

ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ СРЕДСТВА

DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-2-38-44

ВЛИЯНИЕ *IN VITRO* ИЗОЛИРОВАННОГО И СОЧЕТАННОГО С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМИ СРЕДСТВАМИ ПРИМЕНЕНИЯ БОВГИАЛУРОНИДАЗЫ АЗОКСИМЕР НА ЦЕЛОСТНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОПЛЕНКИ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

Е. Ю. Тризна¹, Д. Р. Байдамшина¹,
А. А. Виноцкий², А. Р. Каюмов¹

Исследована способность лиофилизата бовгиалуронидазы азоксимера (“Лонгидаза”) разрушать бактериальные биопленки *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, а также сочетанное действие препарата с антибактериальными средствами. Показано, что 2 ч инкубации бовгиалуронидазы азоксимер в концентрации 750 – 1500 МЕ/мл вызывает двукратное снижение биомассы матрикса зрелых биопленок *E. faecalis* и *E. coli*, и на 60 % — *S. aureus*. Данный ферментный препарат не влияет на образование бактериальных биопленок. При сочетанном применении с антибактериальными средствами препарат повышает их эффективность в отношении бактерий в составе биопленок. Так, концентрация ципрофлоксацина и амоксициллина, необходимая для снижения количества КОЕ на 3 порядка в биопленке *E. faecalis*, в присутствии бовгиалуронидазы азоксимера снижается в 16 раз ($p < 0,05$). В присутствии фермента в 16 раз меньше концентрации цефуроксима, фосфомицина, цiproфлоксацина и амикацина достаточны для снижения количества КОЕ на 3 порядка в биопленке *E. coli* ($p < 0,05$), и в значительно меньшей концентрации цефуроксим оказывает бактерицидное действие на клетки в биопленке *S. aureus* ($p < 0,05$). Вероятно, бовгиалуронидаза азоксимер увеличивает проникновение антибактериальных средств к клеткам бактерий в биопленке, что обеспечивает потенцирование их антибактериального эффекта. Такое действие ферментного препарата позволяет снизить дозу и повысить безопасность антибактериальных средств при сохранении их эффективности.

Ключевые слова: бактериальные биопленки; ферментативная деструкция матрикса; бовгиалуронидазы азоксимер; антибактериальные средства.

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальные биопленки — это связанные с поверхностью, структурированные бактериальные сообщества, представленные одним или несколькими видами микроорганизмов и погруженные во внеклеточный матрикс. Примерно 65 – 80 % бактериальных инфекций человека связаны с образованием биопленок [12]. Внеклеточный матрикс биопленок создает диффузный барьер для антибиотиков и иммунной системы, что значительно затрудняет терапию данных инфекций [7]. Переход инфекционно-воспалительного процесса в хроническую форму ассоциирован с персистенцией возбудителя, который “ускользает” от воздействия антибактериальных препаратов, а также собственной

иммунной системы за счет образования биопленки. Бактерии внутри биопленки способны выживать при действии лекарственных средств (ЛС) в таких высоких концентрациях, которые не могут быть достигнуты в организме человека при применении препаратов в стандартных терапевтических дозах [14]. В результате в биопленке сохраняются жизнеспособные клетки возбудителя, часто в персистирующем состоянии, и после прекращения курса антибактериальной терапии происходит их рост. Это, в свою очередь, поддерживает хроническое воспаление в ткани. В связи с этим актуальной задачей является разработка методов разрушения сформировавшихся и торможение образования новых биопленок [6].

Внеклеточный матрикс, в который погружены бактериальные клетки, состоит из белков, внеклеточной ДНК (вкДНК), экзополисахаридов и липидов. Экзопполисахариды, белки матрикса и вкДНК формируют каркас биопленки и препятствуют проникновению ЛС

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, 420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18.

² ООО “НПО Петровас Фарм”, Россия, 123112, Москва, Пресненская набережная, д. 12.

внутри пленки [5]. Поэтому перспективным подходом представляется использование ферментативной деструкции матрикса сформированной биопленки с помощью различных ферментов, их сочетаний и действия в комплексе с другими химическими и физическими бактерицидными агентами и антибактериальными ЛС [10]. Так, показана возможность гидролиза экзополисахаридов биопленок с помощью лизоцима, дисперсина В, альгинатлиазы и целлюлазы [10]. Предложено значительное количество протеолитических ферментов для деструкции биопленок — сериновые протеазы (трипсин, химотрипсин, субтилизин, протеиназа К), цистеиновые протеазы (папаин, бромелаин, фицин), аспартамовые протеазы, металлопротеазы (лизостафин, ауреолизин, серратиопептидаза) и треониновые пептидазы [5]. ДНКаза I эффективна в деструкции биопленок, образованных *E. faecalis*, *Str. pneumoniae* и *S. jejuni* [5]. Важным является тот факт, что, в отличие от антимикробных ЛС, ферменты не приводят к гибели бактерий, а просто “устраняют” их защиту, поэтому у микроорганизмов не вырабатывается резистентность к ферментным препаратам [4].

Применение ферментов для лечения инфекционных заболеваний имеет свои ограничения. Основное из них — это низкая стабильность фермента и его инактивация за счет протеолиза, а также ингибирование различными факторами, например, ионами металлов. Во-вторых, ферменты практически невозможно использовать для системного применения ввиду ограничений по их введению в ткани организма. Тем не менее ферменты на сегодняшний день считают лучшим вариантом для борьбы с биопленками [10].

Бовгиалуронидаза азоксимер представляет собой фермент гиалуронидазу, который конъюгирован с высокомолекулярным носителем, стабилизирующим его во внутренней среде организма. Помимо этого, присоединенный полимер обладает хелатирующей способностью, связывая ионы железа и другие металлы. Фермент устойчив к денатурирующему действию температуры, ингибиторов и протеаз, что позволяет в 1,5 раза дольше сохраняться молекуле в биологической среде, по сравнению с нативным белком [1].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использован лиофилизат бовгиалуронидаза азоксимер “Лонгидаза” серии 170619 (ООО “НПО Петровакс Фарм”) в концентрациях 1,25 – 1500 МЕ/мл. В исследовании применяли субстанции антибактериальных препаратов амикацина, амоксициллина + клавулоновой кислоты, фосфомицина, цефуроксима и ципрофлоксацина (Sigma Aldrich, США).

В качестве изучаемых штаммов использовали штаммы *Escherichia coli* MG1655 (K-12) (Коллекция микроорганизмов DSM), *Enterococcus faecalis* (клинический изолят), *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213™ (Американская коллекция микроорганизмов).

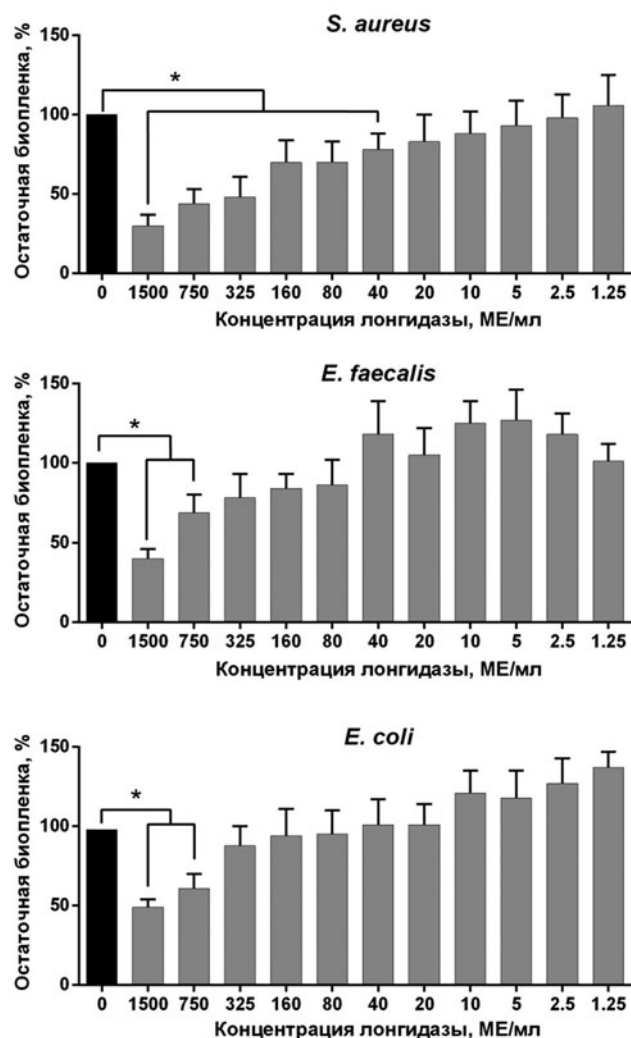


Рис. 1. Влияние бовгиалуронидазы азоксимер на целостность бактериальных биопленок *in vitro*.

Оценку остаточной биопленки проводили с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым. Достоверность оценивали с помощью рангового критерия Крускала — Уоллиса.

* Различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Для формирования биопленок бактерии выращивали 2 сут в статических условиях в адгезивных полистироловых планшетах при соотношении объема среды к объему лунки 2:3 при температуре 37 °C в среде БМ (BM-medium) (г/л) [8]: пептон — 0,7; глюкоза — 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,2; $CaCl_2$ — 0,005. Лунки засеивали ночной культурой, разведенной свежей средой до плотности культуры бактерий $(2 - 9) \cdot 10^6$ КОЕ/мл.

Анализ образования биопленок проводили в 96 и 24-луночных адгезивных пластиковых планшетах (Eppendorf Cell Culture Plates) окрашиванием кристаллическим фиолетовым [2, 11]. Из лунок удаляли культуральную жидкость, однократно промывали дистиллированной водой, просушивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Затем в лунки вносили 1 %

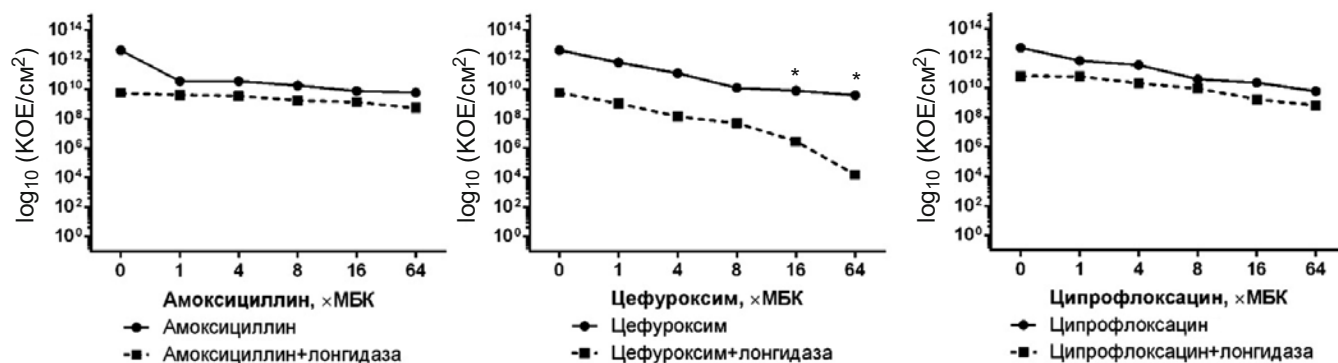


Рис. 2. Жизнеспособность *S. aureus* в составе биопленки в присутствии антибактериальных препаратов и бовгиалуронидазы азоксимера в концентрации 750 МЕ/мл.

Здесь и на рис. 3, 4: жизнеспособность клеток оценивали с помощью подсчета КОЕ. МБК — минимальная бактерицидная концентрация (табл. 1). Достоверность отличий с контролем (антибактериальный препарат без фермента) оценивали с помощью рангового критерия однородности Хи-квадрата Пирсона. * $p < 0,05$.

раствор кристаллического фиолетового (Sigma Aldrich) в 96 % этаноле (0,2 или 1 мл в зависимости от планшета) и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин с закрытой крышкой. Далее снова промывали дистиллированной водой, добавляли 96 % этиловый спирт (0,3 или 1,5 мл в зависимости от планшета) и измеряли поглощение при длине волны 570 нм на микропланшетном спектрофотометре Tecan infinite 200 Pro (Швейцария). В качестве контроля использовали чистые лунки, в которых не было бактерий, но проводились все манипуляции процесса окрашивания.

Минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) антимикробных ЛС определяли методом микроразведений в среде LB согласно рекомендациям EUCAST [9]. ЛС разводили средой в 96-луночном пластиковом планшете в концентрациях 0,25 – 512 мкг/мл. Лунки засеивали 200 мкл бактериальной культуры, КОЕ $(2 - 9) \cdot 10^6$ в среде БМ и инкубировали при 37 °С. МБК определяли как наименьшую концентрацию вещества, при которой полностью отсутствовал бактериальный рост на 24 ч инкубации. Далее эти же планшеты использовали для определения МБК, согласно рекомендациям EUCAST. За МБК принимали минимальную концентрацию вещества, приводящую к гибели не менее 99,9 % клеток за 24 ч экспозиции. Для ее определения из лунок, в которых не наблюдали видимого роста бактериальной культуры, производили 1000 × разведение культуры стерильной средой БМ и инкубировали 24 ч. За МБК принимали наименьшую концентрацию вещества, в которой препараты вызвали полное отсутствие бактериального роста на 24 ч инкубации.

Для оценки жизнеспособности клеток методом подсчета КОЕ [13] биопленки ресуспендировали в 0,9 % NaCl механическим сдиранием пленки со дна лунки планшета с последующей обработкой ультразвуком в

течение 2 мин. Затем готовили серийные 10-кратные разведения полученной бактериальной суспензии из каждой лунки планшета в 0,9 % NaCl и по 3 мкл суспензии переносили на чашки с агаризованной средой LB (г/л: триптон — 10, дрожжевой экстракт — 5, NaCl — 5; pH 8,5). Подсчет КОЕ проводили из разведений, содержащих 5 – 10 колоний, и выражали в КОЕ/см².

Микроскопирование проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе (CLSM) Carl Zeiss LSM 780 (Германия). Бактерии выращивали в 8-луночных слайдах (Eppendorf Cell Imaging Coverglass). Лунки засеивали 500 мкл бактериальной культуры $(2 - 9) \times 10^6$ КОЕ/мл в БМ-бульоне и инкубировали в течение 48 ч при температуре 37 °С без качания. Затем производили замену среды с последующим внесением бовгиалуронидазы азоксимер в концентрации 750 МЕ/мл и ципрофлоксацина в концентрации, равной 16 × МБК для каждого микроорганизма, соответственно, и инкубировали в течение 2 ч. После этого удаляли половину культуральной жидкости из лунок, вносили 250 мкл свежей среды, содержащей пропидий йодид 3 мг/мл и DioC₆ (Sigma) 0,02 мкг/мл, инкубировали 10 мин, затем микроскопировали. Пропидий йодид окрашивает нежизнеспособные клетки в красный цвет, живые клетки окрашиваются DioC₆ в зеленый цвет. Фракцию нежизнеспособных клеток подсчитывали с помощью программы BioFilmAnalyzer.

Эксперименты проводили в 3 биологических повторах. Статистическую значимость различий в количестве КОЕ, определенных подсчетом КОЕ из серии разведений с последующим подсчетом по формуле $10 \log_{10}(c)$, где c — полученное число клеток, оценивали, используя критерий однородности Хи-квадрата Пирсона. При оценке разницы в окрашивании биопленок использовали ранговый критерий Крускала — Уоллиса. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

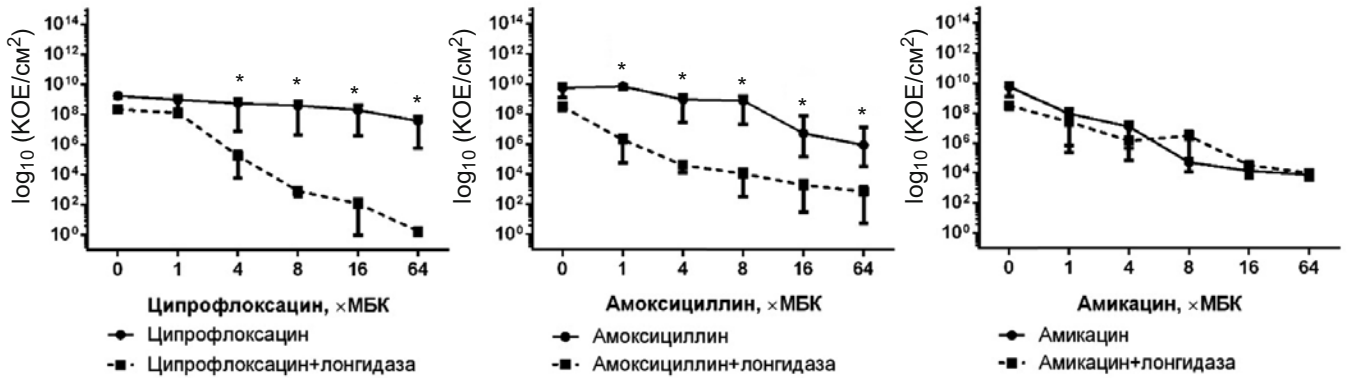


Рис. 3. Жизнеспособность *E. faecalis* в составе биопленки в присутствии антибактериальных средств и бовгиалуронидазы азоксимера в концентрации 750 МЕ/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценивали действие бовгиалуронидазы азоксимера на 48-часовые биопленки *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*. В отношении *S. aureus* наименьшая действующая концентрация фермента составила 40 МЕ/мл (рис. 1). В концентрации 1500 МЕ/мл препарат разрушал биопленку *S. aureus* на 85 %. В концентрациях 750 и 1500 МЕ/мл фермент разрушал биопленки *E. faecalis* и *E. coli* на 25 – 50 %.

Таким образом, после 2 ч инкубации с лонгидазой в концентрации 750 МЕ/мл остаточная биопленка ис-

следуемых бактерий составляла половину (50 – 60 %) от начального уровня. Концентрация бовгиалуронидазы азоксимера, равная 750 МЕ/мл, была выбрана для дальнейших экспериментов.

Для того, чтобы проверить способность препарата подавлять образование бактериальных биопленок, клетки *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* выращивали в 24-луночных планшетах на среде БМ-бульон при 37 °С, содержащей 750 МЕ/мл фермента. После 48 ч инкубации проводили окрашивание кристаллическим

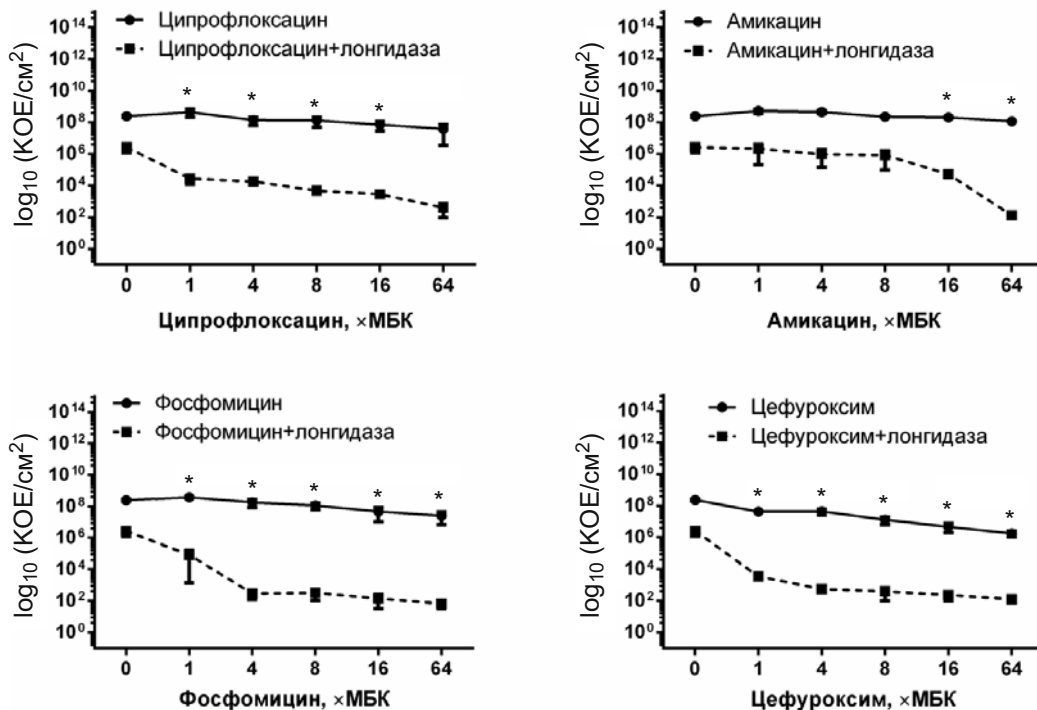


Рис. 4. Жизнеспособность *E. coli* в составе биопленки в присутствии антибиотиков и бовгиалуронидазы азоксимера в концентрации 750 МЕ/мл.

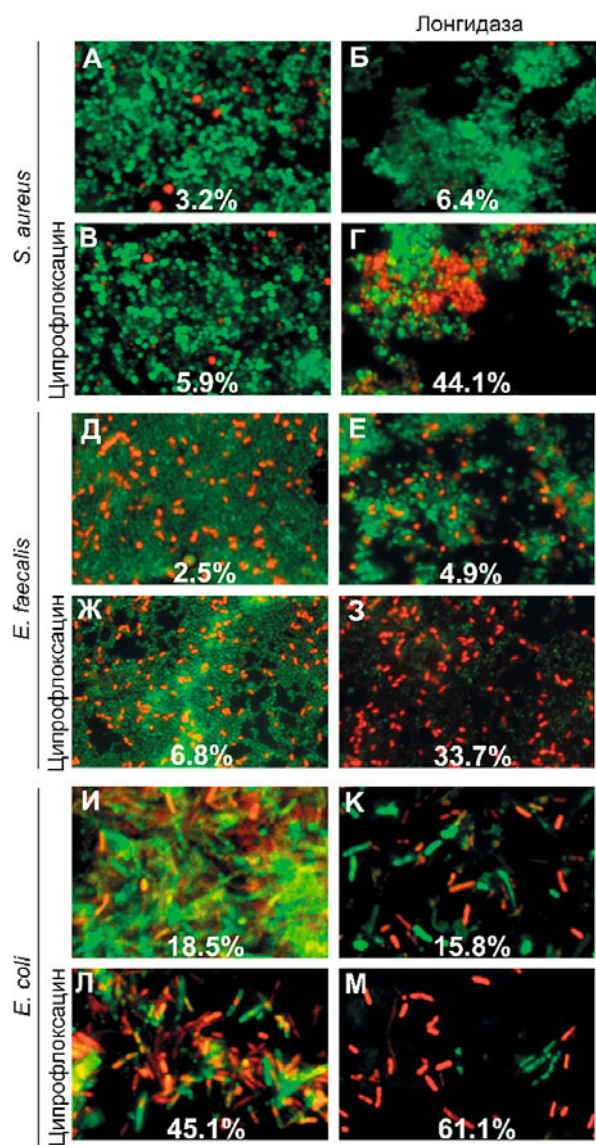


Рис. 5. Жизнеспособность *S. aureus* (А – Г), *E. faecalis* (Д – З) и *E. coli* (И – М) в составе биопленки в присутствии ципрофлоксацина (16 × МБК) и бовгиалуронидазы азоксимера в концентрации 750 МЕ/мл.

Примечание: жизнеспособность оценивали с помощью дифференциального флуоресцентного окрашивания с последующей конфокальной лазерной сканирующей микроскопией. Жизнеспособные клетки окрашены в зеленый цвет (DioC₆), нежизнеспособные окрашены красным (PI).

фиолетовым. Бовгиалуронидазы азоксимер не подавлял образование биопленок исследуемых бактерий.

Таким образом, исследуемый ферментный препарат способен разрушать матрикс зрелых бактериальных биопленок. Например, обработка ферментом может приводить к образованию пор в биопленке. Следовательно, можно ожидать, что препарат способен повысить биодоступность антибиотиков и, соответственно, эффективность антибактериальной терапии при сочетанном использовании.

Результаты по определению минимальной подавляющей концентрации (МПК) и МБК антибактериальных ЛС в отношении исследуемых бактериальных штаммов приведены в таблице.

Для оценки эффективности ЛС при сочетанном действии с изучаемым ферментом к зрелым 48-часовым биопленкам бактерий вносили бовгиалуронидазы азоксимер в концентрации 750 МЕ/мл и антибактериальные препараты в концентрациях, равных 1×, 4×, 8×, 16× и 64×МБК (таблица). Через 2 ч инкубации количество жизнеспособных клеток определяли подсчетом КОЕ как описано в разделе “Методы исследования”.

Внесение бовгиалуронидазы азоксимера в комбинации с цефуроксимом вызывает (рис. 2) значительное снижение КОЕ *S. aureus* при всех концентрациях антибиотика, но особенно эффект выражен при концентрациях 16× и 64×МБК (таблица). Снижение числа КОЕ свидетельствует о гибели бактерий в составе биопленки. Причем количество КОЕ при использовании изолированно цефуроксима в концентрациях (8–64)×МБК достоверно не отличаются и составляют примерно 10¹⁰ КОЕ/см², вероятно, из-за диффузного барьера биопленки. При добавлении в среду бовгиалуронидазы азоксимера эффект антибиотика становится дозозависимым, по-видимому, по причине повышения проницаемости биопленки.

Наиболее ярко эффект применения ферментного препарата выражен при сочетании с ципрофлоксацином и амоксициллином в отношении бактерий *E. faecalis* в составе биопленки (рис. 3). Так, для снижения количества КОЕ на 3 порядка (получения бактерицидного эффекта антибактериального препарата согласно требованиям, EUCAST), требовалась 64×МБК

МПК и МБК антимикробных препаратов в отношении используемых микроорганизмов

Антибиотик	Концентрация, мкг/мл					
	<i>S. aureus</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>	
	МПК	МБК	МПК	МБК	МПК	МБК
Амоксициллин + клавулановая кислота	4	16	0,5	0,5	4	512
Амикацин	2	2	8	8	4	4
Фосфомицин	512	НО	32	128	4	32
Цефуроксим	8	64	2	128	4	8
Ципрофлоксацин	0,5	32	0,5	8	0,5	0,5

Примечание: НО — не определено.

амоксциллина, в то время как при комплексном воздействии с исследуемым ферментом было достаточно 4×МБК (таблица). Следовательно, в сочетании с бовгиалуронидазы азоксимером действующая концентрация антибиотика, необходимая для получения сходного эффекта, может быть снижена в 16 раз. Для цiproфлораксина без сочетания с ферментом бактерицидного эффекта получить не удалось, в то время как в сочетании с препаратом было достаточно 4×МБК антибиотика для достижения бактерицидного эффекта (снижение количества КОЕ на 3 порядка). По всей видимости, происходит разрушение структуры матрикса биопленки, вследствие чего снимается диффузный барьер для антибактериального ЛС и микроорганизмы становятся восприимчивы к антимикробному препарату.

В отношении кишечной палочки комбинированное применение цiproфлораксина, фосфомицина или цефуроксима совместно с исследуемым препаратом приводило к снижению количества КОЕ на 3 порядка при 4×МБК цiproфлораксина, фосфомицина и цефуроксима, и при 64×МБК для амикацина (рис. 4, таблица). При этом наблюдали появление дозозависимого эффекта антибактериальных ЛС при сочетании с бовгиалуронидазы азоксимером, тогда как в отсутствие фермента бактерицидного эффекта не обнаруживали.

Кроме подсчета КОЕ, для оценки жизнеспособности клеток бактерий в составе биопленки при действии изучаемого ферментного препарата в комплексе с антимикробными ЛС проводили конфокальную лазерную сканирующую микроскопию.

Внесение бовгиалуронидазы азоксимера (рис. 5, Б, Е, К) не приводило к гибели бактерий в составе биопленки и количество нежизнеспособных клеток не отличалось от контрольной группы. При этом структура биопленки была нарушена по сравнению с контрольной группой (рис. 5, А, Д, И). При добавлении цiproфлораксина наблюдали небольшое увеличение количества погибших клеток (рис. 5, В, Ж, Л), тогда как внесение антимикробного препарата в комплексе с исследуемым ферментом приводило к гибели большинства бактерий в составе биопленки (рис. 5, Г, З, М). Так, количество нежизнеспособных клеток энтерококка и стафилококка, подсчитанных по серии микрофотографий, повышалось в 5 – 7 раз, по сравнению с обработкой только цiproфлораксином. Для кишечной палочки наблюдалось 1,5-кратное повышение количества мертвых клеток. Эти данные подтверждают синергичное действие антибактериального ЛС и бовгиалуронидазы азоксимера, то есть при добавлении данного препарата эффективность цiproфлораксина значительно возрастает.

Таким образом, бовгиалуронидазы азоксимер обладает способностью разрушать матрикс биопленок, образованных бактериями *S. aureus*, *E. faecalis* и *E. coli*. Благодаря этому, фермент способен потенцировать

действие антибиотиков в отношении бактерий в составе биопленки. Такое действие ферментного препарата позволит снизить дозу и повысить безопасность антибактериальных ЛС, а также обеспечить более полное уничтожение патогенных возбудителей.

ВЫВОДЫ

1. Бовгиалуронидазы азоксимер (750 МЕ/мл, 2 ч инкубации) обеспечивает разрушение матрикса зрелых бактериальных биопленок грамположительных (*S. aureus* и *E. faecalis*) и грамотрицательных (*E. coli*) бактерий в условиях на 40 – 50 % ($p < 0,05$) *in vitro*.

2. Ферментный препарат в исследованном диапазоне концентраций (1,25 – 1500 МЕ/мл) не оказывает значимого влияния на процесс формирования биопленки микроорганизмов *in vitro*.

3. Бовгиалуронидазы азоксимер (750 МЕ/мл, 2 ч инкубации) потенцирует антибактериальный эффект изученных препаратов: концентрации цiproфлораксина и амоксициллина, необходимые для снижения количества КОЕ на 3 порядка в биопленке *E. Faecalis*, снижаются в 16 раз ($p < 0,05$), концентрации цефуроксима, фосфомицина, цiproфлораксина и амикацина, необходимые для снижения количества КОЕ на 3 порядка в биопленке *E. coli*, — в 16 раз ($p < 0,05$) и в 4 раза меньшая концентрация цефуроксима оказывает бактерицидное действие на клетки в биопленке *S. aureus* ($p < 0,05$).

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Некрасов, Н. Г. Пучкова, Н. Т. Карапутадзе, *Иммунология*, **27**(2), 1 – 5 (2006); doi: 10.18565/aig.2018.12.125-130.
2. D. R. Baidamshina, E. Y. Trizna, M. G. Holyavka, et al., *Scientific Reports*, **7**, 46068 (2017); doi: 10.1038/srep46068
3. H. L. Brown, K. Hanman, M. Reuter, et al., *Frontiers Microbiol.*, **6**, 699 (2015); doi: 10.3389/fmicb.2015.00699.
4. L. Burke, K. L. Hopkins, D. Meunier, E. de Pinna, et al., *J. Antimicrob. Chemother.*, **69**(4), 977 – 981 (2014); doi: 10.1093/jac/dkt469
5. D. P. Clark, and N. J. Pazdernik, *Chapter 11-Protein Engineering, Biotechnology*, Second Ed., Academic Cell (2016), pp. 365 – 392.
6. H. C. Flemming, J. Wingender, U. Szewzyk, et al., *Nat. Rev. Microbiol.*, **14**(9), 563 – 575 (2016); doi: 10.1038/nrmicro.2016.94
7. N. Hoiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov, et al., *Int. J. Antimicrob. Agents*, **35**(4), 322 – 332 (2010); doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.
8. A. R. Kayumov, A. A. Nureeva, E. Y. Trizna, et al., *Biomed. Res. Intern.*, **2015**, ID 890968 (2015); doi: 10.1155/2015/890968.
9. R. Leclercq, R. Canton, D. F. J. Brown, et al., *Clin. Microbiol. Infect.*, **19**(2), 141 – 160 (2013); doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x.
10. S. Nahar, M. F. R. Mizan, A. J. W. Ha, S. D. Ha, *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety*, **17**(6), 1484 – 1502 (2018); doi: 10.1111/1541-4337.12382.
11. G. A. O'Toole, R. Kolter, *Molec. Microbiol.*, **28**(3), 449 – 461 (1998); doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x

12. C. Potera, *Science*, **283**(5409), 1837 – 1839 (1999); doi: 10.1126/science.283.5409.1837
13. I. S. Sharafutdinov, E. Y. Trizna, D. R. Baidamshina, et al., *Front. Microbiol.*, **8**, ID 2246 (2017); doi: 10.3389/fmicb.2017.02246.
14. S. M. Soto, *Advances Biol.*, ID 543974 (2014); doi: 10.1155/2014/543974.

Поступила 28.01.20

INDIVIDUAL AND ANTIMICROBIAL-COMBINED EFFECT OF BOVHYALURONIDASE AZOXIMER ON THE INTEGRITY OF BIOFILMS AND VIABILITY OF BIOFILM-EMBEDDED BACTERIA *IN VITRO*

E. Yu. Trizna¹, D. R. Baidamshina¹, A. A. Vinitskii², and A. R. Kayumov¹

¹ Kazan Federal University, ul. Kremlevskaya 18, Kazan, Tatarstan, 420008 Russia

² "Petrovax Pharm" Research & Production Enterprise, Presnenskaya nab. 12, Moscow, 123112 Russia

The ability of the bovhyluronidase azoximer (longidaza) to destroy bacterial biofilms of *S. aureus*, *E. faecalis* and *E. coli*, as well as the effect of combined application of this substance with antibiotics have been studied. It is established that 2-h treatment with of bovhyluronidase azoximer (750 – 1500 international units (IU) per mL) reduces by half the biomass of mature biofilms formed by *E. faecalis*, *E. coli* and by 60% the biofilm of *S. aureus*. At the same time, bovhyluronidase azoximer does not inhibit the formation of bacterial biofilms. When applied in combination, bovhyluronidase azoximer significantly increases the efficacy of antibiotics against biofilm-embedded bacteria. The concentration of ciprofloxacin and amoxicillin required to reduce the amount of CFU by three orders of magnitude in the *E. faecalis* biofilm, decreases 16 times in the presence of longidaza ($p < 0.05$). Similarly, in the presence of longidaza, 32 times lower concentrations of cefuroxime, phosphomycin, ciprofloxacin and amikacin are sufficient to reduce the amount of CFU by three orders of magnitude in the *E. coli* biofilm ($p < 0.05$). Four times lower concentration of cefuroxime has a bactericidal effect on biofilm-embedded cells of *S. aureus* ($p < 0.05$). Probably, bovhyluronidase azoximer increases penetration of antibiotics into biofilm thereby increasing their efficiency, reducing the dose, and decreasing side effects of antimicrobials at systemic use.

Keywords: bacterial biofilms; enzymatic destruction of biofilm; bovhyluronidase azoximer; longidaza; antibacterial agent; potentiation.

