляду підходів щодо діагностики, оцінки ефективності сучасних антимікробних хімотерапевтичних засобів та розробки нових стратегій лікування пацієнтів. Одним із препаратів, рекомендованих для застосування при позалікарняних та нозокоміальних інфекціях, викликаних *P. aeruginosa*,

е меропенем [7; 8]. В інструкції для медичного застосування меропенему інформація щодо антибіоплівкової активності відсутня.

Аналіз останніх досліджень і публікацій.

Меропенем – представник β -лактамів з високою активністю щодо неферментуючих грамнегативних бактерій, антибіотик першого ряду для лікування пацієнтів з муковісцидозом, ускладненим *P. aeruginosa* [6]. Механізм дії меропенему щодо планктонних клітин бактерій зумовлений порушенням синтезу компоненту клітинної стінки пептидоглікану, що призводить до осмотичного лізису бактерій. Згідно з [7; 9], меропенем у терапевтичних дозах обумовлює зміни структури біоплівки, впливаючи на клітини поверхневих шарів, при цьому клітини нижніх кластерів залишаються життєздатними [10].

Перехід *P. aeruginosa* із планктонного способу росту в стан біоплівки забезпечують адгезини та компоненти позаклітинного матриксу (полісахариди, білки, позаклітинна ДНК, ліпіди), синтез яких регулюється вторинним месенджером *c*-di-GMP (циклічний ді-гуанозин-5'-монофосфат) [11; 12].

Більшість штамів здатні синтезувати три екзополісахариди – Pel, Psl та альгінат, які відіграють роль у формуванні біоплівки як компоненти матриксу. Складовими можуть бути також позаклітинна ДНК, білки, такі як пілі типу IV, фімбрії, адгезини CdrA, лектини LecAB та амілоїдні волокна Fap. У формуванні мікроколоній біоплівки *P. aeruginosa* приймають участь і рамноліпіди. Аналіз даних літератури показав, що меропенем здатен порушувати структуру матриксу біоплівки, впливати на Pel та Psl полісахариди [13; 14].

Виділення не вирішених раніше частин загальної проблеми. Розуміння впливу сучасних антимікробних хіміотерапевтичних засобів на формування біоплівок та їх здатність до деструкції сформованої біоплівки має велике значення, оскільки дозволить раціонально використовувати препарати при біоплівкових інфекціях. У доступних літературних джерелах детальний чи узагальнений опис механізму антибіоплівкової дії меропенему щодо синьогнійної палички відсутній.

Мета статті – оцінити вплив меропенему на різні етапи формування біоплівок *Pseudomonas aeruginosa*.

Виклад основного матеріалу дослідження. У дослідженнях використано клінічний штам *P. aeruginosa* 449, виділений від пацієнта з гнійно-запальним процесом. Штам резистентний до цефепіму та тетрацикліну, помірночутливий до цефтриаксону, цефотаксиму та меропенему, чутливий до азтреонаму, цефоперазону, амікацину, гентаміцину та ципрофлоксацину.

Досліджувані антимікробні препаратом слугував Меропенем (*Meropenem*, порошок для розчину для ін'єкцій), виробництва АО «Лекхім-Харків», Україна.

Вплив меропенему на плівкоутворення та сформовані біоплівки *P. aeruginosa* визначали на полістиролових планшетах згідно з [15]. Для приготування інокуляту нічну культуру розводили у триптон-соевому бульйоні (TSB) у 100 разів (1:100). Для вивчення впливу препарату на плівкоутворення розчини меропенему (0,5 МІК та 5,0 МІК) вносили у лунки планшета одночасно з інокулятом, щодо сформованих біоплі-

вок – на 5-у добу експерименту. Термін інкубації становив 24 год при 37°C. Після закінчення інкубації вміст лунок видаляли, лунки тричі промивали дистильованою водою, вносили 0,1 % розчин генціанвіолету та витримували (10-15) хв. Барвник екстрагували 96,0 % етанолом протягом 15 хв та реєстрували результати на «Adsorbance Microplate Reader ELx800» (BioTek, США) при довжині хвилі 630 нм. Контролем слугували інтактні культури мікроорганізмів, вирощені за тих самих умов без впливу препарату.

Життєздатність клітин *P. aeruginosa* на етапі плівкоутворення та зрілих біоплівок визначали за допомогою окисно-відновного індикатора резазурину згідно з [16]. Інокулятом слугувала нічна культура, розведена у 100 разів (1:100) у ПС TSB. Для вивчення впливу меропенему на життєздатність мікроорганізмів на етапі плівкоутворення, внесення розчинів препарату (0,5 МІК, 2,0 МІК та 5,0 МІК) та культур проводили одночасно, у складі сформованих біоплівок – на 5-у добу експерименту. Після інкубації впродовж 24 год при 37°C вміст лунок видаляли, промивали двічі фосфатним буфером (pH 7,2 $\pm$ 0,2), додавали 200 мкл TSB та 10 мкл розчину резазурину (0,5 мкг/лунка). Отримані результати реєстрували на флуоресцентному спектрофотометрі «HITACHI, MPF-3» (Японія) при λ_{ex} 550 нм – λ_{em} 590 через 30 хв інкубації у темряві за кімнатної температури.

Вплив меропенему (5,0 МІК) на життєздатність бактеріальних клітин у складі зрілих біоплівок досліджували також методом флуоресцентної мікроскопії з використанням барвників акридинового оранжевого та пропідій йодиду згідно з [17]. Біоплівки вирощували протягом 120 год за 37°C на поверхні пластикових чашок Петрі. Термін інкубації меропенему зі сформованими біоплівками – 24 год при 37°C. Біоплівки синьогнійної палички забарвлювали розчином акридинового оранжевого (5 мкг/мл) та пропідій йодиду (3 мкг/мл) впродовж 10 хв у темряві за кімнатної температури. Результати реєстрували на флуоресцентному мікроскопі «Olympus BX-41» (Японія). Кількісний підрахунок життєздатних клітин здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «BioFilm Analyzer v.1.0» згідно з [18].

Для оцінки впливу меропенему на вміст компонентів матриксу біоплівок, *P. aeruginosa* вирощували у середовищі РІ за наявності або відсутності препарату (2,0 МІК) впродовж 48 год за 37°C. Після цього клітини осаджували центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 15 хв та відмивали 0,9 % розчином NaCl. Екстракцію білка та полісахаридів проводили у 1,5 М розчині NaCl [19].

Визначення вмісту білка у матриксі біоплівок проводили за методом Lowry згідно з [20]. Результати реєстрували на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 750 нм. Концентрацію білка визначали за стандартною калібрувальною кривою, побудованою за бичачим сироватковим альбуміном («Fluka»).

Кількісне визначення полісахаридів у матриксі біоплівок бактерій здійснювали згідно з Dubois et. al. [21]. Оцінку результатів проводили при 490 нм за допомогою спектрофотометра для мікропланшет «Absorbance Microplate Reader ELx800» (BioTek, США) за стандартною кривою, побудованою за глюкозою.

Вплив меропенему (0,5 МІК та 2,0 МІК) на продукцію Pel-полісахариду *P. aeruginosa* визначали за рівнем зв'язування компонента матриксу біоплівки з Конго червоним [22]. Культуру вирощували за наявності або відсутності препарату (0,5 та 2,0 МІК) в інкубаційному середовищі впродовж 48 год за 37°C. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням при 3000 об/хв. протягом 30 хв. До суспензії клітин ($OD_{600} = 0,3$) додавали 20 мкг/мл розчину Конго червоного та інкубували протягом 90 хв за 37°C. Культуру бактерій і зв'язаний Конго червоний осаджували шляхом центрифугування при 8000 об/хв протягом 10 хв. Кількість незв'язаного барвника реєстрували при 490 нм на «Adsorbance Microplate Reader ELx800» (BioTek, США). Концентрацію Конго червоного розраховували за стандартною калібрувальною кривою.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою методу ANOVA (критерії Ньюмена-Кейлса та Тьюкі) у комп'ютерній програмі «Statistica 6.0» (StatSoft. Inc., USA). Вірогідними вважалися відмінності при рівні значущості $p < 0,05$. Дані досліджень представлені як $M \pm m$, де M – середнє значення, m – стандартна помилка середнього.

Дослідження антибіоплівкової дії меропенему проводили у концентраціях 0,5 МІК; 2,0 МІК

та 5,0 МІК, враховуючи його інгібуючу активність щодо планктонних клітин *P. aeruginosa* 449 (МІК – 2,5 мкг/мл).

Результати проведених експериментів показали (рис. 1), що меропенем порушує плівкоутворення та обумовлює деструкцію сформованих біоплівок *P. aeruginosa* 449.

Встановлено, що меропенем при 0,5 МІК та 5,0 МІК дозозалежно порушує процес формування біоплівки, інгібіція плівкоутворення становить 29,0% та 71,9% відповідно ($p < 0,05$). Подібний ефект препарату спостерігався і за впливу на сформовані 5-добові біоплівки, за дії у концентрації 0,5 МІК біомаса зменшується на 71,7%, при 5,0 МІК – на 48,0% ($p < 0,05$). Отримані результати свідчать, що меропенем виявляє антибіоплівкову активність на різних етапах плівкоутворення, що може бути зумовлено впливом на системи Quorum sensing (QS), фактори адгезії, продукцію компонентів матриксу.

Здатність меропенему руйнувати сформовані біоплівки *P. aeruginosa* підтверджується даними експериментів з використанням окисно-відновного індикатора резазурину. Отримані дані (рис. 2) свідчать, що меропенем у субінгібуючій концентрації (0,5 МІК) знижує кількість життєздатних клітин *P. aeruginosa* у зрілій біоплівці на 41,1%. Частка метаболічно активних клітин

Рис. 1. Вплив меропенему на плівкоутворення та сформовані біоплівки *P. aeruginosa* 449 (% утвореної біоплівки)

Примітка: «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$).

Рис. 2. Життєздатність клітин *P. aeruginosa* 449 за дії меропенему на етапі плівкоутворення та сформованої біоплівки (% метаболічно активних клітин)

Примітка: «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$).

Рис. 3. Життєздатність клітин зрілої біоплівки *P. aeruginosa* за дії меропенему. Флуоресцентна мікроскопія, збільшення $\times 1000$

Примітка: «зелене забарвлення» – живі клітини; «червоне забарвлення» – мертві клітини.

Рис. 4. Вміст компонентів матриксу (%) у біоплівці *P. aeruginosa* 449 за дії меропенему

Примітка: «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$).

за дії препарату у концентраціях 5,0 МІК та 2,0 МІК становить 23,8% та 43,7% відповідно ($p < 0,05$ порівняно з контролем).

Результати дослідження впливу препарату на життєздатність клітин на етапі плівкоутворення (рис. 2) показали, що при 5,0 МІК спостерігається повне пригнічення життєздатності клітин. Зниження концентрації до 2,0 МІК та 0,5 МІК призводить до збільшення кількості метаболічно активних клітин на 85,4% та 40,6% відповідно ($p < 0,05$).

Згідно з даними флуоресцентної мікроскопії, у контролі клітини *P. aeruginosa* формували щільний однорідний шар, що складався з життєздатних клітин (рис. 3). За дії меропенему у концентрації 5,0 МІК відмічено зменшення загальної кількості клітин у полі зору та появу нежиттєздатних мікроорганізмів (рис. 3, табл. 1).

Отримані дані (табл. 1) свідчать, що за дії меропенему кількість клітин у зрілій біоплівці, сформованій *P. aeruginosa*, знижується на 92,0% (порівняно з контролем), частка життєздатних клітин складає 72,8%.

Антибіоплівковий ефект меропенему щодо сформованих біоплівок синьогнійної палички може бути пов'язаний з впливом на компоненти матриксу – білок, полісахариди, еДНК.

Отримані результати щодо впливу меропенему на продукцію білка *P. aeruginosa* показали (рис. 4), що за дії препарату у концентрації 2,0 МІК вміст білкових компонентів у матриксі біоплівок зменшується на 35,4% (порівняно з контролем).

За дії меропенему (2,0 МІК) відмічено зменшення вмісту загальних полісахаридів у матриксі біоплівки синьогнійної палички на 35,6%, Pel-полісахариду – на 48,4%.

Таким чином, згідно отриманих результатів проведеного дослідження, меропенем здатен порушувати плівкоутворення *P. aeruginosa*, що підтверджується зменшенням біомаси утвореної біоплівки. Цей ефект може бути обумовлений впливом меропенему на специфічні та неспецифічні фактори адгезії, зокрема на рухливість синьогнійної палички (твічінг, свіммінг, свор-

Таблиця 1

Вплив меропенему на життєздатність клітин 5-добової біоплівки *P. aeruginosa*

Умови експерименту	Кількість клітин біоплівки у полі зору	
	абсолютна кількість, од	з них життєздатних, %
Контроль культури	11543 $\pm$ 2560	91,1 $\pm$ 3,7
Меропенем, 5,0 МІК	982 $\pm$ 270*	72,8 $\pm$ 7,4

Примітка: «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$).

мінг), що забезпечується пілями та джгутіками. Нашими попередніми дослідженнями встановлено, що у більшій мірі препарат порушує твічінг та свормінг міграції, що може свідчити про його вплив на пілі IV типу [23].

В експериментах встановлено виразний вплив меропенему на сформовані біоплівки *P. aeruginosa*. Ефективність меропенему щодо зрілих 5-добових біоплівок підтверджується зменшенням біомаси та кількості життєздатних клітин. Такий ефект може бути зумовлений його впливом на структурні компоненти матриксу біоплівки, про що свідчить зменшення вмісту білка, загальних полісахаридів та Pel-полісахариду. Зазначений ефект спостерігався як при дії у концентрації 0,5 МІК так і 2,0 МІК [14].

Висновки з даного дослідження і перспективи.

1. Встановлено, що меропенем порушує плівкоутворення *P. aeruginosa* та обумовлює деструкцію сформованих біоплівок, що підтверджується зменшенням біомаси та кількості життєздатних клітин.

2. Меропенем у концентрації 2,0 МІК сприяє зменшенню вмісту загальних полісахаридів та білка у матриксі біоплівок *P. aeruginosa*.

3. Експерименти показали, що меропенем порушує синтез Pel-полісахариду – структурного компонента матриксу біоплівок *P. aeruginosa*.

4. Меропенем є перспективним препаратом для терапії захворювань, обумовлених біоплівками. У подальшому необхідно оцінити ефективність препарату в експериментах *in vivo*.

Список літератури:

- Marvig R.L., Sommer L.M., Molin S., Johansen H. K. Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* with in patients with cystic fibrosis. *Nature Genetics*. 2014. V. 47. № 1. P. 57–64. DOI: 10.1038/ng.3148
- Litwin A., Rojek S., Gozdzik W., Duszynska W. *Pseudomonas aeruginosa* device associated – healthcare associated infections and its multidrug resistance at intensive care unit of University Hospital: polish, 8.5-year, prospective, single-centre study. *BMC Infectious Diseases*. 2021. V. 21. № 1:180. DOI: 10.1186/s12879-021-05883-5
- Lorenz A., Preuße M., Bruchmann S. [et al.]. Importance off lagella in acuteand chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Environmental Microbiology*. 2019. V. 21. № 3. P. 883–897. DOI: 10.1111/1462-2920.14468
- Vestby L.K., Grønseth T., Simm R., Nesse L.L. Bacterial Biofilm and its Rolein the Pathogenes is of Disease. *Antibiotics (Basel)*. 2020. V. 9. № 2:59. DOI: 10.3390/antibiotics9020059
- Maurice N.M., Bedi B., Sadikot R.T. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implication sinL ung Infections. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018. V. 58. № 4. P. 428–439. DOI: 10.1165/rcmb.2017-0321TR
- Alam F., Catlow D., Di Maio A. [et al.]. *Candida albicans* enhances meropenem tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in a dual-species biofilm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020. V. 75. № 4. P. 925–935. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkz514>
- Fernandez R., Amador P., Prudeñcio C. b-Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev Med Microbiol*. 2013. V. 24. № 1. P. 7–17. DOI: 10.1097/MRM.0b013e3283587727
- Страчунский Л.С., Белоусов Ю.Б., Козлов С.Н. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. Смоленск : МакМаХ, 2007. Т. 86. № 1. 464 с.
- Papp-Wallace K.M., Endimiani A., Taracila M.A. [et al.]. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011. V. 55. № 11. P. 4943–4960. DOI: 10.1128/AAC.00296-11
- Haagensen J.A., Verotta D., Huang L. [et al.]. New *in vitro* model to study the effect of human simulated antibiotic concentrations on bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015. V. 59. № 7. P. 4074–4081. DOI: 10.1128/AAC.05037-14
- Ciofu O., Tolker-Nielsen T. Tolerance resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents – how *P. aeruginosa* can Escape antibiotics. *Front Microbiol*. 2019. 10:913. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00913>
- Tolker-Nielsen T. Biofilm Development. *Microbiol Spectr*. 2015. V. 3. № 2: MB-0001-2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014
- Colvin K.M., Gordon V.D., Murakami K. [et al.]. The Pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Pathogens*. 2011. V. 7. № 1: e1001264. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001264
- Дудікова Д.М., Гринчук Н.І., Суворова З.С. [та ін.]. Вплив 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензил, N-диметиламіно)-2-пропанол хлориду на компоненти матриксу біоплівки *Pseudomonas aeruginosa*. *The scientific heritage*. 2018. № 25. P. 3–9.
- O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev. Microbiol*. 2000. V. 54. № 1. P. 49–79. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.49
- Tote K., Berghe D., Maes L. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilm. *Lettersin Applied Microbiology*. 2008. V. 46. № 2. P. 249–254. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02298.x
- Kayumov A., Nureeva A., Trizna E. [et al.]. New derivatives of pyridoxine exhibit high antibacterial activity against biofilm – embedded *Staphylococcus* cells. *Bio Med Research Internat*. 2015. 2015:890968. URL: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/890968>. DOI: 10.1155/2015/890968
- Bogachev M.I., Volkov V.Y., Markelov O.A. [et al.]. Fast and simple tool for the quantification of biofilm-embedded cells sub-populations from fluorescent microscopic images. *PLoS One*. 2018. V. 13. № 5: e0193267. DOI: 10.1371/journal.pone.0193267
- Chiba A., Sugimoto S., Sato F. [et al.]. A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability. *Microb. Biotechnol*. 2015. V. 8. № 3. P. 392–403. DOI: 10.1111/1751-7915.12155
- Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951. V. 193. № 1. P. 265–275. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J. [et al.]. Colorimetric method for determination of sugar sandrelated substances. *Anal. Chem*. 1956. V. 28. № 3. P. 350–356. DOI: 10.1021/ac60111a017
- Spiers A.J., Bohannon J., Gehrig S.M., Rainey P.B. Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkle spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol Microbiol*. 2003. V. 50. № 1. P. 15–27. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03670.x
- Hrynychuk N., Bukhtiarova T., Dudikova D., Vrynchanu N. Anti-adhesion properties of aminopropanol derivative with N-alkylaryl radical KVM-194 against *Pseudomonas aeruginosa*. *One Health & Risk Management*. 2021. V. 2. № 1. P. 34–41. DOI: 10.38045/ohrm.2021.1.05

References:

1. Marvig R.L., Sommer L.M., Molin S., Johansen H. K. (2014) Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* with in patients with cystic fibrosis. *Nature Genetics*, vol. 47, no. 1, pp. 57–64. DOI: 10.1038/ng.3148
2. Litwin A., Rojek S., Gozdzik W., Duszynska W. (2021) *Pseudomonas aeruginosa* device associated – healthcare associated infections and its multidrug resistance at intensive care unit of University Hospital: polish, 8.5-year, prospective, single-centre study. *BMC Infectious Diseases*, vol. 21, no. 1. DOI: 10.1186/s12879-021-05883-5
3. Lorenz A., Preuße M., Bruchmann S. [et al.] (2019) Importance off lagella in acuteand chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Environmental Microbiology*, vol. 21, no. 3, pp. 883–897. DOI: 10.1111/1462-2920.14468
4. Vestby L.K., Grønseth T., Simm R., Nesse L.L. (2020) Bacterial Biofilm and its Rolein the Pathogenes is of Disease. *Antibiotics (Basel)*, vol. 9, no. 2:59. DOI: 10.3390/antibiotics9020059
5. Maurice N.M., Bedi B., Sadikot R.T. (2018) *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implication sinL ung Infections. *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 58, no. 4, pp. 428–439. DOI: 10.1165/rcmb.2017-0321TR
6. Alam F., Catlow D., Di Maio A. [et al.] (2020) *Candida albicans* enhances meropenem tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in a dual-species biofilm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 75, no. 4, pp. 925–935. DOI: 10.1093/JAC/DKZ514
7. Fernandez R., Amador P., Prudeñcio C. (2013) b-Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev Med Microbiol*, vol. 24, no. 1, pp. 7–17. DOI: 10.1097/MMR.0b013e3283587727
8. Strachunskyi L.S., Belousov Yu.B., Kozlov S.N. (2007) *Praktycheskoe rukovodstvo po antyinfektsyonnoi khymyoterapii* [Practical guide to anti-infectious chemotherapy]. Smolensk: MakMaKh. (in Russian)
9. Papp-Wallace K.M., Endimiani A., Taracila M.A. [et al.] (2011) Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 55, no. 11, pp. 4943–4960. DOI: 10.1128/AAC.00296-11
10. Haagensen J.A., Verotta D., Huang L. [et al.] (2015) New in vitro model to study the effect of human simulated antibiotic concentrations on bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 59, no. 7, pp. 4074–4081. DOI: 10.1128/AAC.05037-14
11. Ciofu O., Tolker-Nielsen T. Tolerance (2019) Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents – How *P. aeruginosa* can Escape antibiotics. *Front Microbiol*, 10:913. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00913>
12. Tolker-Nielsen T. Biofilm Development (2015) *Microbiol Spectr*. vol. 3, no. 2: MB-0001-2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014
13. Colvin K.M., Gordon V.D., Murakami K. [et al.] (2011) The Pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Pathogens*, vol. 7, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001264>
14. Dudikova D.M., Hrynchuk N.I., Suvorova Z.S., Nedashkivska V.V., Vrynchanu N.O. (2018) Vplyv 4-(1-adamantyl)-fenoksy-3-(N-benzyl N-dymetylamino)-2-propanol khlorydu na komponenty matryksu bioplivky [Impact of 4-(1-adamantyl)-phenoxy-3-(N-benzyl, N-dimethylamino)-2-propanol chloride on components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix]. *The scientific heritage*, no. 25, pp. 3–9.
15. O'Toole G., Kaplan H. B., Kolter R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev. Microbiol*, vol. 54, no. 1, pp. 49–79. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.49
16. Tote K., Berghe D., Maes L. (2008) A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilm. *Lettersin Applied Microbiology*, vol. 46, no. 2, pp. 249–254. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02298.x
17. Kayumov A., Nureeva A., Trizna E. [et al.] (2015) New derivatives of pyridoxine exhibit high antibacterial activity against biofilm – embedded *Staphylococcus* cells. *Bio Med Research Internat*, 2015:890968. URL: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/890968>. DOI: 10.1155/2015/890968
18. Bogachev M.I., Volkov V.Y., Markelov O.A. [et al.] (2018) Fast and simple tool for the quantification of biofilm-embedded cells sub-populations from fluorescent microscopic images. *PLoS One*, vol. 13, no. 5, e0193267. DOI: 10.1371/journal.pone.0193267
19. Chiba A., Sugimoto S., Sato F. [et al.] (2015) A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability. *Microb. Biotechnol.*, vol. 8, no. 3, pp. 392–403. DOI: 10.1111/1751-7915.12155
20. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6
21. Dubois M., Gilles K., Hamilton J. [et al.] (1956) Colorimetric method for determination of sugar sandrelated substances. *lton Anal. Chem*, vol. 28, no. 3, pp. 350–356. DOI: 10.1021/ac60111a017
22. Spiers A.J., Bohannon J., Gehrig S.M., Rainey P.B. (2003) Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol Microbiol*, vol. 50, no. 1, pp. 15–27. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03670.x
23. Hrynchuk N., Bukhtiarova T., Dudikova D., Vrynchanu N. (2021) Anti-adhesion properties of aminopropanol derivative with N-alkylaryl radical KVM-194 against *Pseudomonas aeruginosa*. *One Health & Risk Management*, vol. 2, no. 1, pp. 34–41. DOI: 10.38045/ohrm.2021.1.05