

Kombinácia berberínu a ciprofloxacínu znižuje tvorbu biofilmu multirezistentného kmeňa *Salmonella* potlačením expresie mRNA *luxS*, *rpoE* a *ompR*

Ukázalo sa, že bakteriálne biofilmy úzko súvisia s klinickými infekciami a prispievajú k rezistencii voči liekom. Uvádza sa, že berberín, ktorý je hlavnou zložkou *Coptis chinensis*, má účinnú antibakteriálnu aktivitu. Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať potenciálny účinok kombinácie berberínu s ciprofloxacínom (CIP) na inhibíciu tvorby biofilmu *Salmonella* a jeho vplyv na expresiu príbuzných génov (*rpoE*, *luxS* a *ompR*). Index frakčnej inhibičnej koncentrácie (FIC) kombinácie berberínu s CIP je 0,75 čo ukazuje na synergický antibakteriálny účinok. Rýchlosť adhézie a rastová krivka biofilmu ukázali, že multirezistentný kmeň *Salmonella* mal potenciál vytvárať biofilm v porovnaní s kmeňom CVCC528 a účinky antibiofilmu boli závislé od dávky. Mikroštruktúry biofilmu boli zriedkavo pozorované pri koncentráciách $1/2 \times \text{MIC} / \text{FIC}$ (MIC, minimálna inhibičná koncentrácia) a kombinácia mala silnejší antibiofilmový účinok ako každé z antimikrobiálnych činidiel používaných samostatne pri koncentrácii $1/4 \times \text{FIC}$. Expresie mRNA *LuxS*, *rpoE* a *ompR* boli významne potlačené ($p < 0,01$) pri koncentráciách $1/2 \times \text{MIC}/\text{FIC}$ a kombinácia berberínu a CIP potláčala expresiu mRNA silnejšie pri koncentrácii $1/4 \times \text{FIC}$.

Výsledky naznačujú, že kombinácia berberínu a CIP má synergický účinok a je účinná pri inhibícii tvorby biofilmu *Salmonella* prostredníctvom represie expresie mRNA *luxS*, *rpoE* a *ompR*.

Úvod

Salmonelóza je hlavnou príčinou otravy jedlom u ľudí na celom svete a má dôležitý význam pre verejné zdravie. *Salmonella* spôsobuje závažné ochorenia vrátane gastroenteritídy, septikémie a čiastočne hnisavých infekcií, ktoré spôsobujú vážne problémy pre pastvu a verejné zdravie. Fluorochinolóny vrátane ciprofloxacínu (CIP) sú liekmi prvej línie v liečbe salmonelózy. Avšak nadmerné alebo nevhodné používanie antimikrobiálnych látok u zvierat, najmä zvierat určených na produkciu potravín, môže viesť k prenosu bakteriálnej rezistencie na človeka prostredníctvom potravinového reťazca. Zvýšenie výskytu multirezistentných *Salmonella* vyjadrujúcich rezistenciu na fluorochinolóny sa v poslednej dobe stalo globálnym problémom. Liečba salmonelózy sa stáva čoraz ťažšou kvôli liekovej rezistencii, o ktorej sa preukázalo, že súvisí s tvorbou bakteriálneho biofilmu. Biofilm je vo všeobecnosti definovaný ako štruktúrované spoločenstvo bakteriálnych buniek, ktoré je uzavreté v polymérnej matrici, ktorá sa vyrába sama a priľne k inertnému alebo živému povrchu. V skutočnosti sú adherentné sesilné bunky v biofilme vysoko odolné voči antimikrobiálnym látkam a obrane hostiteľa a úzko súvisia s kolonizáciou hostiteľa a virulenciou. Okrem toho sa odhadovalo, že 80 % všetkých klinických infekcií zahŕňa biofilm. Zvažovanie biofilmu ako cieľa vo vývoji liekov zameraných na inhibíciu produkcie bakteriálneho biofilmu bolo preto horúcou témou pri štúdiu antibakteriálnych infekcií.

Predchádzajúce správy uviedli, že tvorba biofilmu *Salmonella* bola spojená s expresiou celulózy, proteínu A spojeného s biofilmom (BapA) a curli (označuje štrukturálne proteíny, ktoré sú zodpovedné za tvorbu biofilmov u baktérií, ako je *Salmonella*. Curli sú amyloidové fibrily, ktoré baktérie vytvárajú a ktoré pomáhajú pri adhezii na povrch a vytvárajú komplexné štruktúry, známe ako biofilmy.). Účinnú kontrolu biofilmov možno dosiahnuť pochopením molekulárnych mechanizmov, najmä expresiou regulačných génov zapojených do tvorby biofilmu. Regulácia transkripcie, ktorá je najzákladnejším a najdôležitejším spôsobom na presné riadenie života prokaryotov, závisí od rôznych faktorov sigma (σ), ako je napríklad regulátor *rpoE*. Štúdie ukázali, že delécia *rpoE* môže zodpovedať za inhibíciu tvorby biofilmu v dôsledku potlačenia curli. S-ribozylhomocysteináza (*LuxS*) má dôležitú úlohu v aktivovanej dráhe metylového cyklu a snímaní kvóra, čo vedie k tvorbe biofilmu a spôsobuje ďalšie faktory virulencie u mnohých bakteriálnych druhov. Uvádza sa, že gén *luxS* sa podieľa na regulácii bunkového rastu, tvorby biofilmu, snímania kvóra, motility, virulencie a rezistencie. *OmpR* je regulačný gén pre tvorbu biofilmu a je dôležitým faktorom virulencie u *Salmonella*. Medzi dobre charakterizované ciele regulácie *ompR* patrí tvorba kapsuly, bičiky a regulácia faktora virulencie. Identifikácia produktov, ktoré by mohli inhibovať expresiu génov *luxS*, *rpoE* a *ompR*, teda môže byť dôležitým novým výskumným zameraním, ktoré môže naznačovať prirodzenú, rozšírenú antimikrobiálnu stratégiu s významným potenciálnym vplyvom na tvorbu biofilmu.

V súčasnosti sa veľká pozornosť sústreďuje na tradičné čínske bylinné lieky v kombinácii s antimikrobiálnymi látkami s cieľom dosiahnuť synergiu liekov, zvýšiť účinnosť a znížiť toxicitu. *Coptis chinensis* bol široko používaný s účinkami prečistenia intenzívneho tepla a odstránením toxikózy, ako aj protizápalovými, antidiabetickými, antibakteriálnymi, antioxidantnými a anti-Alzheimerovými účinkami vďaka svojim multialkaloidným zložkám. Štúdie ukázali, že hlavnou zložkou *C. chinensis* je berberín, hlavný alkaloid v *C. chinensis* a najdôležitejší prispievateľ k terapeutickým účinkom. Napriek tomu existujú dôkazy, že berberín má nízku úroveň toxicity. Bez ohľadu na to sa niektoré štúdie zamerali na antibiofilmový účinok a inhibičný mechanizmus berberínu v kombinácii s CIP na *Salmonella* na molekulárnej úrovni. Takáto kombinácia by mohla byť súčasťou novej antibiofilmovej stratégie a predstavovať dôležitý prelom vo výskume integratívnej medicíny tým, že poskytuje pohľad na molekulárny mechanizmus rezistencie voči liekom.

Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať antibiofilmový účinok berberínu v kombinácii s CIP na *Salmonella* a preskúmať tento účinok s cieľom poskytnúť nový teoretický základ a určiť jeho klinický význam pri inhibícii tvorby biofilmu a objasniť fenotyp rezistencie *Salmonella*.

Materiály a metódy

Bakteriálne kmene

Kmene salmonely boli izolované z kurčiat a po identifikácii konzervované podľa štandardného laboratórneho protokolu. *Salmonella gallinarum* CVCC528 (kontrolný kmeň) bola zakúpená od Národného inštitútu pre kontrolu farmaceutických a biologických produktov (Čína).

Test citlivosti na liečivo

Použitím Kirby-Bauerovej metódy, odporúčanej Svetovou zdravotníckou organizáciou a usmerneniami Inštitútu pre klinické a laboratórne štandardy (CLSI), sme testovali antimikrobiálnu citlivosť kmeňov *Salmonella*. Analyzovali sme citlivosť bežných terapeutických antimikrobiálnych látok vrátane ofloxacínu (5 µg), ampicilínu (10 µg), chloramfenikolu (30 µg), CIP (5 µg), gentamicínu (10 µg), norfloxacínu (10 µg), sulfametoxazolu-trimetoprimu (25 µg), cefazolín (30 µg), tetracyklín (30 µg) a kanamycín (30 µg) (BioKangtai, Čína). Bujón s koncentráciou $1 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ (CFU, jednotka tvoriaca kolónie) sa rovnomerne naniesol na Mueller-Hintonove agarové platne a disky na antimikrobiálnu citlivosť úplne prilnuli na povrch stredu platne. Doštičky sa potom udržiavali pri teplote 37 °C počas 16 až 18 hodín. Následne sa merala inhibičná zóna Vernierovým posuvným meradlom na stanovenie citlivosti podľa CLSI.

Príprava berberínu

Na vzduchu sušený podzemok *C. chinensis* (65 g) bol zakúpený od Harbin Sankeshu Medicinal Herbs Market (Čína). Stručne povedané, podzemok *C. chinensis* sa rozdrvil a extrahoval alkoholom s 520 ml 75 % EtOH (1:8, V *C. chinensis* /V EtOH) pri 50 °C. Extrakt sa skoncentroval a zahrial na 100 °C, aby sa rozpustil v roztoku kyseliny octovej. pH extraktu (1–2) bolo upravené kyselinou chlorovodíkovou. Prečistený berberín sa získal filtráciou, premytím a odparením vo vákuu dvakrát so studenou vodou a raz s acetónom. Nakoniec sa zozbieralo 5,31 g extraktov berberínu pri rýchlosti extrakcie $8,17 \pm 0,2$ %. Berberín sa analyzoval ultrafialovou spektrofotometriou. Vysušený berberín sa zriedil v destilovanej vode na koncentráciu 100 000 µg/ml a skladoval sa pri 4 °C.

Test citlivosti šachovnice

Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) sa stanovila použitím metódy mikroriedenia bujónu podľa CLSI. Frakčná inhibičná koncentrácia (FIC) berberínu a CIP sa odhadla použitím šachovnicovej metódy zmiešanej pri rôznych koncentráciách.

Vzorec na výpočet indexu FIC

$$\text{FIC index} = \frac{\text{MIC}_{\text{A(combind with B)}}}{\text{MIC}_{\text{A}}} + \frac{\text{MIC}_{\text{B(combind with A)}}}{\text{MIC}_{\text{B}}}$$

kde A je berberín a B je CIP. Index FIC < 1,0 indikuje synergickú interakciu; 1,0 označuje aditívnu interakciu; $1,0 < \text{index FIC} < 2,0$ označuje subaditívnu interakciu; 2,0 označuje indiferentnú interakciu; Index FIC > 2,0 naznačuje antagonistickú interakciu. Všetky testy sa uskutočnili trojmo.

Test tvorby biofilmu

Tvorba biofilmu a antibiofilmový účinok troch antimikrobiálnych činidiel (berberín, CIP a kombinácia oboch) na *Salmonella* sa testovali na 96-jamkových platniach. Každá jamka bola naplnená 100 ul antimikrobiálneho činidla a naočkovaná 100 ul kultúrami (10⁵ CFU/ml). Konečné koncentrácie troch antimikrobiálnych činidiel boli 1 x MIC/FIC, 1/2 x MIC/FIC, respektíve 1/4 x MIC/FIC. Negatívne kontrolné jamky boli naplnené iba TSB kultivačným médiom a jamky naočkované 200 ul zriedenej bakteriálnej suspenzie bez antimikrobiálnych činidiel boli brané ako pozitívne kontroly. Platne sa obalili parafilmom, aby sa zabránilo vyparovaniu počas inkubácie počas 72 hodín pri 37 °C. Biofilmy sa kvantifikovali pomocou CV testu na meranie optickej hustoty pri 595 nm (OD 595 nm) pomocou čítačky mikrodoštičiek. Vzorec na výpočet hodnoty B (adhézne rýchlosti) je

$$B = \frac{A_2 - A_{2c}}{A_1 - A_{1c}}$$

kde A označuje OD 595 nm na konci inkubácie, A₂ označuje OD 595 nm po farbení a A_{1c} a A_{2c} označujú jamky pre slepú kontrolu. Každý experiment sa uskutočnil trojmo a vypočítal sa priemer ± SD.

Stanovenie rastových kriviek

Biofilmy sa pripravili v 96-jamkových platniach, ako je opísané vyššie, a kultivovali sa 2, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72, 96 a 120 hodín. Potom sa každá jamka naplnila 20 ul XTT a inkubovala sa v tme počas 2 hodín pri 37 °C, aby sa zmerala OD 450 nm pomocou čítačky mikrodoštičiek. Každý experiment sa uskutočnil trojmo a vypočítal sa priemer ± SD.

Skenovacia elektrónová mikroskopia

Mikroštruktúra biofilmu bola analyzovaná pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM). *Salmonella* ošetrovaná rôznymi koncentraciami antimikrobiálnych látok sa kultivovala, ako je opísané vyššie, a biofilmy sa nechali vyvinúť na sterilizovaných krycích sklíčkach, ktoré sa umiestnili vertikálne do 24-jamkových platní na 72 hodín pri 37 °C. Vzorky boli fixované, dehydratované a vysušené v kritickom bode, zlato rozprašované pomocou prístroja na rozprašovanie iónov (prúd 15 mA, 2 minúty) a pozorované pomocou SEM.

Izolácia RNA a kvantitatívna reverzná transkriptáza polymerázová reťazová reakcia (qRT-PCR)

Celková RNA sa extrahovala z bakteriálnych buniek pomocou činidla TRIzol (Invitrogen, USA) podľa protokolu výrobcu. RNA bola kvantifikovaná pomocou spektrofotometra

Nanodrop 2000C (Thermo Scientific, USA). Koncentrácia RNA bola fixovaná na 1 ug/ul a potom bola syntetizovaná cDNA pomocou súpravy PrimeScript RT-PCR (Takara Bio, Japonsko). qRT-PCR sa uskutočnila pomocou metódy Green SYBR I. Reakcie qRT-PCR sa uskutočnili nasledovne: 94 °C počas 30 sekúnd a 45 cyklov 94 °C počas 5 sekúnd, 60 °C počas 15 sekúnd a 72 °C počas 15 sekúnd. Úroveň expresie každého génu bola normalizovaná na úroveň 16S rRNA. Relatívne kvantitatívne výsledky boli analyzované pomocou metódy $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Priméry pre *rpoE*, *luxS* a *ompR* sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Gene	Primer
16S rRNA-F	5'-GTTACCCGCAGAAGAAGCCAC-3'
16S rRNA-R	5'-GCAAGAGGCCCGAACGTC-3'
<i>LuxS</i> -F	5'-CGGGTTGCAAAAACGATGA-3'
<i>LuxS</i> -R	5'-GTTGAGGTGGTTCGCGCATA-3'
<i>RpoE</i> -F	5'-TCGTCCGCCTTCCAGTGA-3'
<i>RpoE</i> -R	5'-TCTTCCGGGAGGGACTCAAT-3'
<i>OmpR</i> -F	5'-ACGCTGAGCAGATGGATCGT-3'
<i>OmpR</i> -R	5'-CCTTCGCCGTGACCATAATG-3'

Sekvence primérov pre kvantitatívnu reverznú transkriptázovú polymerázovú reťazovú reakciu

Testy citlivosti na lieky

Inhibičná zóna kmeňov *Salmonella* je prezentovaná v nasledujúcej tabuľke. Zistilo sa, že kmeň *Salmonella* (č. 5) je rezistentný na všetky antibiotiká okrem ofloxacinu, čo ukazuje, že ide o obzvlášť multirezistentný kmeň *Salmonella* s fenotypom komplexnej rezistencie. Preto sme na následné experimenty použili multirezistentný kmeň *Salmonella* č. 5.

Antibiotics	Salmonella strains											
	CVCC528	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9	No. 10	No. 11
Ofloxacin	27	24	27	28	29	17	27	25	25	30	25	26
Ampicillin	22	0	24	0	25	0	24	24	0	0	0	0
Chloramphenicol	28	23	3	29	31	0	30	25	27	29	28	27
Ciprofloxacin	33	32	17	33	36	19	33	28	30	33	30	32
Gentamicin	27	27	28	30	35	8	30	27	0	0	0	0
Norfloxacin	28	27	26	29	33	10	31	25	29	28	24	30
Sulfamethoxazole-trimethoprim	28	23	32	24	33	0	32	29	27	34	31	28
Cefazolin	26	24	26	24	30	19	26	23	12	15	12	15
Tetracycline	25	0	27	0	26	0	25	25	26	20	25	25
Kanamycin	29	28	27	28	30	0	28	25	0	0	0	0

Inhibičná zóna (mm) testovaných kmeňov Salmonella

Testy antimikrobiálnej citlivosti

MIC a FIC indexy multirezistentného kmeňa *Salmonella* a kmeňa CVCC528 sú uvedené v tabuľke. Podľa určujúcich štandardov pre indexy FIC mal berberín v kombinácii s CIP synergický účinok proti multirezistentnému kmeňu *Salmonella* aj CVCC528, keďže index FIC bol 0,75 (MIC berberínu znížené z 3 125 – 1 562 $\mu\text{g/ml}$; MIC CIP znížená z 2,56 – 0,64 $\mu\text{g/ml}$). Výsledky naznačujú, že berberín v kombinácii s CIP by mohol byť účinným prístupom k liečbe infekcií *Salmonella*.

Strains	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		FIC index
	CIP	Berberine	
CVCC528	0.04	3,125	0.75
Multi-resistant <i>Salmonella</i> strain	2.56	3,125	0.75

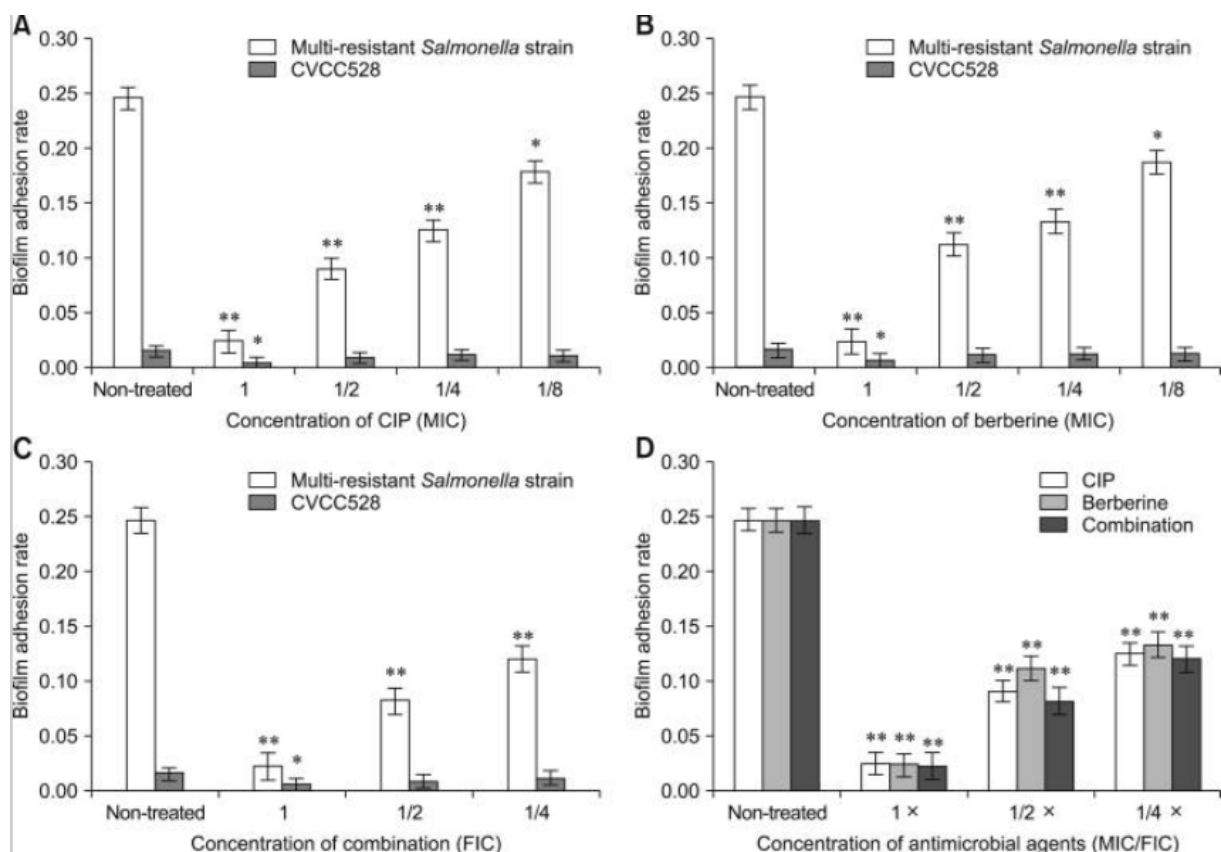
MIC ($\mu\text{g/ml}$) a FIC indexy dvoch kmeňov *Salmonella*

MIC - minimálna inhibičná koncentrácia, FIC – frakčná inhibičná koncentrácia

Rýchlosť adhézie biofilmu s antimikrobiálnymi látkami

Výsledky rýchlosti adhézie biofilmu rôznych antimikrobiálnych látok sú uvedené na dolnom obrázku. Rýchlosť adhézie biofilmu multirezistentného kmeňa *Salmonella* bola 0,246, čo bolo oveľa vyššie ako pri CVCC528 ($B_{595\text{ nm}} = 0,0159$).

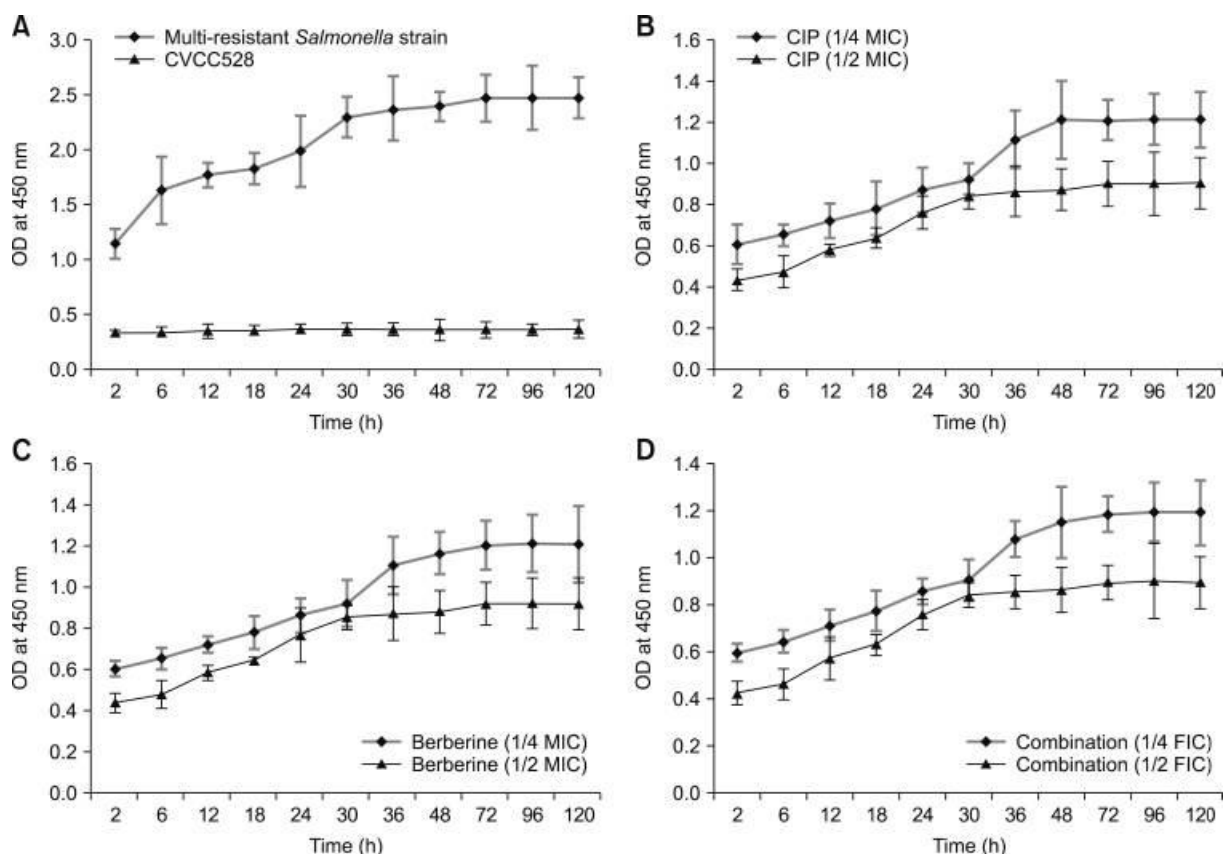
Ako je znázornené na paneloch A a B v Obr. rýchlosť adhézie biofilmu *Salmonella*, ktorej sa podávala, 1/8-násobok koncentrácie MIC kombinácie CIP a berberínu sa výrazne znížil v porovnaní s kontrolnou skupinou ($p < 0,05$) a koncentrácie 1 x MIC, 1/2 x MIC, a 1/4 x MIC skupiny boli významne znížené v porovnaní s kontrolnou skupinou ($p < 0,01$). Okrem toho rýchlosť adhézie postupne klesala so zvýšenou koncentráciou antimikrobiálneho činidla. Podobne, keď sa *Salmonelle* podávala kombinácia CIP a berberínu, rýchlosti adhézie v skupinách 1 x FIC, 1/2 x FIC a 1/4 x FIC boli významne znížené spôsobom závislým od dávky v porovnaní s kontrolnými skupinami. skupina ($p < 0,01$) (panel C in Obr.). V skupine 1/2 x FIC bola rýchlosť adhézie ($B_{595\text{ nm}} = 0,082$) nižšia ako v skupine 1/2 x MIC CIP ($B_{595\text{ nm}} = 0,091$) a berberínovej skupine 1/2 x MIC ($B_{595\text{ nm}} = 0,112$) (panel D in Obr.). Taktiež v skupine 1/2 x FIC bola rýchlosť adhézie ($B_{595\text{ nm}} = 0,120$) nižšia ako v skupine 1/2 x MIC CIP ($B_{595\text{ nm}} = 0,125$) a berberínovej skupine 1/2 x MIC ($B_{595\text{ nm}} = 0,133$).



Účinky ciprofloxacínu (CIP) (A), berberínu (B) a ich kombinácie (C) na tvorbu biofilmu u multirezistentného kmeňa *Salmonella* č. 5 a kmeňa CVCC528. (D) Porovnanie antibiofilmových účinkov CIP, berberínu a kombinácie na multirezistentný kmeň *Salmonella*. Údaje sú prezentované ako priemer \pm SD. Výrazný rozdiel (* $p < 0,05$), významný rozdiel (** $p < 0,01$) v porovnaní s neliečenou skupinou. MIC, minimálna inhibičná koncentrácia; FIC, frakčná inhibičná koncentrácia.

Výšetrenie rastových kriviek

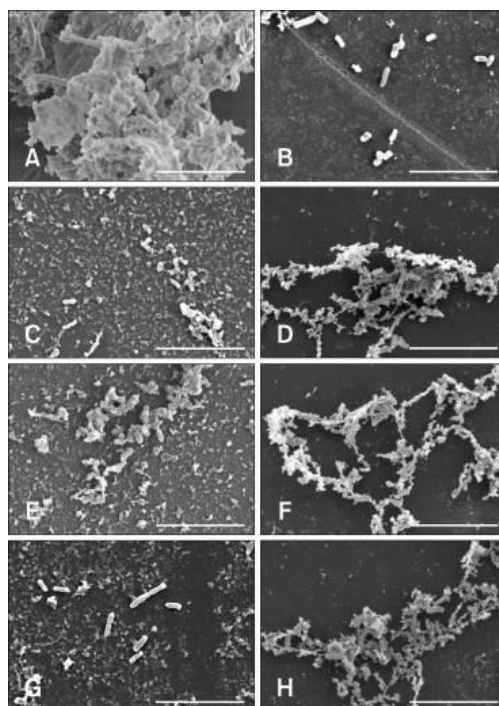
Výsledky krivky rastu biofilmu sú uvedené v Obr. Multirezistentný kmeň *Salmonella* zjavne produkoval biofilm v trvaní 18 až 30 hodín (panel A v Obr.). Neexistoval však žiadny zjavný trend rastu pri tvorbe biofilmu kmeňa CVCC528. V porovnaní s neošetreným multirezistentným kmeňom *Salmonella* (panel A in Obr.), CIP, berberín a kombinované liečby významne inhibovali tvorbu biofilmu pri koncentrácii $1/2 \times$ MIC/FIC a $1/4 \times$ MIC/FIC (panely B–D v Obr.). Je zrejme, že sub-MIC berberínu (OD 450 nm = 0,765 po 24 hodinách s $1/2 \times$ MIC, OD 450 nm = 0,861 po 24 hodinách s $1/4 \times$ MIC), CIP (OD 450 nm = 0,760 pri 24 h s $1/2 \times$ MIC, OD 450 nm = 0,869 po 24 hodinách s $1/4 \times$ MIC) a kombinácia (OD 450 nm = 0,755 po 24 hodinách s $1/2 \times$ FIC, OD 450 nm = 0,854 pri 24 h s $1/4 \times$ FIC) mohol účinne inhibovať rast bakteriálneho biofilmu počas logaritmického rastovej fázy v porovnaní s neošetreným kmeňom (OD 450 nm = 1,982 po 24 hodinách). Ako je znázornené na paneli A v Obr. tvorba biofilmu multirezistentného kmeňa *Salmonella* vstúpila do stacionárnej fázy po 72 hodinách. Je zrejme, že sub-MIC antimikrobiálnych látok inhibujú tvorbu biofilmu počas stacionárnej fázy (OD 450 nm sa znížila z 2,457 na 0,898 po 96 hodinách s $1/2 \times$ FIC kombinácie).



Krivky rastu biofilmu multirezistentného kmeňa *Salmonella* a kmeňa CVCC528 bez antimikrobiálnych látok (A) a s ciprofloxacínom (CIP) (B), berberínom (C) a kombináciou (D). OD, optická hustota; MIC, minimálna inhibičná koncentrácia; FIC, frakčná inhibičná koncentrácia.

Mikroštruktúrna analýza biofilmu pod SEM

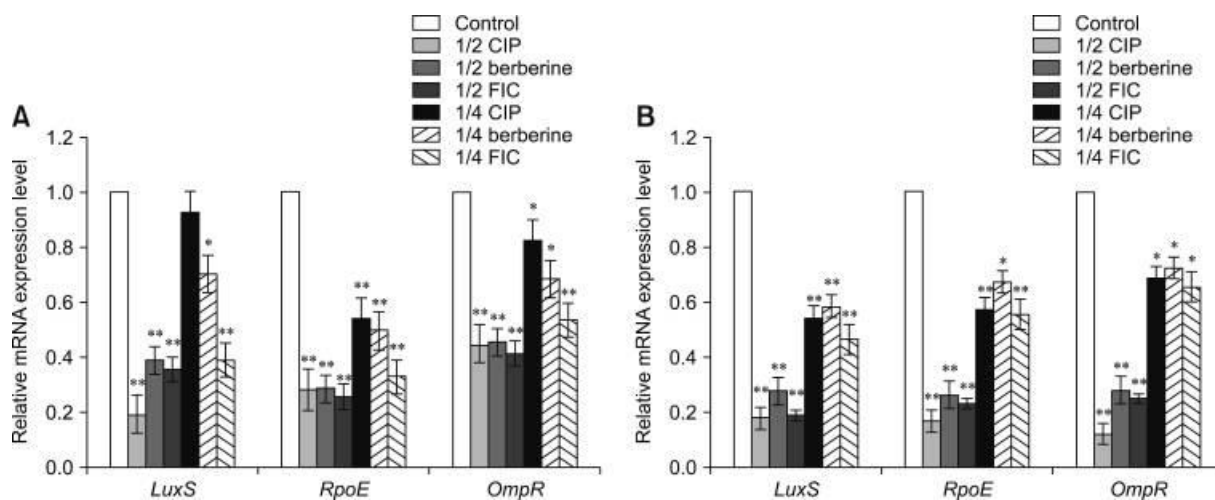
SEM snímky kmeňov *Salmonella* boli urobené na vizualizáciu mikroštruktúry biofilmu, ktorá by mohla odrážať účinok antimikrobiálnych látok (berberín, CIP a kombinácia) na tvorbu biofilmu (Obr). Reprezentatívna mikrofotografia multirezistentných biofilmov kmeňa *Salmonella* (neliečená skupina) je uvedená na paneli A v Obr, mikrofotografia biofilmu CVCC528 je uvedená na paneli B v Obr. Neexistoval žiadny dôkaz o prichytení biofilmu na sklíčko s kmeňom CVCC528. Najmä SEM odhalil vzhľad hrubej polyptychiálnej extracelulárnej polymérnej látky a vzájomnú adhéziu *Salmonella* s vysokou hustotou buniek. Avšak po ošetrení $1/2 \times \text{MIC/FIC}$ koncentráciou antimikrobiálnych činidiel bola mikroštruktúra biofilmu vážne poškodená so zmenami v morfológii buniek (panely C, E a F v Obr). Ošetrené biofilmové bunky boli distribuované v monovrstvách s výrazným znížením hrúbky a veľkosti v porovnaní s neošetrenými bunkami. Keď sa kultivačné médium pridalo ku koncentrácii $1/4 \times \text{MIC/FIC}$ antimikrobiálnych činidiel, pozorovalo sa, že biofilmy majú menšiu hrúbku a menšiu veľkosť ako neošetrené bunky, ale filmy boli oveľa masívnejšie ako v $1/2 \times \text{MIC/FIC}$ ošetrené bunky. Analýza SEM odhalila, že berberín, CIP a kombinácia môžu inhibovať tvorbu biofilmu *Salmonella* pri koncentrácii nižšej ako MIC.



Pozorovania biofilmovej mikroštruktúry kmeňov *Salmonella* pod skenovacou elektrónovou mikroskopiou. (A) Neošetrený multirezistentný kmeň *Salmonella*. (B) Neošetrený kmeň CVCC528. (C) Multirezistentný kmeň *Salmonella* s $1/2 \times \text{MIC}$ koncentráciou CIP. (D) Multirezistentný kmeň *Salmonella* s koncentráciou CIP $1/4 \times \text{MIC}$. (E) Multirezistentný kmeň *Salmonella* s koncentráciou berberínu $1/2 \times \text{MIC}$. (F) Multirezistentný kmeň *Salmonella* s koncentráciou berberínu $1/4 \times \text{MIC}$. (G) Multirezistentný kmeň *Salmonella* s koncentráciou $1/2 \times \text{FIC}$ kombinácie berberínu a CIP. (H) Multirezistentný kmeň *Salmonella* s koncentráciou $1/4 \times \text{FIC}$ kombinácie. MIC, minimálna inhibičná koncentrácia; CIP, ciprofloxacín; FIC, frakčná inhibičná koncentrácia. Mierka = $100 \mu\text{m}$ (A–H).

Účinky antimikrobiálnych látok na mRNA génov *luxS*, *rpoE* a *ompR*

Zmeny v hladinách expresie *luxS*, *rpoE* a *ompR* mRNA sú zobrazené v Obr. V porovnaní s neliečenou skupinou spôsobila prítomnosť antimikrobiálnych činidiel zníženie hladín expresie mRNA troch génov spôsobom závislým od dávky. Okrem toho $1/2 \times \text{MIC/FIC}$ koncentrácie antimikrobiálnych činidiel spôsobili významné zníženie ($p < 0,01$) v hladinách expresie mRNA génov *luxS*, *rpoE* a *ompR*. Kombinácia berberínu a CIP mala silnejší účinok ako CIP alebo samotný berberín pri koncentrácii $1/4 \times \text{MIC/FIC}$ proti multirezistentnému kmeňu *Salmonella*. Ošetrenie $1/4 \times \text{MIC}$ CIP výrazne znížilo expresiu mRNA *ompR* ($p < 0,05$) a expresiu mRNA *rpoE* významne ($p < 0,01$), ale nezmenilo expresiu mRNA *luxS* (panel A v Obr.). Avšak $1/4 \times \text{FIC}$ kombinovanej liečby významne znížila expresiu mRNA všetkých troch génov ($p < 0,01$). Je zaujímavé, že sa zistilo, že CIP bol účinnejší ako berberín alebo kombinácia proti kmeňu CVCC528 (panel B v Obr.). Tieto zistenia naznačujú, že CIP, berberín a kombinácia CIP a berberínu môžu inhibovať expresiu mRNA *luxS*, *rpoE* a *ompR* a kombinácia bola účinnejšia ako samotný CIP alebo berberín pri koncentrácii $1/4 \times \text{MIC/FIC}$.



Účinky antimikrobiálnych činidiel na hladiny expresie mRNA *luxS*, *rpoE* a *ompR* v multirezistentnom kmeni *Salmonella* (A) a v kmeni CVCC528 (B). Výrazný rozdiel (* $p < 0,05$), významný rozdiel (** $p < 0,01$) v porovnaní s neliečenou skupinou. CIP, ciprofloxacín; FIC, frakčná inhibičná koncentrácia.

Diskusia

Berberín je hlavným alkaloidom *C. chinensis* a je najdôležitejším prispievateľom k jeho terapeutickým účinkom; preto sme v súčasnej štúdií extrahovali a použili berberín. Naše výsledky odhalili potenciálny antibakteriálny účinok berberínu na kmene *Salmonella*. V tejto štúdií, založenej na Loewe teórii, FIC index 0,75 odhalil synergický účinok berberínu a CIP proti testovaným kmeňom *Salmonella*. Naše údaje ukazujú, že berberín zvyšuje antimikrobiálnu aktivitu CIP proti *Salmonella* a ich kombinácia môže znížiť dávku CIP potrebnú na terapiu, čo poskytuje ďalší prínos v podobe zamedzenia rezistencie na lieky a vedľajších účinkov.

Predchádzajúce štúdie preukázali antibiofilmový účinok *C. chinensis* na *Escherichia coli* a *Streptococcus suis*. Adhézia baktérií na povrchu je prvým krokom tvorby biofilmu; preto sa študovala adhézia a rast biofilmu, aby sa vyhodnotila schopnosť tvorby biofilmu. Podľa štandardu na testovanie antimikrobiálnej citlivosti *Salmonella* poskytnutom CLSI bol kmeň CVCC528 citlivý na všetky antibiotiká v tomto teste. Z našich výsledkov je zrejmé, že kmeň CVCC528 bol slabým producentom biofilmu, zatiaľ čo multirezistentný kmeň *Salmonella* (č. 5) bol pozorovaný ako silný producent biofilmu. Tvorba biofilmu súvisí so samotnou bunkou a zahŕňa bičíky, pili a protézy a má určitý vzťah s rezistentnými fenotypmi. Bol zistený významný antibiofilmový účinok proti multirezistentnému kmeňu *Salmonella*, vrátane účinnej adhézie a rastu. Zistili sme, že berberín, CIP a ich kombinácia by mohli inhibovať tvorbu biofilmu a dokonca poškodiť biofilmy ovplyvnením hrúbky filmu a veľkosti monovrstiev spôsobom závislým od dávky. Okrem toho sa účinky antibiofilmu medzi antimikrobiálnymi látkami líšili, pričom kombinácia mala silnejší inhibičný účinok ako samotný berberín a CIP. Okrem toho účinky pozitívne korelovali s antimikrobiálnou koncentráciou, najmä pri koncentrácii 1/4 x MIC/FIC. Zistilo sa, že inhibičný účinok proti biofilmom bol obzvlášť evidentný, keď bol berberín kombinovaný s CIP. Na základe týchto zistení by sa kombinácia berberínu a CIP mohla použiť ako nová liečba inhibície biofilmu a následne môže poskytnúť nové stratégie na zabránenie tvorbe biofilmu znížením rýchlosti rastu biofilmu, hustoty buniek a extracelulárnej matrice.

Niektoré gény súvisiace so stresovými reakciami a signalizačným systémom quorum-sensing môžu podporovať liekovú rezistenciu biofilmu. Táto štúdia skúmala reguláciu expresie mRNA niektorých génov súvisiacich s biofilmom. Je známe, že *RpoE* hrá zásadnú úlohu pri aktivácii alebo regulácii génovej expresie v reakcii na tepelný šok, hypertonický tlak, hladovanie a kyslíkový stres. *OmpR* reaguje na osmotický stres a cytoplazmatickú acidifikáciu, čo si vyžaduje sekréciu faktorov virulencie a delícia *ompR* môže viesť k potlačeniu tvorby biofilmu, bičíkov a faktorov virulencie. Ukázalo sa, že bičíky a pili sú dôležité pre adhéziu a kolonizáciu k povrchom a biofilm *Salmonella* je spojený s expresiou celulózy. Delícia *OmpR* má antibiofilmový účinok tým, že potláča pili a celulózu, ale delícia *rpoE* spôsobuje represiu curlí a flagelínu. V tejto štúdii boli expresie mRNA *luxS*, *rpoE* a *ompR* potlačené berberínom, CIP a ich kombináciou v rôznej miere, čo naznačuje, že antibiofilmový účinok berberínu, CIP a kombinácie sa môže vyskytnúť prostredníctvom inhibície curlí, adhézie a buniek. rast represiou expresie génov *luxS*, *rpoE* a *ompR*. Okrem toho sa inhibičný účinok antimikrobiálnych látok zvýšil v závislosti od dávky a bol najvýznamnejší pri koncentrácii 1/2 x MIC/FIC. Mnohé správy preukázali, že tvorba biofilmu môže byť inhibovaná v prítomnosti sub-inhibičných koncentrácií antimikrobiálnych látok spôsobom závislým od dávky. Výsledky tvorby biofilmu a génovej expresie v tejto štúdii ukázali, že inhibičný účinok kombinácie berberínu a CIP pri koncentrácii 1/2 FIC bol účinnejší ako pri koncentrácii 1/4 FIC, čo ukazuje, že k inhibičnému účinku na biofilm došlo v spôsobom závislým od dávky. Okrem toho sa skúmali komparatívne inhibičné účinky troch antimikrobiálnych liečiv. Inhibičný účinok kombinácie berberínu a CIP bol silnejší ako účinok samotného berberínu alebo CIP na multirezistentný kmeň *Salmonella* pri koncentrácii 1/4 × MIC/FIC, ale kombinácia nevykazovala žiadnu zjavnú terapeutickú výhodu pri 1/4 x koncentrácia MIC/FIC. Preto špekulujeme, že tento jav môže súvisieť s fenotypmi multirezistentnej *Salmonella* rezistentnými na liečivá.kmeňa a terapeutickým cieľom CIP. Na základe týchto výsledkov navrhujeme, že antibiofilmový účinok berberínu, CIP a kombinácie boli spojené s downreguláciou *luxS*, *rpoE* a *ompR*, ktoré súvisia s tvorbou pili, celulózy, curlí, flagelínu a faktorov virulencie.

Na záver, naša štúdia odhalila antibiofilmové účinky samotného berberínu a CIP a ich kombinácie. Naše zistenia ukazujú, že gény *luxS*, *rpoE* a *ompR* sú nevyhnutné pre tvorbu biofilmu *Salmonella*. Kombinácia berberínu a CIP vedie k zvýšeniu účinnosti a zníženej toxicite antimikrobiálnych látok. Okrem toho kombinácia znižuje dávku CIP potrebnú na terapiu, pričom poskytuje výhody v podobe zamedzenia rezistencie na liečivo a zníženia vedľajších účinkov. Na potvrdenie a objasnenie vzťahov medzi CIP a berberínom a ich antibiofilmovým účinkom na molekulárnej úrovni je potrebná ďalšia štúdia a na odhalenie mechanizmu tvorby biofilmu je potrebné jasné pochopenie génovej regulácie u *Salmonella*, čo umožní vývoj účinných metód na inhibíciu tvorba biofilmu.

Zdroj: *Combination of berberine and ciprofloxacin reduces multi-resistant Salmonella strain biofilm formation by depressing mRNA expressions of luxS, rpoE, and ompR*

Shi C, Li M, Muhammad I, Ma X, Chang Y, Li R, Li C, He J, Liu F. Combination of berberine and ciprofloxacin reduces multi-resistant *Salmonella* strain biofilm formation by depressing mRNA expressions of *luxS*, *rpoE*, and *ompR*. J Vet Sci. 2018 Nov 30;19(6):808-816. doi: 10.4142/jvs.2018.19.6.808. PMID: 30304890; PMCID: PMC6265579.