

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені В. Н. Каразіна

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та біотехнології

виконано у:
ФЕДЕРАЛЬНА ВИЩА ТЕХНІЧНА ШКОЛА ЦЮРИХА
Факультет біосистем та інженерії, група біоаналітики

**ФОРМУВАННЯ АНТИБІОТИКОВИХ ГРАДІЄНТІВ У МАСИВАХ
ШКОЛИТРОВИХ КАПЕЛЬ ДЛЯ ТЕСТУВАННЯ АНТИМІКРОБНОЇ
ЧУТЛИВОСТІ E. COLI**

Допущена до захисту
«__» _____ 20__ року

Кваліфікаційна робота
студента кафедри
Оніпка І. Р.

Завідувач кафедри Божков А.І

Наукові керівники:
Божков А.І.
Дітріх П.С.

Оцінка «_____»
«__» _____ 20__ р.

Практичний керівник:
Брайтфельд М.

Харків 2023

ABSTRACT

As antibiotic resistance presents an ever-growing threat to public health, new methods are needed to effectively and precisely determine antibiotic efficacy. By employing an *E. coli* quality control strain, the present work confirms the applicability of a novel microfluidic platform for high-throughput and multiplex antibiotic susceptibility testing in bacteria. By using droplet array printing technique, downscaling to 1 nL volumes is achieved in a microarray of approximately 20000 wells.

Validation experiments demonstrate comparability with standard methods used in practice by focusing on the effects of culture volume, type of measurements and initial cell count. Precise minimal inhibitory concentrations in agreement with benchmark testing were established: 0.0116 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for ciprofloxacin and 12.186 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for azithromycin.

Key experiments confirm the ability of the system to form concentration gradients and present new information on the interaction between ciprofloxacin and azithromycin. At the same time, it is shown that significant improvements are required to achieve suitability of the system for further studies. Analysis of antibiotic interaction shows dose-dependent trend from additive to indifferent effects that suggests against the use of high azithromycin concentrations in combination therapy with ciprofloxacin with the goal of effect amplification.

The work contains 62 pages, 14 figures, 55 references and 1 supplementary document.

Keywords: antimicrobial resistance, *Escherichia coli*, ciprofloxacin, azithromycin, droplet microfluidics, microarrays, minimum inhibitory concentrations.

АНОТАЦІЯ

Оскільки резистентність до антибіотиків є постійно зростаючою загрозою для здоров'я населення, потрібні нові методи для ефективного й точного визначення ефективності антибіотиків. Використовуючи штам контролю якості *E. coli*, ця робота підтверджує застосовність нової мікрофлюїдної платформи для високопродуктивного та мультиплексного тестування чутливості бактерій до антибіотиків. За допомогою технології крапельного друку досягається зменшення об'єму тестових реакторів до 1 нл у матриці з приблизно 20000 лунок та високомасштабна паралелізація тестування.

Експерименти з валідації демонструють порівняння зі стандартними методами, зосереджуючись на впливі об'єму культури, типу вимірювань і початковій кількості клітин. Було встановлено точні мінімальні інгібіторні концентрації відповідно до еталонного тестування: 0,0116 мкг/мл для ципрофлоксацину та 12,186 мкг/мл для азитроміцину.

Ключові експерименти підтверджують здатність системи формувати градієнти концентрацій та представляють нову інформацію про взаємодію між ципрофлоксацином і азитроміцином. Водночас показано, що необхідні значні вдосконалення для досягнення придатності системи для подальших досліджень. Аналіз взаємодії антибіотиків показує дозозалежну тенденцію від адитивних до індіферентних ефектів, що свідчить проти використання високих концентрацій азитроміцину в комбінованій терапії з ципрофлоксацином для підсилення ефекту.

Робота містить 62 сторінки, 14 рисунків, 55 джерел та 1 додаток.

Ключові слова: антимікробна резистентність, *Escherichia coli*, ципрофлоксацин, азитроміцин, капельна мікрофлюїдика, мікромасиви, мінімальні інгібуючі концентрації.

ЗМІСТ

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ.....	7
ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1. Стойкість бактерій до антибіотиків	10
1.1.1 Бактеріальні інфекції та терапевтичні втручання.....	10
1.1.2. <i>E. coli</i> як збудник.....	11
1.1.3. Стратегії лікування та резистентність	12
1.2 Антибіотикотерапія інфекцій <i>E. coli</i>	13
1.2.1. Клінічні рекомендації.	13
1.2.2. Характеристика ципрофлоксацину.....	14
1.2.3. Характеристика азитроміцину.	15
1.2.4. Комбінація азитроміцину і ципрофлоксацину.....	16
1.3. Тестування антимікробної чутливості.	17
1.3.1. Стандартні методи тестування антимікробної чутливості.	17
1.3.2. Застосування мікрофлюїдики у біологічних дослідженнях	18
1.3.3. Мікрофлюїдика в тестуванні антибіотикової чутливості.	19
1.3.4. Платформи мікромасивів.....	20
1.3.5. Робоча гіпотеза	21
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	23
2.1. Штами бактерій і культивування.....	23
2.2. Антибіотики для АСТ	24
2.2.1. Ципрофлоксацин.	24
2.2.2. Азитроміцин.	24

	5
2.3. Валідація тестування	25
2.4. Конструкція мікрофлюїдного пристрою.....	26
2.4.1. Пластина із мікромасивом.....	26
2.4.2. Капілярна система та подача рідини.	27
2.4.3. Дизайн друкуючої головки.....	29
2.5. Тест антибіотикової чутливості на мікрофлюїдній платформі	31
2.5.1. Відношення тиску до об'єму.....	31
2.5.2. Експериментальний дизайн.	32
2.5.3. Обґрунтування вибору щільності посівного матеріалу.....	33
2.6. Збір та аналіз даних.....	34
2.6.1. Реєстрація росту бактерій.....	34
2.6.2. Аналіз даних.	35
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	37
3.1. Вплив обсягу культури	37
3.2. Валідація вимірювань флуоресценції для вимірювання росту	39
3.3. Ефект інокулюму в еталонному тесті антибіотикової чутливості	41
3.4. Мікрофлюїдні експерименти тестування чутливості до антибіотиків	43
3.4.1. Характеристика однорідності та градієнту	43
3.4.2. Клітинне навантаження	47
3.4.3. Визначення МІК.	49
3.5. Оцінка взаємодії антибіотиків за FICI	51
ВИСНОВКИ.....	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	54

ДОДАТКИ 62

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

- МІК – мінімальна інгібуюча концентрація;
- СРБ – сульфородамін В;
- МХБ – бульйон Мюллера-Хінтона;
- ДМСО – диметилсульфоксид;
- ПДМС – полідиметилсилоксан;
- КУО – колонієутворююча одиниця;
- ОГ – оптична густина;
- HPLC – high-performance liquid chromatography, високоефективна рідинна хроматографія;
- GFP – green fluorescent protein, зелений люмінесцентний білок;
- FICI – fractional inhibitory concentration index, індекс часткової інгібуючої концентрації;
- E. coli* – *Escherichia coli*;
- ДНК - дезоксирибонуклеїнова кислота;
- РНК - рибонуклеїнова кислота;
- рРНК - рибосомальна РНК;
- мРНК – матрична РНК;
- ІЛ – інтерлейкін.

ВСТУП

Серед багатьох причин людської смерті бактеріальні інфекції посідають перше місце і впливають на охорону здоров'я з самого початку людської історії [1]. Однак відкриття антибіотиків, які можуть пригнічувати ріст бактерій, повністю змінило наш спосіб реагування на загрози від патогенів. Протягом останніх десятиліть багато препаратів були комерціалізовані та стали невід'ємною частиною клінічних протоколів [2]. Проте широке використання антибіотиків призвело до появи резистентності, що створює дедалі більшу загрозу для успіху лікування [3].

Однією з найнебезпечніших бактерій за кількістю смертельних випадків від резистентності є *Escherichia coli* (*E. coli*), грамнегативна бактерія, більшість штамів якої нешкідливі та зазвичай присутні як частина здорової мікрофлори людини [4]. Але патогенні штами *E. coli* є гострою проблемою через їх вплив і підвищення стійкості до антибіотиків. Для лікування таких інфекцій можна використовувати різні стратегії, включаючи комбіновану терапію [5] [6]. Ципрофлоксацин і азитроміцин були показані ефективними для лікування інфекцій, викликаних *E. coli*, але відсутня чітка інформація про їх взаємодію у такому лікуванні.

Одним із способів протидії поширенню резистентності до антибіотиків є тест на чутливість до антибіотиків, який визначає відповідне дозування та тип антибіотиків, ефективних для конкретного типу бактерій. Таким чином, ці тести надають інформацію для прийняття клінічних рішень і раннього виявлення ознак поширення резистентності [1]. Однією з головних проблем у цій галузі є значний час, необхідний для отримання результатів, і компроміс між економічною ефективністю та точністю [7]. Крім того, багато методів покладаються на ручну працю, що вимагає підвищеної підготовки, точних навичок і додає можливості помилок.

Мікрофлюїдні методи засновані на маніпуляціях з рідиною в дуже малих обсягах і пропонують вирішення багатьох проблем, згаданих раніше [8] [9]. Зменшення масштабу реакції не тільки економить реагенти, але також має потенціал для прискорення виявлення відповіді бактерій на терапію. Крім того, стають можливими складні операції з рідиною, автоматизація та висока пропускну здатність, тоді як загальний об'єм зразка залишається меншим, ніж необхідний для однієї комбінації у стандартних методах.

Метою та практичним значенням даної роботи є створення методу мультиплексного тестування антимікробної чутливості бактерій на новій мікрофлюїдній платформі, яка використовує технологію краплинного друку для формування градієнтів концентрації. **Теоретична значущість** роботи полягає в отриманні нових даних щодо ефективності та ефектів комбінованої терапії ципрофлоксацину та азитроміцину для *E. coli*.

Наша **робоча гіпотеза** полягає в тому, що використання краплинної мікрофлюїдики для визначення стійкості бактерій до антибіотиків дозволить точно визначити мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) і динаміку росту бактерій. Крім того, ми передбачаємо, що взаємодія між ципрофлоксацином та азитроміцином не відіграватиме ролі в комбінованій терапії.

Відповідно до цієї мети були визначені такі **завдання**:

1. Дослідити динаміку росту *E. coli* в різних об'ємах культури.
2. Провести тест на чутливість *E. coli* до ципрофлоксацину та азитроміцину відповідно до встановлених рекомендацій та протоколів.
3. Провести тест на чутливість *E. coli* шляхом формування градієнта концентрацій на мікрофлюїдній платформі.
4. Порівняти спостережуваний ефект антибіотиків з очікуваним ефектом згідно з еталонними протоколами та робочою гіпотезою.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Стійкість бактерій до антибіотиків

1.1.1 Бактеріальні інфекції та терапевтичні втручання. Інфекції, викликані бактеріями, становлять одну з найбільших небезпек для здоров'я населення в усьому світі. Разом на них припадає приблизно 24% усіх смертей людей у світі [1]. Виявлення бактерій як основної причини багатьох хвороб призвело до розробки ефективних методів боротьби з ними протягом останніх півтора століть. Боротьба з хвороботворними бактеріями, яка спочатку починалася з дотримання гігієни та дезінфекції, досягла нової віхи в ХІХ столітті, коли набули широкого застосування антибіотики – сполуки, що володіють активністю проти бактеріальних мікроорганізмів [2].

Відкриття мікофенолової кислоти та арсфенаміну як перших окремих сполук з антибактеріальною дією супроводжувалося спостереженням Флемінга за ефектом пеніциліну, що призвело до першого в історії масового виробництва антибіотиків і відкриття нових сполук. Протягом наступних кількох десятиліть було відкрито багато нових антибіотиків і класифіковано їх на групи відповідно до механізму дії. Усі механізми можна охарактеризувати як бактеріостатичні (перешкоджають розмноженню спільноти мікроорганізмів) або бактерицидні (втручаються в життєво необхідні процеси і тим самим вбивають організм). [2]

Першим відкритим класом антибіотиків було сімейство β -лактамів, які перешкоджають утворенню пептидоглікану і, таким чином, цілісності клітини. Потім були відкриті бактеріостатичні сульфаніламідні, які вибірково впливають на синтез бактеріальної фолієвої кислоти, і бактерицидні аміноглікозиди, які пригнічують активність рибосом. У 1950-х роках було відкрито ряд нових бактеріостатичних засобів, які активно

використовуються досі: тетрацикліни, хлорамфенікол і макроліди. Як і у випадку з оксазолідинонами, відкритими приблизно через 30 років, вони спрямовані на послідовності рибосомальної рибонуклеїнової кислоти (рРНК) і пригнічують синтез білка, щоб запобігти розмноженню бактерій. [2], [10]

П'ять інших класів антибіотиків, відкритих у другій половині 20-го століття, виявляють свою бактерицидну дію шляхом: 1) впливу на синтез клітинної стінки (глікопептиди), 2) інгібування синтезу рибонуклеїнової кислоти (РНК) (ансаміцини), 3) зв'язування рибосоми для запобігання синтезу білка (стрептограміни), 4) інгібування реплікації дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) (хінолони) і 5) руйнування клітинної стінки (ліпоглікопептиди). [2]

Проте, незважаючи на всі досягнення в антибіотикотерапії, однією з причин, чому бактеріальні інфекції все ще спричиняють приблизно 13 мільйонів смертей на рік, є дедалі зростаючий вплив резистентності до антибіотиків. У 2019 році, останньому році, за який доступні вичерпні дані про тягар захворювань, бактеріальні інфекції спричинили приблизно 5 мільйонів смертей. Вже одна ця кількість робить їх головною причиною смертності у всьому світі [3]

1.1.2. *E. coli* як збудник. Хоча *E. coli*, як правило, є природним мешканцем шлунково-кишкового тракту людини і не представляє небезпеки для здоров'я людини, вона є небезпечним збудником у випадку певних штамів [4]. Виділяють дві головні небезпечні підкатегорії, які є причиною інфекцій у людини: уропатогенна [11], яка відповідає за більшість урологічних інфекцій у світі, та ентероагрегативна *E. coli* [4].

У якості небезпечного збудника *E. coli* відповідає за більшість смертей, пов'язаних із резистентністю, і, таким чином, визнана пріоритетним патогеном для досліджень та розробок [10]. Тільки

резистентна до фторхінолонів кишкова паличка спричинила 56 мільйонів смертей у 2019 році, тоді як мультирезистентний варіант спричинив 219 мільйонів смертей. Оскільки резистентність до антибіотиків продовжує зростати, надзвичайно важливо контролювати чутливість *E. coli*, особливо в клінічних умовах, де вона може легко поширюватися.

1.1.3. Стратегії лікування та резистентність. Особливе занепокоєння викликають мультирезистентні бактерії, які стійкі до кількох антибіотиків. Для успішного лікування їм може знадобитися терапія двома або більше комбінаціями антибіотиків. Ця мультимедикаментозна терапія використовується як для безпосередньо лікування, так і для запобігання появі стійкості до антибіотиків [5].

Профілактика заснована на тому факті, що бактерії повинні виділяти більше ресурсів на проліферацію, розповсюдження та адаптацію до нових хазяїв, а також на інші клітинні процеси для боротьби з ефектами антибіотика, таким чином зменшуючи свою придатність у вищезазначених областях. Цей компроміс можна оцінити як вартість придатності, і в більшості випадків він вищий для мутацій, які передають стійкість до двох і більше антибіотиків одночасно, ніж для комбінації мутацій, які надають стійкість до кожного антибіотика окремо. Таким чином, у бактерій менша ймовірність розвитку протимікробної резистентності, коли інфекцію лікують різними антибіотиками одночасно, ніж при лікуванні, при якому ці антибіотики застосовуються окремо. Це особливо важливо в лікарнях, де кілька пацієнтів лікуються в одному середовищі, і ймовірність виникнення резистентності має бути мінімізована. Було підтверджено, що описана стратегія має вищі шанси на успіх, ніж перемикання між різними монопрепаратами з плином часу або між пацієнтами в одній установі. [6]

Контроль над резистентністю може бути досягнуто завдяки синергії антибіотиків, при якій ефект комбінації антибіотиків, що вводяться

одночасно, перевищує суму очікуваних індивідуальних ефектів цих антибіотиків [5]. Це також може усунути ризик розвитку інфекції, стійкої до одного антибіотика, яка зберігається навіть при застосуванні антибіотиків-антагоністів. У цьому випадку ріст бактерій, стійких до одного антибіотика, пригнічується іншим антибіотиком. Тим не менш, у всіх випадках будь-який вид ефекту, що виникає в результаті комбінування різних препаратів, слід оцінювати індивідуально і не можна робити висновок на основі фармакодинамічних досліджень або знань про механізм дії. [12]

Розуміння точних ефектів, що виникають у результаті взаємодії різних сполук, необхідне для правильного пояснення спостережуваної динаміки інфекції та досягнення бажаних цілей лікування. Наприклад, щоб максимізувати ефект в окремому випадку, потрібно шукати комбінації діючих речовин, які підсилюють дію інших. Проте антагоністичні стосунки можуть бути корисними для мінімізації виникнення стійкості до кількох лікарських засобів. У цьому випадку бактерії, які отримали резистентність до одного з агентів, стикаються з вищим ефектом від іншого антибіотика, оскільки він більше не пригнічується. Таким чином, набуття резистентності суттєво дестимулювано, тоді як у випадку синергічних відносин монорезистентні бактерії мають нижчий бар'єр для набуття другої мутації, що призводить до швидшої еволюції. [13]

1.2 Антибіотикотерапія інфекцій *E. coli*

1.2.1. Клінічні рекомендації. Ципрофлоксацин є рекомендованим антибіотиком для лікування інфекцій *E. coli* у багатьох випадках: при урологічних інфекціях [14], [15], при резистентності до інших антибіотиків [16], при ентероагрегативних інфекціях [17]. Ефективність азитроміцину як альтернативного новітнього методу лікування була показана проти

ентероагрегативних штамів *E. coli* та у випадках резистентності до інших антибіотиків [18]–[20]

1.2.2. Характеристика ципрофлоксацину. Ципрофлоксацин належить до бактерицидних антибіотиків класу фторхінолонів, які діють шляхом зв'язування з ланцюгом ДНК і порушують нормальну активність топоізомераз ДНК типу II. У *E. coli* основним ферментом, на який спричиняється вплив, є гіраза, а вторинний ефект досягається шляхом взаємодії з топоізомеразою IV. Відносна важливість мішеней може змінюватися для інших видів, особливо грампозитивних бактерій. Щоб функціонувати належним чином у нормі, обидва ферменти повинні спочатку розщепити ДНК, а потім зв'язати її в певних місцях. Фторхінолони стимулюють розщеплення, одночасно запобігаючи лігуванню, і таким чином порушують стабільну безперервність геному. [21]

Механізм дії заснований, по-перше, на зв'язуванні з активним центром ДНК, де відбувається активність ферменту, і збільшенні кількості комплексів розщеплення. По-друге, взаємодія з топоізомеразами запобігає перев'язці розривів у ДНК під час інтеркаляції препарату в ДНК. Коли інші структури, залучені до реплікації або транскрипції, стикаються зі стабілізованими комплексами розщеплення, вони перетворюються на постійні хромосомні розриви. Незважаючи на негайну активацію систем репарації ДНК, кількість індукованих розривів може бути надмірною та призвести до загибелі клітини. Блокування активності ферментів топоізомераз II типу також слугує додатковим негативним впливом на клітинні процеси та підвищує ймовірність загибелі клітин. [21]

Помітною властивістю хінолонів є здатність розрізняти людські та бактеріальні топоізомерази типу II через еволюційні відмінності в амінокислотних послідовностях. Взаємодії препарату з ферментами сприяє іонний міст $\text{H}_2\text{O}-\text{Mg}^{2+}$. З одного боку Mg^{2+} координується з молекулами H_2O ,

які утворюють водневі зв'язки із залишками амінокислот серину та глютамінової/аспарагінової кислоти ферменту, а з іншого боку він хелатується з антибіотиком. Проте людські ферменти не мають необхідних залишків у подібних позиціях послідовності, що запобігає зв'язуванню клітин з препаратом. Такі селективні взаємодії значно покращують терапевтичний індекс ципрофлоксацину, який використовується для вимірювання компромісу між безпекою та ефективністю препарату. У точному вираженні він розраховується як співвідношення дози, яка викликає негативний ефект в обробленому організмі (смерть у дослідженнях на тваринах або визначений токсичний ефект у клінічних дослідженнях на людях), і дози, яка може досягти бажаного клінічного ефекту. [21]

Ципрофлоксацин має дуже виражену дію проти *E. coli*, подібно до інших грамнегативних ентеропатогенів і на відміну від грампозитивних бактерій, для яких необхідні діапазони МІК майже в 10-20 разів вищі (нижні межі становлять 0,25 мкг/мл і 0,007-0,015 мкг/мл відповідно). Його дію можна спостерігати швидко і на будь-якому етапі кривої росту. [22]

1.2.3. Характеристика азитроміцину. Азитроміцин є відомим бактеріостатичним антибіотиком широкого спектру дії класу макролідів, члени якого пригнічують синтез білка та перешкоджають розмноженню бактерій, не вбиваючи їх. Інгібування досягається завдяки здатності макролідів зв'язуватися з сильною афінністю до молекули 23S рРНК, розташованої в 50S субодиниці бактеріальної рибосоми. Таким чином, молекули антибіотиків запобігають утворенню пептидних зв'язків і пригнічують транслокацію рибосом уздовж ланцюга матричної РНК (мРНК). Це зрештою порушує синтез бактеріального білка, що призводить до порушення росту та реплікації. Ефект залежить від концентрації та схожий на ефект еритроміцину, але завдяки кращій здатності проникати

через клітинні мембрани азитроміцин значно більш ефективніший при грамнегативних бактеріальних інфекціях. [23], [24]

У поєднанні з його протизапальними та імуномодуючими властивостями це особливо хороший вибір для пацієнтів з додатковими ускладненнями, такими як запалення. Азитроміцин впливає на передачу сигналів клітинами запалення шляхом зниження рівня інтерлейкінів (IL-1b, IL-6, IL-8, IL-12), виробництва фактора некрозу пухлини альфа (TNF- α), мРНК і білків, NF- κ B (підсилювача легкого ланцюга каппа ядерного фактора активованих В-клітин) та інших прозапальних цитокінів. Ці процеси додатково впливають на поляризацію макрофагів, процес, за допомогою якого макрофаги приймають різні функціональні фенотипи у відповідь на специфічні сигнали середовища. Дослідження показали, що азитроміцин може модулювати поляризацію макрофагів до типу 2, який пов'язан із протизапальними реакціями та відновленням тканин [23]

1.2.4. Комбінація азитроміцину і ципрофлоксацину. Індивідуальні МІК для *E. coli* ATCC 25922 зазвичай коливаються від 4 до 8 мкг/мл для азитроміцину [25]–[27] і від 0,004 до 0,008 мкг/мл для ципрофлоксацину [28]–[30]. Високі рівні азитроміцину пояснюються внутрішньою резистентністю кишкової палички до макролідів, що, тим не менш, дозволяє проводити ефективне лікування. Азитроміцин має особливу здатність концентруватися в тканинах організму, таким чином зберігаючи особливо тривалий період напіввиведення до 40 годин і подовжуючи дію на бактерії [23], [27]. Обидва антибіотики можна застосовувати перорально, що є унікальною властивістю, яка забезпечує широкий спектр дії [23], [31]

Загалом поєднання бактеріостатичних і бактерицидних антибіотиків вважається антагоністичним, оскільки перша категорія діє переважно на клітини, що діляться. Проте наявна література суперечлива. Комбінація ципрофлоксацину та еритроміцину, що має аналогічний до азитроміцину

принцип дії, для *E.coli* була характеризована як індиферентна [32]. Аналогічна інформація наявна і для комбінації азитроміцину із деякими флюорохінолонами [33]. При цьому синергічна взаємодія азитроміцину та ципрофлоксацину була описана для *Pseudomonas aeruginosa* [34] та *Acinetobacter baumannii* [35], але не для *E. coli*.

Тож існує теоретична прогалина в даних про взаємодію азитроміцину з ципрофлоксацином для інгібування *E. coli*, а наявні суміжні дані суперечливі. Генералізовані клінічні дані щодо використання вказаної комбінації для лікування інфекцій (у тому числі викликаних *E. coli*) вказують на успішність терапії та відсутність ефектів, які могли б заважати її використанню [36]. Як результат, детальна інформація стосовно ефектів взаємодії цих антибіотиків дозволить приймати більш аргументовані рішення щодо їх сумісного призначення у клінічному лікуванні.

1.3. Тестування антимікробної чутливості.

1.3.1. Стандартні методи тестування антимікробної чутливості.

Розуміння очікуваної сприйнятливості до медикаментозного лікування під час інфекції є важливим для прийняття індивідуальних рішень щодо терапії, а також для глобальних політичних зусиль [1]. Неправильне використання антибіотиків, які неефективні проти конкретного випадку інфекції, може сприяти невдачі лікування та розвитку резистентності. Тому вкрай важливо, щоб збудники були перевірені на їх чутливість до певних препаратів шляхом проведення тесту на чутливість до антибіотиків. У клінічному лікуванні результати таких тестів допомагають прийняти рішення щодо розробки найкращого плану лікування. Існує кілька методів, які зазвичай використовуються для цієї мети [37].

Одним із найпростіших і економічно ефективних рішень є метод дискової дифузії, при якому пластир із певною концентрацією антибіотика накладається на агарову пластину, засіяну досліджуваним організмом. Діаметр кола, в якому не спостерігається зростання, дає інформацію про чутливість ізоляту до препарату. Але недоліком цього методу є лише напівкількісний результат і тривалий час для тестування [37], [38]

Розведення бульйону є іншим поширеним методом, перевага якого полягає в тому, що він дозволяє отримати точну кількісну мінімальну інгібіторну концентрацію [37] Тим не менш, як і усі стандартні методи, він потребує значних ручних зусиль [7]

1.3.2. Застосування мікрофлюїдики у біологічних дослідженнях.

Мікрофлюїдика займається контролем та маніпуляцією рідинами в мікромасштабі з об'ємом від мікролітрів (10^{-6} літрів) до піколітрів (10^{-12} літрів). Завдяки значному зменшенню об'єму зразка ця область пропонує значні переваги перед системами з більшими об'ємами, наприклад швидший час реакції, менше споживання реагентів, більша чутливість і висока пропускна здатність. Крім того, невеликі розміри пристроїв полегшують портативність і економлять ресурси при їх виготовленні та утилізації. [8]

Багато пристосувань, де можна використовувати мікрофлюїдику, зосереджуються на наукових дослідженнях у біології та надають унікальні можливості для виявлення поведінки біологічних систем в умовах, яких важко або взагалі неможливо досягти в традиційних системах. У той же час, мікрофлюїдні системи можуть представляти додаткові проблеми, такі як складні етапи підготовки реагентів. Це стає ще більшою проблемою, коли потрібно забезпечити індивідуальні умови, наприклад, різний склад реагентів для певної кількості повторень. У багатьох випадках платформи оптимізовані для використання однакових умов зовнішнього та внутрішнього середовища між повторами. Однак, під час тестування

багатьох різних умов необхідно забезпечити уникнення перехресного забруднення та точну маніпуляцію сполуками у просторі [8].

Відстежувати ріст біологічних об'єктів у мікрофлюїдних платформах можна декількома методами: зміною інтенсивності флуоресценції, вимірюванням оптичної щільності та аналізом кількості присутніх біомолекул, таких як нуклеїнові кислоти або білки. Флуоресцентні білки, які внутріклітинно виділяються бактеріями, дозволяють чітко відстежувати ріст без використання інших сполук і часто використовуються в дослідженнях. Однак цей метод не може бути перенесений на клінічне тестування, оскільки самі тестовані ізоляти не мають флуоресцентних маркерів. Водночас вимірювання щільності, засновані на оптичному детектуванні, потребують значно більшого часу для отримання результатів без спеціального обладнання та складної технології [39].

1.3.3. Мікрофлюїдика в тестуванні антибіотикової чутливості.

Сфера тестів антибіотикової чутливості надає значний потенціал для вдосконалення: наприклад, швидший метод отримання результатів може спасти життя пацієнта завдяки коректній ідентифікації резистентного фенотипу патогена. Вартість витратних матеріалів, реагентів або дорогоцінних зразків можна було б зменшити, а ручну працю, схильну до помилок, автоматизувати [9]. Це саме ті переваги, які пропонують мікрофлюїдні методи, як обговорювалося раніше. Вони особливо корисні для інфекцій, пов'язаних із бактеріями, що повільно ростуть, і дозволяють значно скоротити час для отримання результатів тесту.

Пристрої, які зазвичай використовуються для мікрофлюїдної тест антибіотикової чутливості, можна розділити на кілька форматів. Статичні камери являють собою лунки, заповнені середовищами, розчинами антибіотиків і бактеріями. Вони дозволяють високопродуктивний скринінг, але можлива лише обмежена кількість умов, а ручна обробка може бути

значною частиною операції. Проточні камери покладаються на дифузію з основного каналу з безперервною подачею середовища в розділові секції, і, отже, можуть не забезпечити точний контроль концентрації та стабільність, необхідні для візуального моніторингу реакції за допомогою мікроскопії. Метод висячих крапель пропонує кращу масштабованість, але це компенсується складною розробкою та обробкою, включаючи проблеми із збором даних та аналізом. Інший тип, краплинні мікромасиви, базуються на перевагах статичних камер і пропонують значно краще мультиплексування та маніпуляції з рідкими розчинами. Вони представляють збалансований профіль переваг і проблем, пов'язаних із впровадженням мікрофлюїдних методів [39].

1.3.4. Платформи мікромасивів. Конструкції масиву крапель зазвичай базуються на твердій опорі, в якій виготовлено кілька окремих лунок невеликого об'єму для розміщення крапель у бажаних місцях. Вони особливо підходять для пошуку ліків, де звичайні методи, такі як 96- або 384-лункові планшети, вимагають значної кількості реагентів. Такі досягнення мають потенціал захопити сферу високопродуктивного скринінгу, і подальші зусилля повинні бути спрямовані на розробку автоматизованих платформ [40]. Одним із широких напрямків автоматизації процесу є струменевий крапельний друк, коли попередньо створені краплі води в маслі розподіляються через мікрофлюїдний чіп на мікроматрицю. Гнучкість методу дозволяє різноманітні комбінації маніпуляцій, таких як додавання додаткової рідини в певних просторових і часових точках або, за допомогою вакууму, виокремлення дозованих крапель для подальшої обробки [41]

Нова технологія, що значно полегшує створення крапельних мікромасивів, базується на супергідрофобно-супергідрофільних структурах, що розділяють окремі лунки, як біореактори [42]. Цей метод надає

можливість будувати масиви високої щільності з масштабуванням об'єму до піколітра [43] і фемтолітра [44].

Мікрофлюїдні пристрої можна класифікувати за допомогою вдосконалення різних фаз робочого процесу тесту антибіотикової чутливості. Деякі з них лише забезпечують додаткову цінність під час етапів мікроскопії та інкубації, але не усувають тривалих і складних етапів ручного завантаження. Інші дозволяють розширити функціональність аналізу за допомогою ідентифікації видів патогенів на основі антитіл. Третя категорія пристроїв використовує принцип генерації градієнта, щоб полегшити отримання діапазону змінних концентрацій всередині чіпа [45]. Поєднання двох різних градієнтів дозволяє сформувати шаховий градієнт або перехресний градієнт, забезпечуючи матрицю концентрацій антибіотиків. Важливим застосуванням цього підходу є визначення взаємодії антибіотиків, що було успішно продемонстровано Opalski et al. Система заснована на друку градієнтних масивів крапель, але має значні обмеження, такі як складні процеси обробки, антибіотики, нанесені УФ-опроміненням (що обмежує можливий вибір сполук), і використання матеріалу PDMS, який дуже рідко використовується для комерційного виробництва [46]. Оскільки успішні подібні концепції застосовуються рідко, розробка нових підходів є надзвичайно важливою.

1.3.5. Робоча гіпотеза. У цій роботі ми пропонуємо оптимізацію нової платформи краплинного друку для культивування бактерій і відстеження динаміки їх росту в краплях рідини. Ми стверджуємо, що він має простий протокол обробки, автоматизоване формування градієнта та відкритий тип обробки крапель, що дозволяє повторювати маніпуляції з краплями, наприклад додавати нові рідини через певний період часу. Він також представляє потенціал для комерційного застосування завдяки

використанню надійних виробничих процесів, придатних для масового виробництва.

Ми очікуємо підтвердити його застосування в областях, де потрібна висока пропускна здатність і тестування в різних умовах. Щоб підтвердити гіпотезу, ми досліджуємо можливу комбіновану терапію з градієнтами концентрацій ципрофлоксацину та азитроміцину. У якості моделі ми використовуємо штам для контролю якості *E. coli* ATCC25922 та припускаємо, що ми побачимо різні моделі росту залежно від концентрації антибіотика. Це дасть нову інформацію про взаємодію між цими двома антибіотиками, про яку раніше не повідомлялося. Виходячи з наявних даних про взаємодію між східними комбінаціями антибіотиків, ми очікуємо спостерігати індіферентний або синергічний ефект та відсутність антагонізму.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Штами бактерій і культивування

Для всіх експериментів ми використовували штам *Escherichia coli* ATCC 25922, модифікований для конститутивної надекспресії sfGFP (зелений флуоресцентний білок-суперфолдер). Модифікація була заснована на плазміді зі стійкістю до канаміцину.

Культивування бактерій проводили відповідно до встановлених протоколів [47], [48] при 37 °C в бульйоні Мюллера-Хінтона (МХБ) 2 з відкоректованим вмістом катіонів (Sigma-Aldrich, 90922) для культур у рідкому середовищі або агарі Мюллера-Хінтона (Sigma-Aldrich) для культури на твердих середовищах. У всіх випадках стерильний розчин канаміцину сульфату (Thermo Fisher Scientific, 15160-054) додавали після автоклавування до кінцевої концентрації 50 мкг/мл для підтримки плазміди. Рідкі культури безперервно струшували зі швидкістю 200-220 об/хв, щоб забезпечити рівномірний розподіл поживних речовин і аерацію в середовищах. Усю обробку бактерій і стерильних компонентів проводили в асептичних умовах у ламінарному боксі BSL1.

Спочатку було підготовлено два кріостоки для подальшого використання в експериментах. Чисту культуру бактерій торкалися петлею, а потім наносили на чашку Петрі, наповнену агаром. Після інкубації протягом ночі одну окремо зростаючу колонію переносили в рідку культуру, а потім рекультивували наступного дня. Отриману культуру переносили в 2 мл кріопробірки з рідким середовищем, що містить 30 відсотків гліцерину, які потім зберігали при -80 °C до використання. Тільки одна з них постійно

використовувалася протягом усього експерименту, а інша служила резервною копією.

За один день до кожного експерименту готували прекультуру, торкаючись кріостоку інокуляційною петлею та занурюючи її в 2 мл рідкого середовища, що міститься в пробірках для центрифугування на 10 мл. Попередню культуру рекультивували наступного дня в тих самих умовах із початковою оптичною густиною на 600 нм ($ОГ_{600}$), відкоригованою до 0,2 (відповідає приблизно $1,6 \times 10^8$ КУО/мл) і використовували пізніше того самого дня в її пізній експоненціальній або стаціонарній фазі. Для вимірювання $ОГ$ використовували спектрофотометр (Nanophotometer, Implen) з бульйоном Мюллера-Хінтона як еталоном. Виняток із цього протоколу було зроблено для культивування великого об'єму в колбах Ерленмейєра з перегородками, де початковий об'єм попередньої культури був зменшений до 1 мл, а рекультивація в 3 мл середовища з початковою $ОГ_{600}$ 0,4 була виконана пізніше того ж дня. Отриманий ріст переносили в 30 мл середовища в стерильній колбі з початковим $ОГ_{600}$ 0,2.

2.2. Антибіотики для АСТ

2.2.1. Ципрофлоксацин. Ципрофлоксацин класу HPLC (ВЕРХ, високоефективна рідка хроматографія) із чистотою $\geq 98\%$ був придбаний (Sigma-Aldrich, 17850) і розчинений у стерильній H_2O до концентрації 0,4 мг/мл. Невелику кількість 0,1 М HCl додавали до розчину для сприяння розчиненню, що містить приблизно 8% вмісту ципрофлоксацину (моль/моль). Отриманий вихідний розчин зберігали при $-20\text{ }^\circ\text{C}$, коли він не використовувався.

2.2.2. Азитроміцин. Було придбано азитроміцину дигідрат класу HPLC з чистотою $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, PZ0007) і, згідно з інструкціями

виробника, розчинений у стерильному ДМСО в концентрації 5 мг/мл. Як було встановлено виходячи з літератури, фінальні концентрації ДМСО є значно меншими, ніж ті, що впливають на зріст бактерій та ефект антибіотиків [49]. Аліквоти по 20 мкл відбирали з основного розчину і зберігали при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до використання. Кожну аліквоту використовували протягом не більше 2 днів.

Усі подальші розведення вихідних антибіотиків проводили в МНВ з додаванням 2х концентрованого розчину у кількостях, необхідних, щоб компенсувати вміст води або ДМСО та забезпечити 100% необхідного вмісту поживних речовин в отриманому розчині.

2.3. Валідація тестування

Як еталон для подальшого порівняння, тестування чутливості до антибіотиків проводили в 96- та 384-лункових планшетах методом мікророзведення відповідно до стандарту ISO 20776-1:2019 та рекомендацій EUCAST [28], [50], за винятком наступних модифікацій: загальний об'єм робочих розчинів після додавання інокулюму становив або 150 мкл (96-лункові планшети), або 60 мкл (384-лункові планшети), а температура культивування становила $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Використані найнижчі концентрації антибіотиків становили 0,00025 мкг/мл для ципрофлоксацину та 0,125 мкг/мл для азитроміцину, які потім подвоювали за 11 етапів, що призвело до 12 серійних подвійних розведень у діапазоні від 0,00025 до 0,256 мкг/мл для ципрофлоксацину та від 0,125 до 12,8 мкг/мл для азитроміцину.

У 96-лункових планшетах було перевірено загалом 4 початкові концентрації інокулюму за тим самим протоколом: 5×10^5 КУО/мл (рекомендовано EUCAST та ISO, відповідає OГ_{600} 0,000625), 4×10^6 КУО/мл (OГ_{600} : 0,005), $1,6 \times 10^7$ КУО/мл (OГ_{600} : 0,02), $1,6 \times 10^8$ КУО/мл (OГ_{600} : 0,2).

Для 384-лункового планшета використовували концентрацію інокулюму $1,6 \times 10^7$ КУО/мл ($ОГ_{600}$: 0,02), а діапазон концентрацій антибіотиків було зменшено до 8 двократних розведень від 0,0005 до 0,064 мкг/мл для ципрофлоксацину та від 0,25 до 32 мкг/мл для азитроміцину.

2.4. Конструкція мікрофлюїдного пристрою

2.4.1. Пластина із мікромасивом. Щоб забезпечити передбачуване розташування крапель рідини, певний гідрофобний полісилазановий шаблон наноситься на поверхню гідрофільного плавкого кварцевого скла в чистій кімнаті за допомогою процесу фотолітографії. Шаблон попередньо розробляється в AutoCAD 2023 а маска з фольги виробляється комерційно. Шаблон, використаний для цього дослідження (рис. 2.1), складається з двох пластинок із гідрофільними поверхнями з боків, 20832 гідрофільних лунок округлої форми (діаметр 125 мкм, відстань між центрами суміжних кіл 225 мкм), розташованих у вигляді прямокутного масиву у 93 рядки та 224 стовпці з гідрофобним простором між ними.

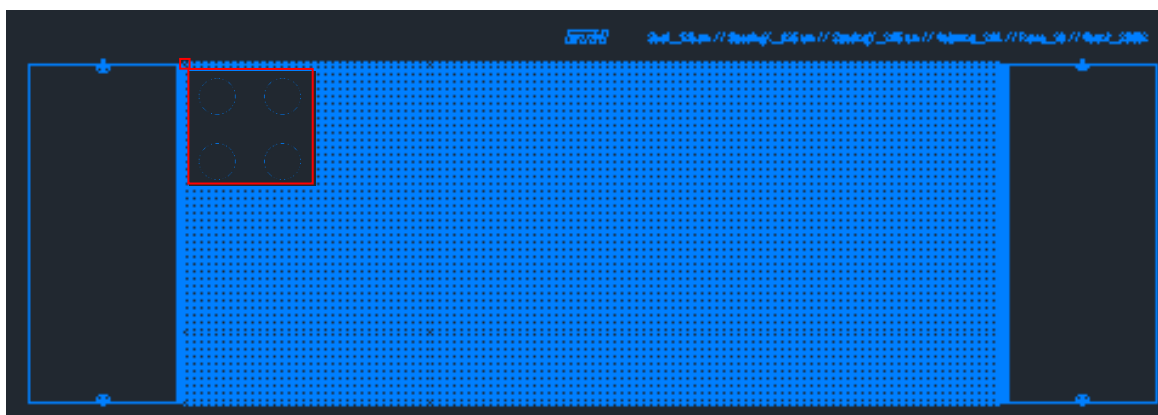


Рис. 2.1. Скріншот дизайну AutoCAD для виготовлення фотошаблону пластини мікромасиву. У червоному квадраті наближено повторювану частину масиву розміром 300x300 мкм.

Виробничий процес починається з очищення скляної пластини 380 мкм у кисневій плазмі. Шар органічного полісилазану (CAG 37, durXtreme) товщиною приблизно 800 нм наноситься центрифугуванням і випікається при 300 °С протягом 2 годин. На полісилазан наноситься шар негативного фоторезисту товщиною 3 мкм (ma-N 1400, microresist technology) центрифугуванням і випікається при 110 °С протягом 90 секунд. Отримана пластина піддається впливу ультрафіолетового світла через маску з фольги та проявляється у водно-лужному проявнику (ma-D 533/S, microresist technology) до видалення неекспонованого фоторезисту, який знаходиться в місцях, які повинні бути гідрофільними в кінці. Використовують неселективне травлення фтористоводневою кислотою протягом 3,5 хвилин для видалення полісилазану з ділянок, вільних від фоторезисту, після чого фоторезист, що залишився, розчиняють в ацетоні. Наприкінці прямокутна пластина 7x25 мм вирізається лазером. Перед кожним використанням пластину очищають 0,5% розчином миючого засобу Triton X-100, ізопропанолом та деіонізованою водою. Воду, що залишилася, негайно видаляють і осушують потоком стисненого азоту.

2.4.2. Капілярна система та подача рідини. Платформа в цілому побудована на базі інвертованого флуоресцентного мікроскопа Olympus IX73. Столик мікроскопа складається з двох окремих моторизованих ступенів (M-404.6PD, PI), які встановлені на каркасі з алюмінієвих стрижнів і відповідають за переміщення пластиноутримувача в площинах X і Y. Пластинотримач виготовляється з ПММА і має 4 магніти. Два з них разом з 3D-надрукованими магнітними тримачами із меншими магнітами фіксують пластинку, а решта стабілізують піддони для води, які використовуються для запобігання випаровуванню. Пластинотримач стабілізується на предметному столику за допомогою трьох затискачів, що притискають його

вниз, і одного затискача, що натискає в площині XY на гвинт, встановлений у тримачі. Пластина розташована у заглибленні об'ємом приблизно 10 мл, яке наполовину заповнюється фторованою олією (HFE 7500 3M Novac, Fluorochem) для захисту крапель від випаровування та інших взаємодій із зовнішнім середовищем.

Над пластиною розташована друкувальна головка з під'єднаними капілярами (внутрішній діаметр 50 мкм), які подають необхідні розчини. Протилежні кінці капілярів занурюють у заздалегідь приготовлені розчини в стерильних пробірках об'ємом 1,5 мл і підключають до контролерів потоку на основі тиску (Flow EZ, Fluigent), здатних забезпечувати тиск до 1000 мбар з точністю до 0,1 мбар. Встановлюючи профіль тиску, можна точно контролювати об'єм рідини, що проходить через кожен капіляр, і, отже, співвідношення їх змішування. Профіль тиску та рухи ступенів контролюються та синхронізуються спеціально написаною програмою Python.

Друкувальна головка з'єднана з моторизованим ступенем (M-403.2PD, PI), що рухається в площині Z. У процесі краплинного друку головка опускається на відстань 20-40 мкм від пластини, і контролери забезпечують ламінарний потік рідини. У той же час моторизований ступінь XY переміщує пластину масиву зі швидкістю 5 мм/с так, щоб потік рідини розділявся на рівні краплі вздовж рядку або стовпчику. Щоб врахувати різну висоту в різних положеннях пластини, попередньо виконується калібрування кривизни поверхні в щонайменш 9 положеннях. Калібрування виконується шляхом детекції дотику із силою 20 мН відповідно до показників сенсору тиску (Futek, LSB200).

Після завершення формування крапель на пластині до пластиноутримувача додаються наповнені водою піддони об'ємом приблизно 2 мл, і конструкція накривається полікарбонатною кришкою із

шаром ПДМС товщиною 1-3 мм. Конструкція доєднуються до мікроскопного холдеру за допомогою надрукованої 3D-прінтером рамки із різьбленням для шурупів на усіх кутах.

2.4.3. Дизайн друкуючої головки. З метою оптимізації пристрою, для кожного експерименту було підготовлено різні друкуючі головки. Кожна з них складається з основи 150 мкм завшир та доєднаної активної частини, що забезпечує подачу рідини у встановленій позиції. Перша головка була виготовлена методом 3D-друку на полімерному принтері (рис. 2.1). П'ять вхідних отворів для капілярів в ряд утворюють прямокутну камеру змішування, яка має один вихід, куди поміщається капіляр довжиною приблизно 3 мм.

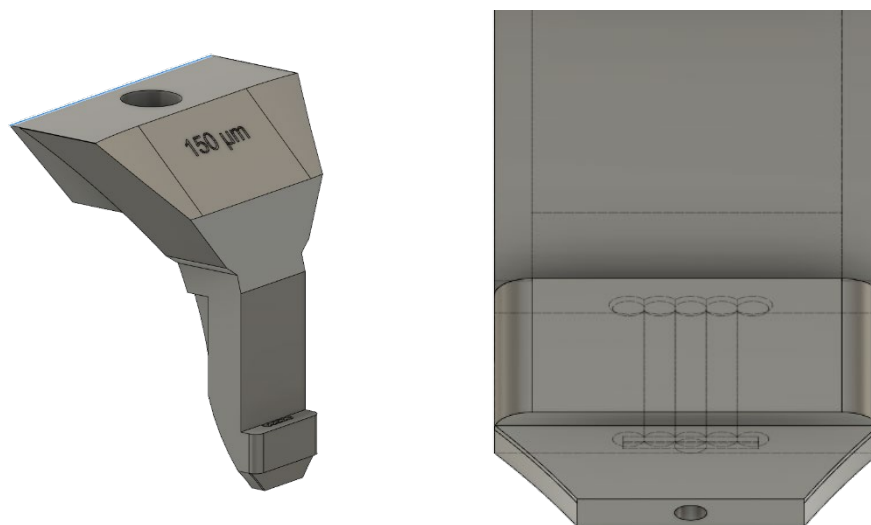


Рис. 2.2. Друкувальна головка у першому експерименті: вид збоку та знизу.

Друкувальна головка для другого експерименту (рис. 2.2) була виготовлена із зміненим розташуванням вхідних капілярів у формі квадрату. Рідина, поступає у хрестоподібну змішувальну камеру, з якої виходить по

капіляру довжиною приблизно 3 мм. Після доєднання капілярів, як і в попередньому випадку, будь-яке переміщення капілярів та отвори блокуються епоксидним клеєм.

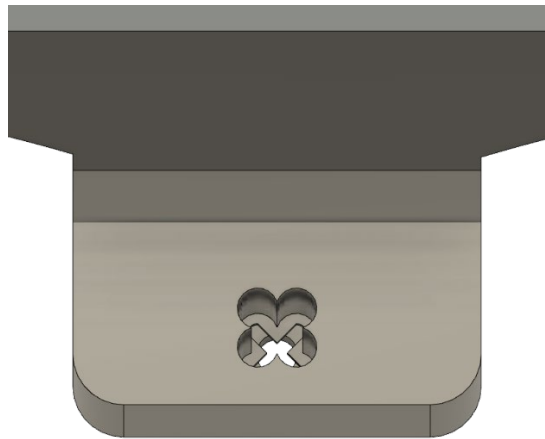


Рис. 2.3. Друкувальна головка у першому експерименті: вид на активну частину зверху.

Друкувальна головка для третього експерименту (рис. 2.3) була виготовлена з ПДМС шляхом м'якої літографії: процес, описаний вище для фотолітографії, закінчувався продукуванням шаблону, який заливався рідким ПДМС та випікався у печі при 90 °С кілька годин до затвердіння. Усі канали у головці з'єднані безпосередньо у єдиному дизайні, що виключає блокування капілярів у разі невдалого позиціонування та майже повністю виключає мертвий об'єм.

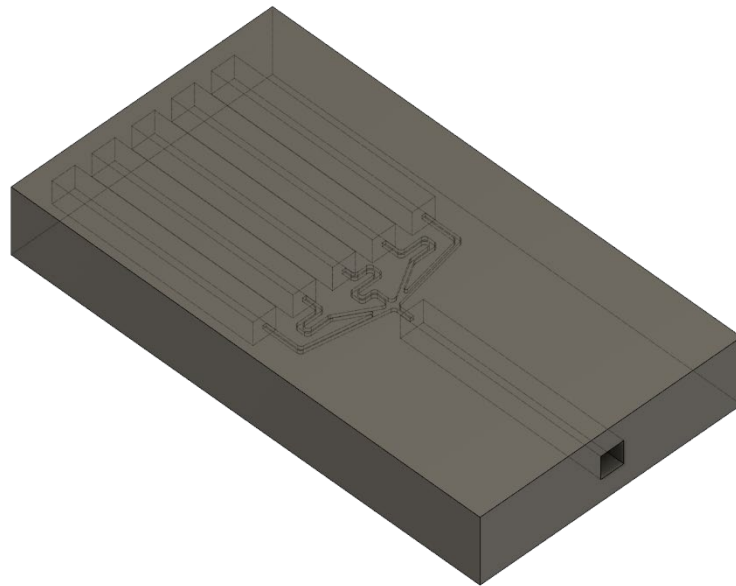


Рис. 2.4. 3D-візуалізація друкуючої головки ПДМС, використаної в останньому експерименті. П'ять вхідних каналів об'єднуються у один внутрішній вихідний канал, з якого формуються краплі.

2.5. Тест антибіотикової чутливості на мікрофлюїдній платформі

2.5.1. Відношення тиску до об'єму. Щоб встановити теоретичний зв'язок між прикладеним тиском і отриманим об'ємом краплі, ми використали рівняння Хагена-Пуазейля, яке описує ламінарний потік рідини через циліндричну трубу:

$$Q = \frac{\pi r^4 \Delta p}{8 \eta l},$$

де r – радіус трубки, 25 мкм, Δp – різниця тиску між обома кінцями трубки, сумарно 405 мбар, η – в'язкість рідини, 0,89 мПа·с, l – довжина трубки, 30 см.

Q також можна представити як добуток об'єму краплі на частоту утворення краплі:

$$Q = V * \frac{v}{d},$$

де V – об'єм краплі, v – швидкість руху капіляра відносно пластини, 5 мм/с, d – діаметр однієї лунки краплі, 125 мкм.

Комбінуючи формули, ми можемо обчислити об'єм як:

$$V = \frac{\pi dr^4 \Delta p}{8\eta lv} = 1.03 \text{ (nL)}$$

Розрахований об'єм межує з діапазоном піколітра, тож через випадкові відхилення розподіл розмірів крапель має включати піколітрові краплі об'ємом менше 1 нанолітра. У початковому стані системи було заплановано продукування крапель із метою досягнення об'єму 900 піколітрів, але через оптимізацію значень тиску для формування градієнта отриманий об'єм було збільшено.

2.5.2. Експериментальний дизайн. Ми провели два експерименти, демонструючи окремі градієнти кожного використаного антибіотика, і розробили перехресний градієнт обох антибіотиків у третьому експерименті. Щоб перевірити отримані співвідношення сполук, сульфородамін Б (СРБ) додавали до розчинів антибіотиків до кінцевої концентрації 1 мкг/мл, а декстран Cascade Blue додавали до розчину середовища в концентрації 10 мкг/мл для першого експерименту та 50 мкг/мл для інших. У всіх випадках у середовищі підтримувалося 100% забезпечення поживними речовинами, а додавані розчини піддавалися стерилізації шляхом фільтрації через фільтр 0,22 мкм.

У всіх експериментах до капілярів бактерій прикладався постійний тиск 45 мбар, а сумарний тиск усіх капілярів становив 405 мбар. Щоб сформувати індивідуальний градієнт у перших двох експериментах, початковий тиск, прикладений до капіляра антибіотика, починався зі 180 мбар і зменшувався на 2 мбар у кожному наступному рядку, що призвело до отримання 90 унікальних концентрацій. Компенсуючи зниження, тиск, прикладений до капіляра, що переносить середовище, було збільшено з 180 до 360 мбар у тих самих кроках.

У фінальному крос-градієнтному експерименті зміна концентрацій азитроміцину відповідала тій же моделі, що описана вище, тоді як концентрація ципрофлоксацину зменшувалася від 180 мбар на 4 мбар кожні 4 стовпці, утворюючи разом із азитроміцином матрицю 45 x 90 унікальних концентрацій. За цією схемою кожна комбінація має чотири повтори. Крапельний друк проводили у два раунди, спочатку змішуючи та подаючи азитроміцин із середовищем ряд за рядом, потім змішуючи та подаючи ципрофлоксацин із середовищем і суспензію *E. coli* колонка за колонкою.

Дотримуючись однакового протоколу для всіх експериментів, щоразу готували до 4 розчинів у пробірках об'ємом 1,5 мл:

1. МХБ з додаванням канаміцину та декстрану.
2. 0,081 мкг/мл розчин ципрофлоксацину з додаванням СРБ.
3. 50 мкг/мл розчин азитроміцину з додаванням СРБ.
4. Суспензія *E. coli*, розведена в МХБ до $ОГ_{600} 0,2$.

2.5.3. Обґрунтування вибору щільності посівного матеріалу.

Оскільки продукція GFP відбувається на основі плазмід, а сегрегація плазмід під час поділу клітини є випадковим процесом, кількість копій плазмід може значно відрізнятись між дочірніми клітинами, тому необхідно забезпечити репрезентативний зразок у кожному стані. Крім того, зменшення щільності інокулюму корелює з більшою лаг-фазою, яка нівелює потенційну перевагу

мікрофлюїдики для швидшого отримання результатів тесту. Припускаючи розподіл Пуассона кількості клітин між краплями, ми прагнемо обмежити відсоток крапель, що містять менше двох клітин, до менш ніж 0,1% випадків. При об'ємі краплі 1,03 нл найменша щільність інокулюму, що відповідає встановленим критеріям, буде приблизно $8,7 \times 10^6$ КУО/мл (0,011 OG_{600}). Таким чином, ми очікуємо, що цільовий OG_{600} 0,02 буде в межах необхідних значень.

2.6. Збір та аналіз даних

2.6.1. Реєстрація росту бактерій. Зростання в культуральних об'ємах 30 мл і 3 мл реєстрували, відбираючи аліквоти рідини щогодини, розводячи їх у МХБ і реєструючи OG_{600} за допомогою МХБ як контрольного зразка. Загальний об'єм аліквот, відібраних за весь час вимірювань, не перевищував 1,5 мл.

Зростання в мікропланшетах реєстрували за допомогою автоматичного пристрою для зчитування планшетів (Biotek Cytation 5, Agilent), керованого програмним забезпеченням GEN 3. Кожні 20 хвилин OG_{600} і значення GFP флуоресценції (джерело світла: ксеноновий спалах, збудження: 485/10 нм, випромінювання: 510/10 нм, посилення: 50) реєстрували протягом принаймні 12 годин.

Зростання в мікрофлюїдному пристрої було зареєстровано широкопольним флуоресцентним автоматизованим інвертованим мікроскопом Nikon Ti2E, оснащеним твердотільним джерелом білого світла (Sola II, Lumencor) і камерою DS-Qi2. Під контролем програмного забезпечення NIS-Elements Advanced Research покадрова зйомка виконувалася кожні 20 хвилин протягом 10 годин у білому світлі (інтенсивність: 1%, експозиція: 10 мс) та флуоресценції GFP (збудження:

466/40 нм, випромінювання: 525/50 нм, відсікання дихроїчного дзеркала від 502 нм; експозиція: 300 мс, інтенсивність: 40%).

Оскільки співвідношення змішування залишається постійним протягом усього зображення, перед початком сповільненої зйомки було проведено окремий сеанс візуалізації з такими оптичними конфігураціями: DAPI (збудження: 377/50 нм, випромінювання: 447/60 нм, відсікання дихроїчного дзеркала на 415 нм; експозиція: 100 мс (1-й експеримент) і 200 мс (подальші експерименти), інтенсивність: 40%), флуоресценція GFP (збудження: 466/40 нм, випромінювання: 525/50 нм, відсікання дихроїчного дзеркала від 502 нм; експозиція: 500 мс (1-й експеримент) і 300 мс (подальші експерименти), інтенсивність: 40%), mCherry (збудження: 562/40 нм, випромінювання: 641/80 нм, відсікання дихроїчного дзеркала від 601 нм; експозиція: 300 мс, інтенсивність: 40%), біле світло (інтенсивність: 1%, експозиція: 10 мс).

2.6.2. Аналіз даних. Кожен експеримент проводили принаймні в трьох повторях і для всіх значень розраховували стандартне відхилення. Аналіз зображення було виконано за допомогою спеціально створеного скрипту MATLAB шляхом виокремлення середніх значень інтенсивності флуоресценції радіальних областей діаметром 180 мкм у визначених положеннях, що відповідають розташуванню крапельних лунок. Діаметр, більший за саму лунку, було обрано задля урахування нерівномірного росту бактерій усередині краплі та можливих відхилень від фактичного положення. Подальший аналіз необроблених значень було виконано за допомогою Excel і скриптів Python із використанням бібліотек numpy, panda та matplotlib.

Для цілей цього дослідження ми визначили МІК як першу концентрацію, що показує менше ніж 10% збільшення флуоресценції порівняно з контрольними умовами протягом визначеного періоду часу (10

годин). Класифікацію спостережуваного ефекту проводили за допомогою індексу часткової інгібуючої концентрації (FICI). Для його розрахунку використовується формула [32]:

$$FICI = \frac{MIC_{(A \text{ в присутності } B)}}{MIC_{(A \text{ наодинці})}} + \frac{MIC_{(B \text{ в присутності } A)}}{MIC_{(B \text{ наодинці})}}$$

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив обсягу культури

Щоб оцінити вплив зменшення об'єму, було протестовано ріст бактерій у 5 різних умовах об'єму: 30 мл у 250 мл колбах Ерленмейера з перегородками, 3 мл у 10 мл пробірках з круглим дном, 0,15 мл у 96-лунковому планшеті, 0,06 мл у 384-лунковому планшеті і в 1 нл краплях мікромасива. Усі експерименти проводили в трьох повторах, за винятком мікрофлюїдного експерименту, де $n=50$ і уособлює 50 контрольних крапель, які, як було визначено за даними флуоресценції, були інокульовані клітинами та демонстрували щонайменше 50% зростання відносно початкового значення.

Тривалість, частота та точність культивування більших об'ємів були обмежені інвазивним характером вимірювань за допомогою ручного аліквотування. Щоб залишатися в межах виявлення спектрофотометра, початкові аліквоти вимагали видалення значного об'єму рідини з культурального посуду. У той час як в експериментах із колбою-шейкером загальний об'єм, видалений після початкової точки часу, не перевищував 5% початкових значень, цей відсоток досягав 40% у експериментах у пробірках з круглим дном.

Криві росту, отримані у найвищому та найнижчому об'ємі культури, показали істотно різну динаміку росту порівняно з іншими умовами (рис. 3.1). У нанолітрових краплях бактерії виявляють більш тривалу лаг-фазу перед початком експоненціальної фази росту. Мікрооб'ємам притаманні більш високі співвідношення площі та об'єму, які природно забезпечують більший контакт. Крім того, форма лунок має плоску основу, і під час культивування не відбувається струшування, що означає, що клітини мають

більший шанс контактувати безпосередньо зі склом. Раніше було повідомлено схожий ефект, що статичні мікрофлюїдні пристрої можуть частково впливати на ріст бактерій, збільшуючи період адаптації. Так, було припущено, що потрібна акліматизація саме до скляної поверхні, на якій розташована крапля, на додаток до адаптації до нового культурального середовища [51].

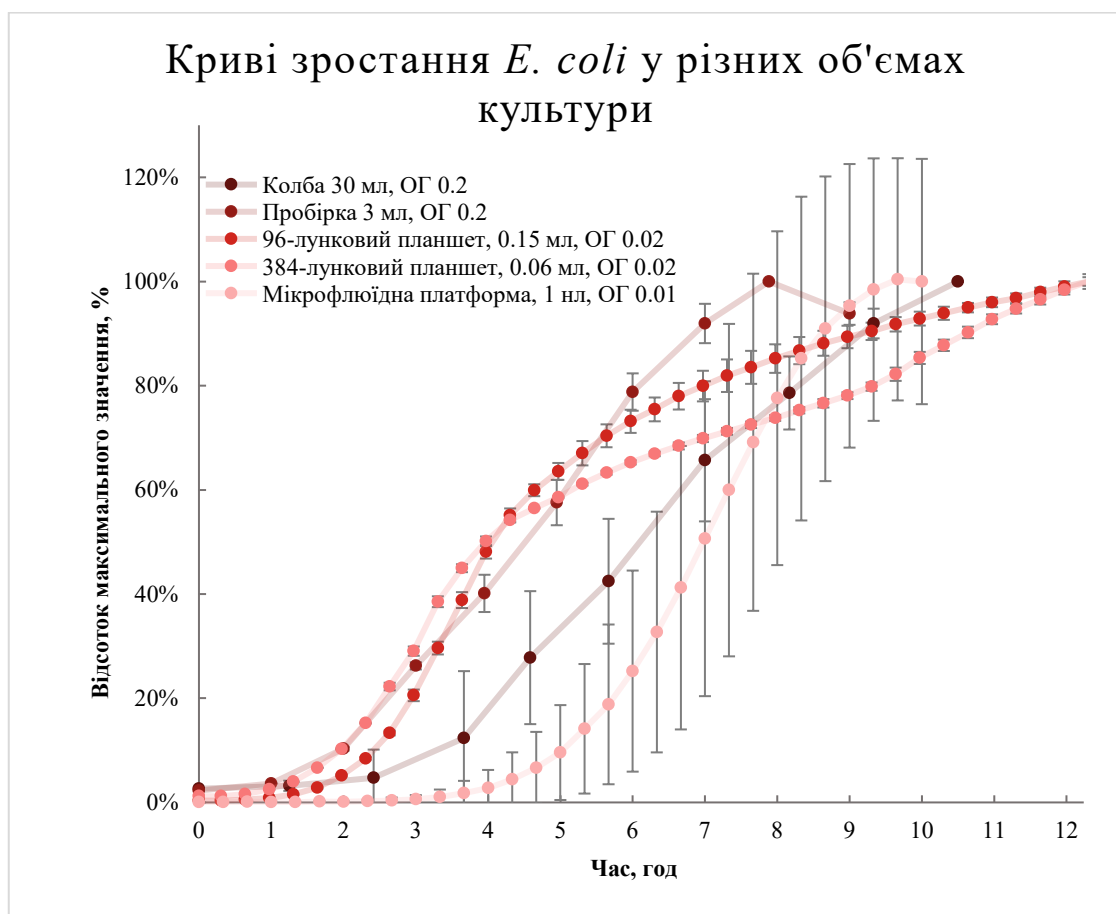


Рис. 3.1. Криві росту *E. coli* в різних об'ємах культури, перемасштабовані за максимальним значенням та скориговані шляхом віднімання даних негативного контролю.

У випадку культивування в колбі експоненціальна фаза росту нагадувала лінійний тренд. Культуральні посудини в обох експериментах були виготовлені зі скла, яке за умови тривалого контакту з бактеріями

потребувало б адаптації не лише до нової рідини, але й до нового матеріалу. Для експерименту з колбою контакт міг регулярно відбуватися під час струшування, коли на стінках колби та в піні утворювалися тонкі шари рідини. Водночас зі збільшенням об'ємів також починають виникати проблеми з аерацією та рівномірним розподілом поживних речовин і бактерій у посудині.

Затримка лаг-фази в мікрофлюїдних об'ємах також може сприйматися як екстремальний прояв ефекту інокулюму. За цією закономірністю, зменшення початкової кількості клітин збільшує час адаптації бактерій у новому середовищі [52]. Абсолютна зміна у розмірі 1 або 2 клітин може призвести до відносної зміни до 30%, як буде показано пізніше шляхом підрахунку кількості клітин у лунках. Відхилення об'єму краплі також сприяють цьому ефекту. Отже, можна очікувати значної різниці у швидкості досягнення наступних фаз росту. Це також пояснює найвищі стандартні відхилення серед усіх експериментів, незважаючи на значно більший розмір вибірки. Тим не менш, цей ефект відповідає умовам, що спостерігаються у організмі при *E. coli* інфекціях сечовивідних шляхів: концентрації порядку 10^5 КУО/мл вважаються високими та вказуючими на наявну інфекцію [53].

Одним із додаткових можливих факторів, що сприяють різкій різниці у вигляді кривих росту, може бути використання іншого показника для росту клітин. Значення всіх експериментів базувалися на вимірюваннях оптичної щільності, тоді як у мікрофлюїдній системі вони базувалися на середній інтенсивності флуоресценції. Щоб перевірити це припущення, ми порівняли записи росту, зроблені обома методами в 384-лунковому планшеті.

3.2. Валідація вимірювань флуоресценції для вимірювання росту

Оскільки вибраний штам конститутивно продукує GFP всередині клітин, очікується, що інтенсивність флуоресценції буде пропорційною розміру колонії. Одночасно реєструючи значення абсорбції та інтенсивності флуоресценції та використовуючи той самий протокол обробки даних для побудови кривих росту, можна було безпосередньо порівняти два методи.

Чітко видно різницю між кривими зростання одних і тих же лунок, записаними різними методами (рис. 3.2). Експоненціальна фаза, зафіксована флуоресцентним методом, менш виражена і починається пізніше, що пояснює ефект, який ми спостерігали в мікрофлюїдній системі. Після 9 годин вимірювань нормалізовані темпи росту між методами вирівнюються до зівставних. Таким чином, ми вважаємо, що поєднання принаймні трьох різних факторів сприяє уповільненому входу бактерій у фазу експоненціального росту: низький об'єм інокулюму, високе співвідношення поверхні до об'єму системи та інший метод реєстрації зростання.

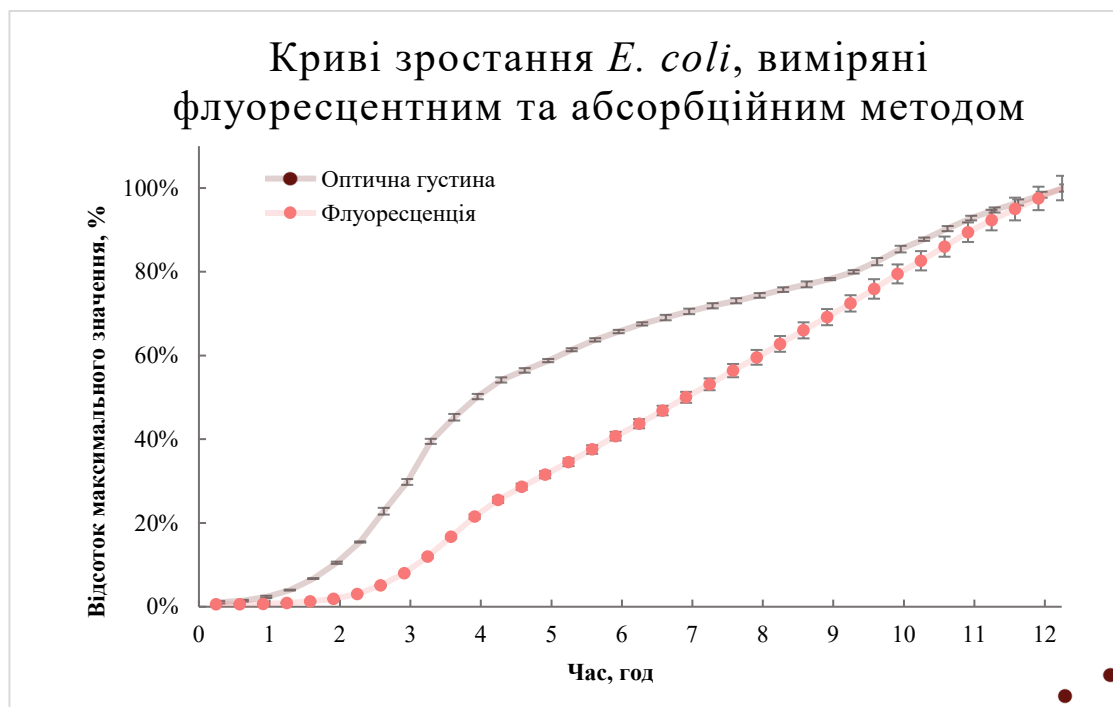


Рис. 3.2. Порівняння світлопоглинання та інтенсивності флуоресценції GFP як показників росту.

3.3. Ефект інокулюму в еталонному тесті антибіотикової чутливості

Щоб встановити вплив різної початкової щільності клітин на чутливість до антибіотиків, ми провели серію з чотирьох експериментів тестування антибіотикової чутливості для обох антибіотиків. Очікується, що більша щільність клітин потребує вищих концентрацій антибіотиків для повного пригнічення росту [54]. За рекомендованої щільності інокулюму $ОГ_{600} 0,000625$ ми можемо встановити МІК ципрофлоксацину як $0,016$ мкг/мл (рис. 3.4, значення жовтим). Ці дані на одне подвійне розведення вищі за ті, що повідомляються в літературі [25]–[27]. Тим не менш, варіація у межах одного серійного розведення зазвичай вважається прийнятною [28]. Оскільки перевіряються лише дискретні подвійно розведені концентрації, «справжня» МІК може знаходитися в широкому діапазоні між сусідніми концентраціями. Таким чином, якщо реальна МІК розташована близько до досліджуваної концентрації, отримане значення буде більш чутливим до мінливості зовнішніх факторів. Ця ідея додатково підтверджується тим фактом, що жодних змін у показниках МІК не спостерігалось в результаті збільшення щільності інокулюму до $ОГ_{600} 0,02$ (рис. 3.3, значення помаранчевим). Зміна показника МІК спостерігається лише при $ОГ_{600} 0,2$ (рис. 3.3, значення синім) шляхом збільшення його ще на одне розведення. Крім того, при такій щільності дещо підвищені показники оптичної щільності можна побачити за будь-якої тестованої концентрації, оскільки значення світлопоглинання підвищується одразу після додання бактерій до лунки.

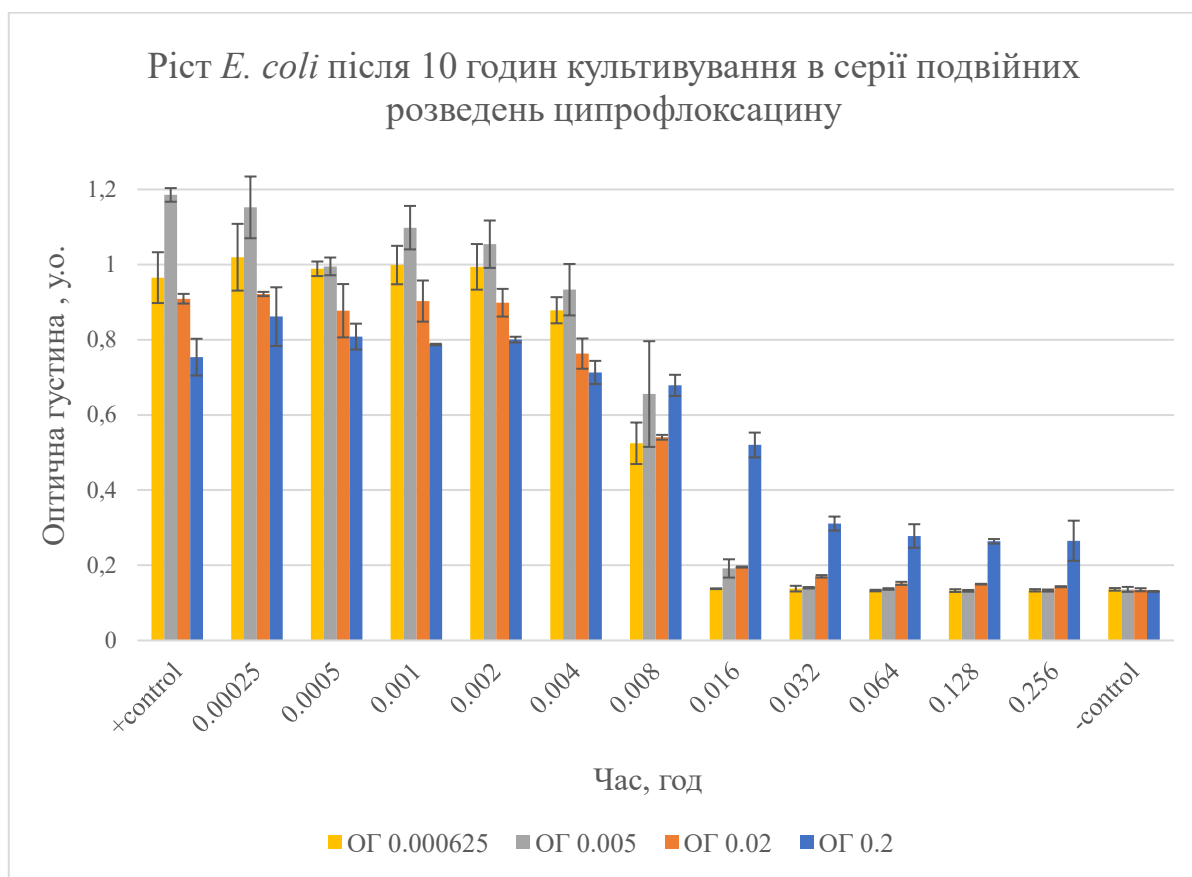


Рис. 3.3. Встановлення МІК ципрофлоксацину в еталонному експерименті при змінній щільності посівного матеріалу після культивування протягом 10 годин.

Для азитроміцину (рис. 3.4) МІК за стандартних умов (значення жовтим) встановлено на рівні 8 мкг/мл і відповідає МІК, зазначеним у літературі [28]–[30]. У той же час, збільшення щільності інокулюму у 8 разів вище рекомендованої, до ОГ₆₀₀ 0,005 (значення сірим), підвищує значення МІК на одне подвійне розведення до 16 мкг/мл. Подальше збільшення щільності інокулюму не впливає на показники (значення помаранчевим, синім).

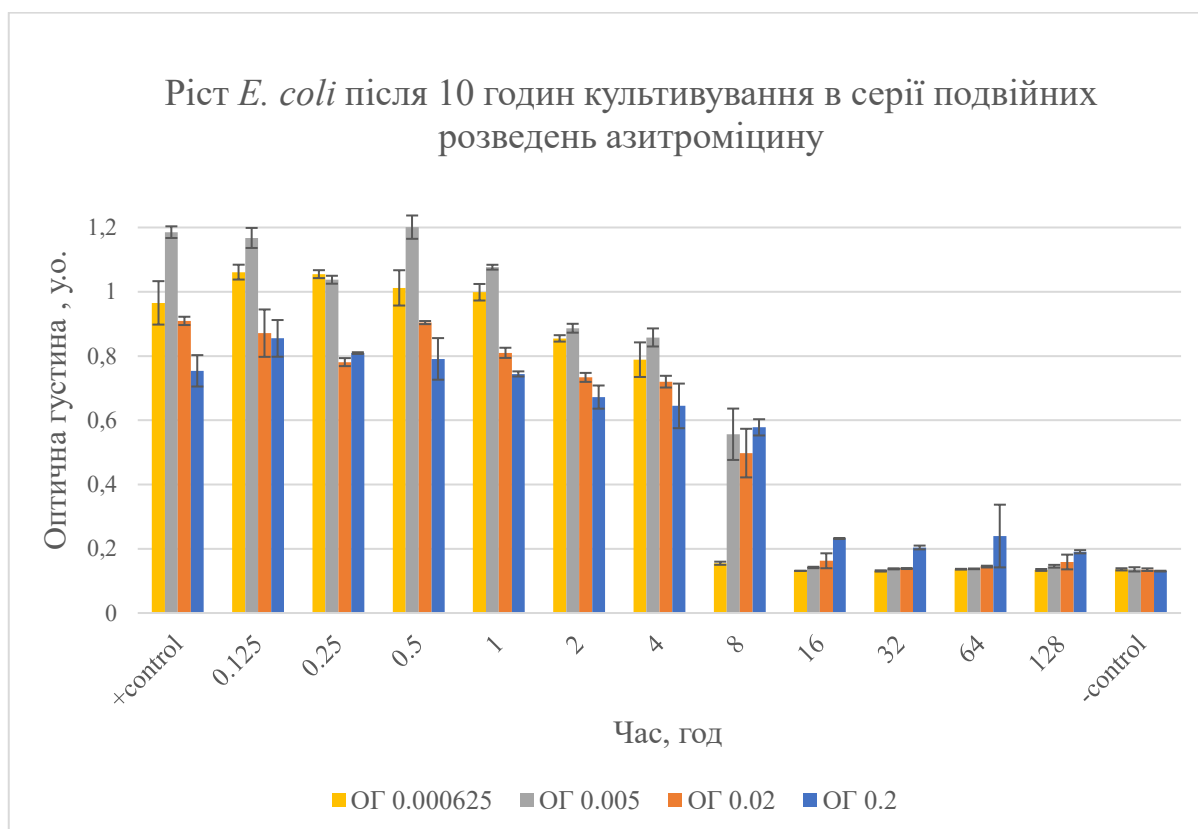


Рис. 3.4. Встановлення МІК для азитроміцину в еталонному експерименті при зміні щільності посівного матеріалу після культивування протягом 10 годин.

Для обох антибіотиків початкові концентрації OG_{600} 0,02 і OG_{600} 0,005 забезпечують однакове значення МІК. Оскільки очікувана щільність інокулюму для мікрофлюїдних експериментів знаходиться в діапазоні цих значень, ми очікуємо спостерігати МІК від 8 до 16 мкг/мл для азитроміцину та від 0,008 до 0,016 мкг/мл для ципрофлоксацину.

3.4. Мікрофлюїдні експерименти тестування чутливості до антибіотиків

3.4.1. Характеристика однорідності та градієнту. Характеристику розподілу антибіотиків проводили шляхом спостереження за зміною

інтенсивності флуоресценції барвників, доданих у розчини з антибіотиком і середовищем. Кожен експеримент характеризувався лінійним графіком відповідних інтенсивностей флуоресценції в кожному рядку, де проводився тест антибіотикових концентрацій (стовпець для експерименту з перехресним градієнтом) і тепловими картами, що демонструють флуоресценцію окремих лунок у цих рядках. Таким чином ми змогли перевірити наявність градієнта та оцінити функціональність пристрою для планування подальшої оптимізації. Завдяки нормалізації отриманих значень у всіх випадках була забезпечена порівнянність між експериментами. Ми очікуємо зменшення флуоресценції СРБ (відповідає розчину антибіотика) та збільшення флуоресценції декстрану (міститься в розчині середовища) протягом пластини.

Лінійний графік першого експерименту (рис. 3.5, а) представляє надзвичайно чітко виражену тенденцію градієнта антибіотиків. Згідно з показниками стандартного відхилення, лунки всередині одного ряду демонструють високі рівні однорідності, за винятком початкової області з підвищеною варіабельністю розчину антибіотика. На теплових картах розподілу барвника (рис. 3.5, b, c) ми бачимо наявність порожніх лунок у цій області разом з надмірною кількістю антибіотика раніше. Цей шаблон відповідає крапельному друку на збільшеній відстані від пластини, де краплі не відчують впливу достатньої сили, щоб осісти в кожній гідрофільній лунці.

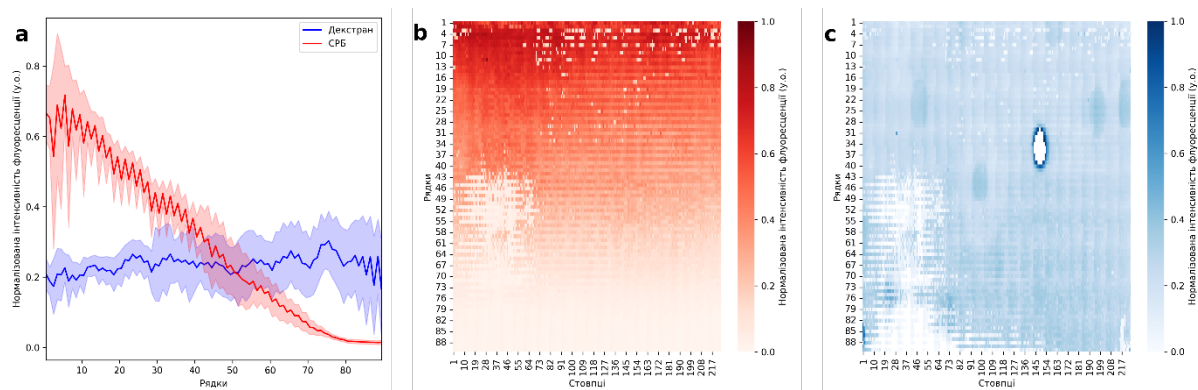


Рис. 3.5. Візуалізація градієнта в першому експерименті: а) зміна за рядками, б) окрема флуоресценція СРБ кожної лунки, що демонструє градієнт антибіотика, с) окрема флуоресценція декстрану кожної лунки, що демонструє градієнт вмісту середовища. У тепловій карті декстрану значення за межами нормалізованого діапазону 5-70% були видалені як викиди, щоб врахувати артефакт зображення, присутній у середині, та значну кількість порожніх лунок. $N=20160$, $n=224$

Після крапельного друку зліва направо наступний ряд друкувався в іншому напрямку, і це пояснює зигзагоподібний патерн на лінійному графіку, що є результатом дещо зниженої флуоресценції кожного другого ряду. Теплові карти виявляють додаткові проблеми з функціоналом краплинного друку в середній і нижній лівій областях, де присутня значна кількість порожніх колодязів. Відбулося явне порушення процесу друку, яке, ймовірно, сталося через поступово зменшувану відстань до форми. Це свідчить про нерівне положення пластини, яке не було скориговано під час калібрування. Підвищена чутливість до калібрування може спостерігатися у випадку зниженої гідрофільності пластини, що вимагає значно більшої точності.

Значних змін у флуоресценції декстрану не спостерігається. Це можна пояснити низькою концентрацією загального розчину та тим, що градієнт

починається з вже приблизно 44% вмісту розчину середовища всередині та тільки підвищується далі.

У другому експерименті (рис. 3.6) ми також змогли спостерігати зменшення градієнта, але зі швидкістю, відмінною від очікуваної. Нову змішувальну камеру у друкувальній головці було використано з метою оптимізації осадження рідини, однак візуалізація показує, що вона може перешкоджати подачі рідини та значно зменшувати однорідність. Крім того, підвищена концентрація декстрану не призвела до кращої чутливості.

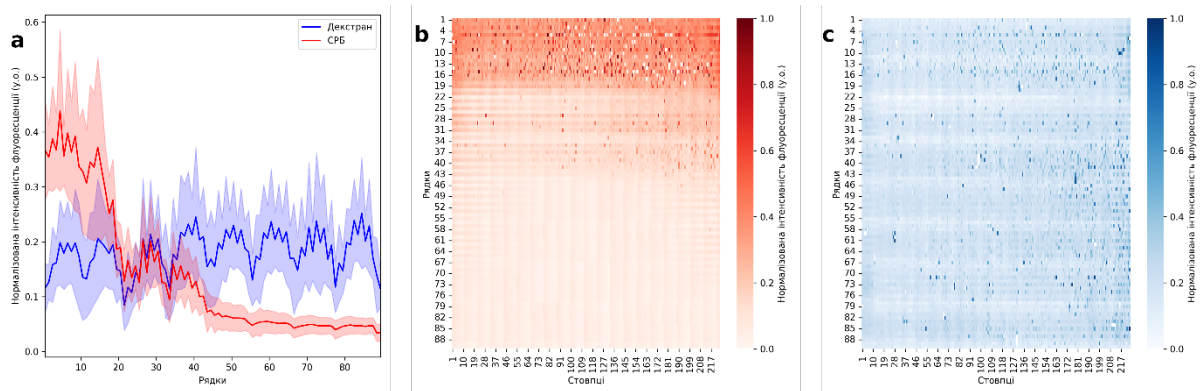
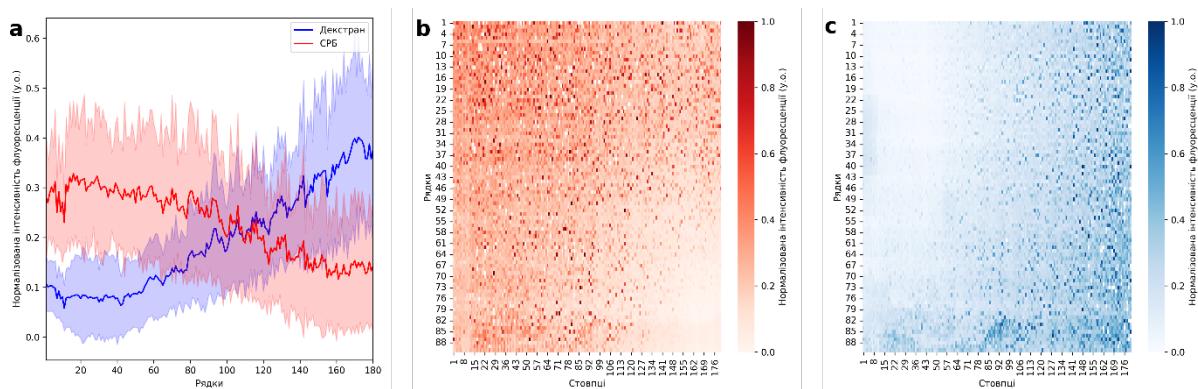


Рис. 3.6. Візуалізація градієнта: а) зміна за рядками, б) окрема флуоресценція SRB кожної лунки, що демонструє градієнт антибіотика, с) окрема флуоресценція декстрану кожної лунки, що демонструє градієнт вмісту середовища. Значення в нормалізованому діапазоні 0-60% показано для флуоресценції SRB і 0,1%-30% для декстрану. $N=20160$, $n=224$

У третьому експерименті (рис. 3.7) використовувалася друкуюча головка PDMS без насаджувального капіляра, щоб усунути будь-які перешкоди для подачі рідини, які могли виникнути внаслідок неточного 3D-друку та композиції з кількох частин. Змішувальну камеру також було видалено для усунення мертвого об'єму. Незважаючи на значну присутність викидів, чіткий очікуваний градієнт можна побачити за діагоналлю, що дозволяє нам покладатися на очікуваний розподіл концентрації. Наявність

градієнту у двох напрямках пояснює великі стандартні відхилення у лінійному графіку, водночас із градієнтом, що добре спостерігається. Можливість спостерігати градієнт декстрану може пояснюватись тим, що у цьому експерименті зміна концентрацій варіювалася починаючи з 0%, на відміну від 44% в інших експериментах.



Малюнок 3.7. Візуалізація градієнта: а) зміна за рядками, б) окрема флуоресценція SRB кожної лунки, що демонструє градієнт антибіотика, с) окрема флуоресценція декстрану кожної лунки, що демонструє градієнт вмісту середовища. Значення в нормалізованому діапазоні 0-45% показано для всіх зображень.

Як у другому, так і в третьому експерименті не було виявлено підвищеної чутливості до відстані від пластини після використання нової пластини. Виходячи з описаних результатів, стає зрозуміло, що для ефективного використання платформи у високопродуктивних напрямках потрібна значна оптимізація. Цього можна досягти шляхом подальшої оптимізації конструкції друкуючої головки, забезпечення рівномірної гідрофільності пластин і підтвердження співвідношень сполук окремими градієнтами або незалежним методом.

3.4.2. Клітинне навантаження. Як пояснюється в розділі методів, через плазмідно-опосередковане виробництво GFP ми мали на меті

отримати початкову щільність інокулюму $ОГ_{600}$ 0,02 ($1,6 \times 10^7$ КУО/мл), що відповідає середній кількості приблизно 9 клітин в краплі об'ємом 1 нл. Для перевірки нашого розподілу ми провели підрахунок клітин на зображеннях, зроблених безпосередньо перед початком покадрової зйомки в 3-му експерименті, і організували отримані дані у формі теплової карти (рис. 3.8, а).

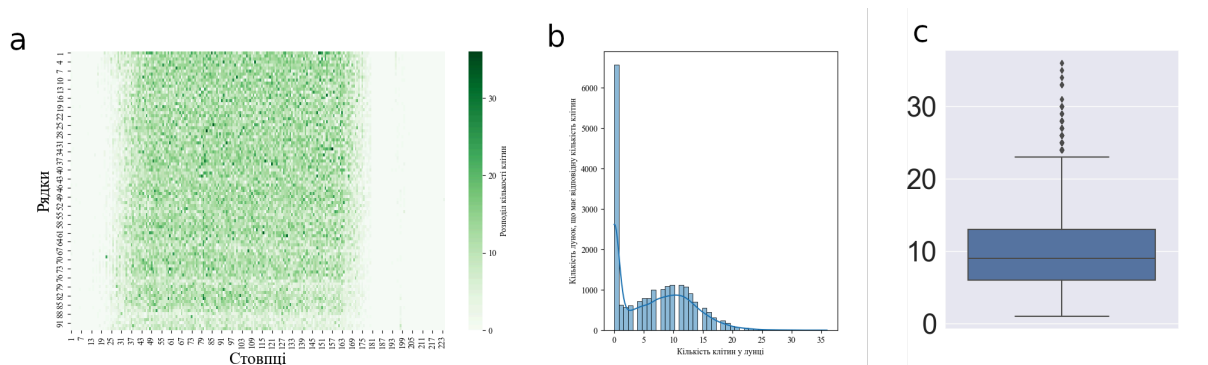


Рис. 3.8. Візуалізація розподілу клітин: а) теплова карта кількості клітин в окремих краплях, б) гістограма розподілу всіх крапель, в) центральні тенденції розподілу в краплях з принаймні однією клітиною.

Ми спостерігали значну варіацію в кількості клітин, яка коливалась від 0 до 36 клітин в одній краплі. У лівій частині пластини можна побачити значну область крапель без клітин. Оскільки осадження бактерій проводилося у формі поколонкового друку, це відповідає значній затримці постачання клітинної рідини. Передбачається, що це відбувається через взаємодію потоків рідин в точці перетину, де необхідно початкове накопичення рідини, що надходить із каналу низького тиску. Оскільки описана область відповідає найвищій концентрації антибіотика без очікуваного зростання, впливу на аналіз отриманих результатів не було.

Розподіл клітин, що ми можемо спостерігати (рис. 3.8, б), є бімодальним, але виключення порожніх крапель з аналізу дозволило би отримати унімодальний розподіл у формі розподілу Пуассона. Також ми

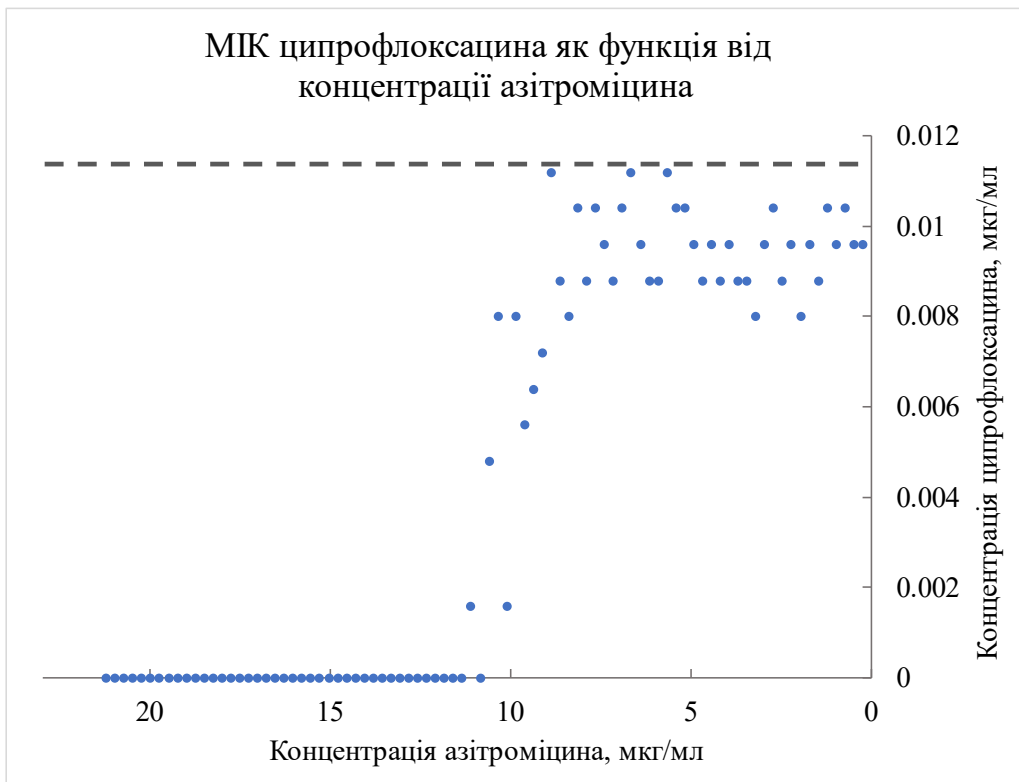
можемо перевірити, що після виключення пустих крапель початкова щільність інокулюму відповідає бажаній концентрації, хоча й є на 45% меншою очікуваної: середня кількість клітин у лунці складає 9.49 ± 4.94 (рис. 3.8, с), що відповідає $OG_{600} 0,011$.

3.4.3. Визначення МІК. МІК визначали шляхом порівняння середніх значень інтенсивності флуоресценції на початку сеансу мікроскопії та після 10 годин культивування. Середні значення лунки були взяті для всіх повторів комбінації. Якщо різниця не перевищувала 10%, ми класифікували цей стан як такий, що не має росту, і виконували таке ж порівняння для наступного. Як тільки спостерігалось зазначене зростання, подальші обчислення припинялися і записувався номер рядка. Визначалась очікувана частка тиску антибіотика в цьому рядку та помножувалась на концентрацію основного розчину антибіотика. Недоліком такого підходу є ігнорування відхилень, які виникають у процесі крапельного друку. Щоб встановити фактичні концентрації, калібрування за допомогою флуоресценції чистого розчину антибіотика може бути виконано в подальших експериментах.

Перший експеримент містить градієнт ципрофлоксацину. Діапазон досліджуваних концентрацій становив 0,0004–0,036 мкг/мл і таким чином охоплював 7 подвійних розведень, протестованих в еталонній процедурі. МІК визначено як 0,0116 мкг/мл (відповідає 62-му рядку). Це значення збігається зі значенням МІК 0,016 мкг/мл, отриманим у контрольному експерименті, оскільки воно вказує на реальну концентрацію інгібування між 0,008 і 0,016 мкг/мл.

Другий експеримент демонструє градієнт азитроміцину. Діапазон перевірених концентрацій становив 0,247–22,2 мкг/мл і також охоплював 7 подвійних розведень контрольного експерименту. На чіпі було визначено МІК 12,186 мкг/мл, що відповідає 42-му рядку. Результат збігається з очікуваним діапазоном еталонного експерименту від 8 до 16 мкг/мл.

У третьому експерименті перехресний градієнт був сформований з матрицею 90x45 комбінацій антибіотиків, що призвело до формування 4 повторів для кожної комбінації концентрацій. Оскільки ми тестували більше концентрацій азитроміцину, використовуючи менші кроки, ми використовували їх як основу, відносно якої встановлювали МІК ципрофлоксацину. Перебираючи рядок через кожні 4 лунки, які належать до однієї комбінації, було встановлено відсутність або наявність росту в цьому стані. Як тільки було виявлено зростання стану, концентрації, що містяться в попередній комбінації, були записані як МІК. Визначаючи таким чином значення МІК ципрофлоксацину для кожної з досліджуваних концентрацій азитроміцину, ми отримали 44 позитивних значення (рис. 3.9, нульові значення відповідають відсутності росту у комбінації). Пунктирна лінія відповідає визначеній МІК ципрофлоксацину в першому експерименті.



3.5. Оцінка взаємодії антибіотиків за FICI

На основі МІК, встановлених у попередньому розділі, ми визначаємо FICI для всіх 44 комбінацій. Після усереднення отримуємо результуюче значення індексу $1,234 \pm 0,23$. Значення FICI більше 1 і менше 2 вказує на індиферентний ефект, який можна приблизно оцінити як ефект, виявлений найбільш активною сполукою [55]. У разі різної активності сполук результуюча активність може бути поєднанням як індиферентного, так і адитивного ефектів. Крім того, повний діапазон значень FICI знаходиться в межах 0,847-1,694, і таким чином нижній діапазон демонструє явний адитивний ефект [55].

Щоб встановити умови, за яких спостерігаються ці значення, ми порівняли значення FICI з концентрацією азитроміцину, при якій вони були зареєстровані (рис. 3.10). Нижча роздільна здатність варіацій концентрації ципрофлоксацину та множинні записи індексу FICI для кожного з них не дозволяли зробити висновок про вплив варіювання концентрації ципрофлоксацину. Дослідження кореляції FICI з концентрацією азитроміцину демонструє чіткий дозозалежний ефект. Збільшення останнього корелює з прогресуючою індиферентною взаємодією антибіотиків до відсічення при концентраціях, близьких до МІК. Найсильнішу взаємодію між досліджуваними антибіотиками можна спостерігати при нижчих концентраціях азитроміцину нижче 3 мкг/мл. Спостережувана тенденція викликає занепокоєння щодо застосування високих концентрацій азитроміцину в комбінації з ципрофлоксацином. Потрібне подальше дослідження для концентрацій, значно вищих за МІК.

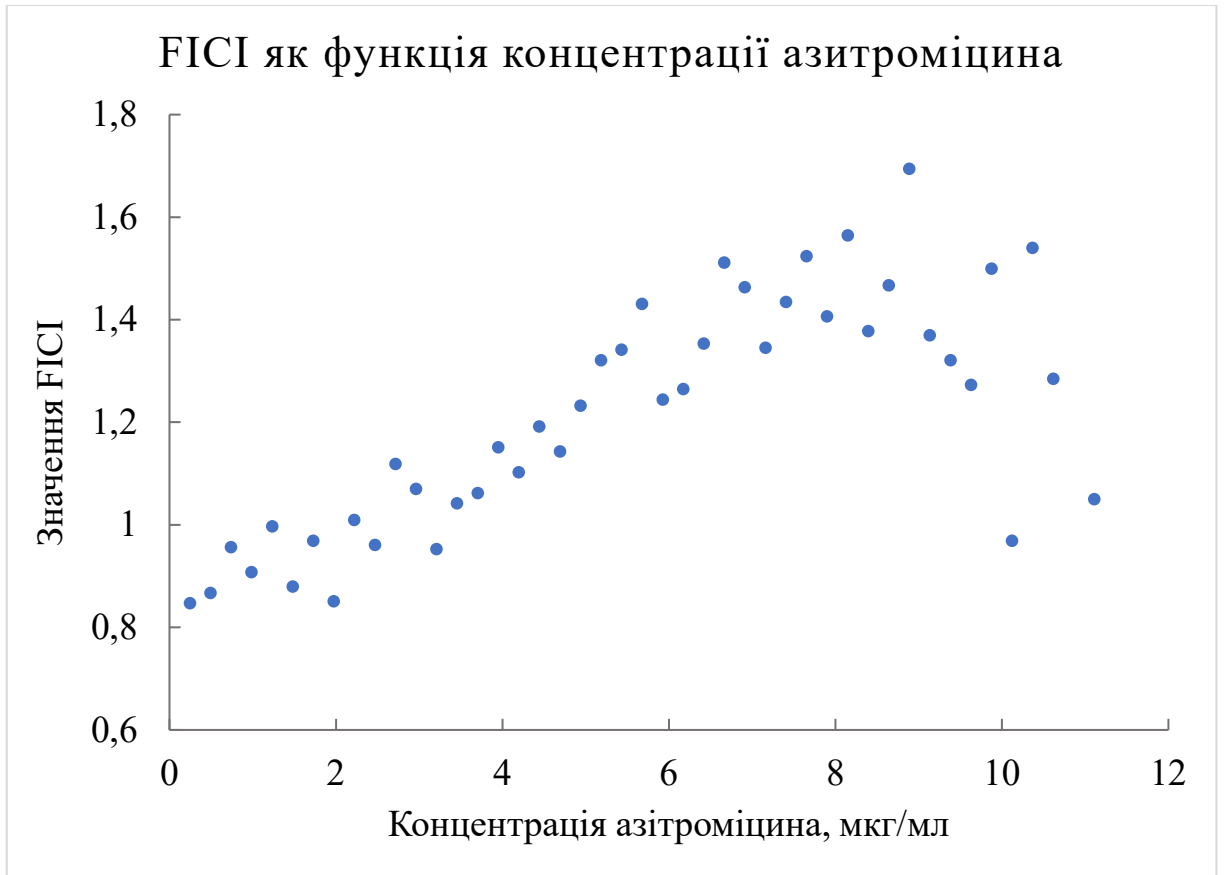


Рис. 3.10. Розподіл індексу FICI в діапазоні концентрацій азитроміцину, де були зареєстровані МІК.

ВИСНОВКИ

1. Розроблена мікрофлюїдна платформа дозволила точно визначити та охарактеризувати ріст бактерій за різних концентрацій антибіотиків і їх комбінацій.

2. Була показана можливість надійного та гомогенного формування градієнту концентрацій використаних сполук.

3. Була охарактеризована взаємодія ципрофлоксацину та азитроміцину є переважно індиферентною. Встановлено, що зростання ролі адитивного ефекту корелює зі зниженням концентрації азитроміцину.

4. Подальша оптимізація необхідна для забезпечення передбачуваності результатів і застосовності для високоточних і високопродуктивних напрямів: досліджень концентрацій, близьких до МІК, тестувань ліків та нових сполук тощо.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] K. S. Ikuta *et al.*, ‘Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019’, *Lancet*, vol. 400, no. 10369, pp. 2221–2248, Dec. 2022, doi: 10.1016/S0140-6736(22)02185-7.
- [2] K. C. Nicolaou and S. Rigol, ‘A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis’, *The Journal of Antibiotics 2018 71:2*, vol. 71, no. 2, pp. 153–184, Jul. 2017, doi: 10.1038/ja.2017.62.
- [3] G. Kapoor, S. Saigal, and A. Elongavan, ‘Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians’, *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, vol. 33, no. 3, pp. 300–305, Jul. 2017, doi: 10.4103/JOACP.JOACP_349_15.
- [4] M. A. Croxen, R. J. Law, R. Scholz, K. M. Keeney, M. Wlodarska, and B. B. Finlay, ‘Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*’, *Clin Microbiol Rev*, vol. 26, no. 4, pp. 822–880, Oct. 2013, doi: 10.1128/CMR.00022-13/ASSET/7F6F9E90-4473-4824-8DBD-F7D6314D6C42/ASSETS/GRAPHIC/ZCM9990924420008.JPEG.
- [5] P. S. Ocampo *et al.*, ‘Antagonism between bacteriostatic and bactericidal antibiotics is prevalent’, *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 58, no. 8, pp. 4573–4582, 2014, doi: 10.1128/AAC.02463-14.
- [6] B. Tepekule, H. Uecker, I. Derungs, A. Frenoy, and S. Bonhoeffer, ‘Modeling antibiotic treatment in hospitals: A systematic approach shows benefits of combination therapy over cycling, mixing, and mono-drug therapies’, *PLoS Comput Biol*, vol. 13, no. 9, p. e1005745, Sep. 2017, doi: 10.1371/JOURNAL.PCBI.1005745.
- [7] M. Azizi, M. Zaferani, B. Dogan, S. Zhang, K. W. Simpson, and A. Abbaspourrad, ‘Nanoliter-Sized Microchamber/Microarray Microfluidic Platform for Antibiotic Susceptibility Testing’, *Anal Chem*, vol. 90, no. 24,

- pp. 14137–14144, Dec. 2018, doi: 10.1021/ACS.ANALCHEM.8B03817/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2018-03817W_0005.JPEG.
- [8] S. Lindström and H. Andersson-Svahn, ‘Miniaturization of biological assays — Overview on microwell devices for single-cell analyses’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1810, no. 3, pp. 308–316, Mar. 2011, doi: 10.1016/J.BBAGEN.2010.04.009.
- [9] J. H. Jorgensen and M. J. Ferraro, ‘Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices’, *Clin Infect Dis*, vol. 49, no. 11, pp. 1749–1755, Dec. 2009, doi: 10.1086/647952.
- [10] C. J. Murray *et al.*, ‘Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis’, *The Lancet*, vol. 399, no. 10325, pp. 629–655, Feb. 2022, doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- [11] A. L. Flores-Mireles, J. N. Walker, M. Caparon, and S. J. Hultgren, ‘Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options’, *Nature Reviews Microbiology 2015 13:5*, vol. 13, no. 5, pp. 269–284, Apr. 2015, doi: 10.1038/nrmicro3432.
- [12] P. Ankomah, P. J. T. Johnson, and B. R. Levin, ‘The pharmaco -, population and evolutionary dynamics of multi-drug therapy: experiments with *S. aureus* and *E. coli* and computer simulations’, *PLoS Pathog*, vol. 9, no. 4, Apr. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1003300.
- [13] M. Hegreness, N. Shores, D. Damian, D. Hartl, and R. Kishony, ‘Accelerated evolution of resistance in multidrug environments’, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no. 37, pp. 13977–13981, Sep. 2008, doi: 10.1073/PNAS.0805965105.
- [14] M. J. González, P. Zunino, P. Scavone, and L. Robino, ‘Selection of Effective Antibiotics for Uropathogenic *Escherichia coli* Intracellular

- Bacteria Reduction’, *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 10, Oct. 2020, doi: 10.3389/FCIMB.2020.542755/FULL.
- [15] L. Jakobsen, C. V. Lundberg, and N. Frimodt-Møller, ‘Ciprofloxacin pharmacokinetics/pharmacodynamics against susceptible and low-level resistant *Escherichia coli* isolates in an experimental ascending urinary tract infection model in mice’, *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 65, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.1128/AAC.01804-20.
- [16] P. D. Tamma, S. L. Aitken, R. A. Bonomo, A. J. Mathers, D. van Duin, and C. J. Clancy, ‘Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-P. *aeruginosa*)’, *Clin Infect Dis*, vol. 72, no. 7, pp. e169–e183, Apr. 2021, doi: 10.1093/CID/CIAA1478.
- [17] I. N. Okeke and J. P. Nataro, ‘Enterotoxigenic *Escherichia coli*’, *Lancet Infect Dis*, vol. 1, no. 5, pp. 304–313, Dec. 2001, doi: 10.1016/S1473-3099(01)00144-X.
- [18] M. Nitschke *et al.*, ‘Association between azithromycin therapy and duration of bacterial shedding among patients with Shiga toxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* O104:H4’, *JAMA*, vol. 307, no. 10, pp. 1046–1052, Mar. 2012, doi: 10.1001/JAMA.2012.264.
- [19] S. A. Aljihani *et al.*, ‘Enhancing azithromycin antibacterial activity by encapsulation in liposomes/liposomal-N-acetylcysteine formulations against resistant clinical strains of *Escherichia coli*’, *Saudi J Biol Sci*, vol. 27, no. 11, pp. 3065–3071, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.sjbs.2020.09.012.
- [20] L. M., ‘Summary of the Committee to Advise on Tropical Medicine and Travel (CATMAT) Statement on Travellers’ Diarrhea’, *Can Commun Dis*

- Rep*, vol. 41, no. 11, pp. 272–284, Nov. 2015, doi: 10.14745/CCDR.V41I11A03.
- [21] K. J. Aldred, R. J. Kerns, and N. Osheroﬀ, ‘Mechanism of Quinolone Action and Resistance’, *Biochemistry*, vol. 53, no. 10, p. 1565, Mar. 2014, doi: 10.1021/BI5000564.
- [22] C. C. Sanders, ‘Ciproﬂoxacin: in vitro activity, mechanism of action, and resistance’, *Rev Infect Dis*, vol. 10, no. 3, pp. 516–527, 1988, doi: 10.1093/CLINIDS/10.3.516.
- [23] M. Heidary *et al.*, ‘Mechanism of action, resistance, synergism, and clinical implications of azithromycin’, *J Clin Lab Anal*, vol. 36, no. 6, Jun. 2022, doi: 10.1002/JCLA.24427.
- [24] M. J. Parnham, V. E. Haber, E. J. Giamarellos-Bourboulis, G. Perletti, G. M. Verleden, and R. Vos, ‘Azithromycin: Mechanisms of action and their relevance for clinical applications’, *Pharmacol Ther*, vol. 143, no. 2, pp. 225–245, 2014, doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.03.003.
- [25] F. Fuentes, J. Izquierdo, M. M. Martín, M. L. Gomez-Lus, and J. Prieto, ‘Postantibiotic and sub-MIC eﬀects of azithromycin and isepamicin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*’, *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 42, no. 2, pp. 414–418, Feb. 1998, doi: 10.1128/AAC.42.2.414.
- [26] T. Tuan-Anh *et al.*, ‘Pathogenic *Escherichia coli* Possess Elevated Growth Rates under Exposure to Sub-Inhibitory Concentrations of Azithromycin’, *Antibiotics*, vol. 9, no. 11, pp. 1–15, Nov. 2020, doi: 10.3390/ANTIBIOTICS9110735.
- [27] A. L. Barry, C. Thornsberry, and T. L. Gavan, ‘Quality control parameters and interpretive criteria for in vitro susceptibility tests with the macrolide azithromycin. Collaborative Antimicrobial Susceptibility Testing Group’,

- Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, vol. 8, no. 6, pp. 544–549, Jun. 1989, doi: 10.1007/BF01967477.
- [28] ‘Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution’, *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 9, no. 8, pp. ix–xv, Aug. 2003, doi: 10.1046/J.1469-0691.2003.00790.X.
- [29] J. Machuca *et al.*, ‘Cellular response to ciprofloxacin in low-level quinolone-resistant *Escherichia coli*’, *Front Microbiol*, vol. 8, no. JUL, Jul. 2017, doi: 10.3389/FMICB.2017.01370.
- [30] H. J. Linde, F. Notka, M. Metz, B. Kochanowski, P. Heisig, and N. Lehn, ‘In vivo increase in resistance to ciprofloxacin in *Escherichia coli* associated with deletion of the C-terminal part of *marR*’, *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 44, no. 7, pp. 1865–1868, Jul. 2000, doi: 10.1128/AAC.44.7.1865-1868.2000.
- [31] D. M. Campoli-Richards, J. P. Monk, A. Price, P. Benfield, P. A. Todd, and A. Ward, ‘Ciprofloxacin: A Review of Its Antibacterial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use’, *Drugs*, vol. 35, no. 4, pp. 373–447, Apr. 1988, doi: 10.2165/00003495-198835040-00003.
- [32] E. A. Abu-Basha, S. M. Gharaibeh, and A. M. Thabet, ‘In vitro susceptibility of resistant *Escherichia coli* field isolates to antimicrobial combinations’, *Journal of Applied Poultry Research*, vol. 21, no. 3, pp. 595–602, Sep. 2012, doi: 10.3382/JAPR.2011-00500.
- [33] M. W. Ruble, D. H. Gilbert, and S. H. Zinner, ‘In-vitro interaction of azithromycin and fluoroquinolones against gram-positive and gram-negative bacteria’, *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 1, no. 3, pp. 183–189, Mar. 1996, doi: 10.1111/j.1469-0691.1996.tb00551.x.
- [34] H. Saini, S. Chhibber, and K. Harjai, ‘Azithromycin and ciprofloxacin: A possible synergistic combination against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-

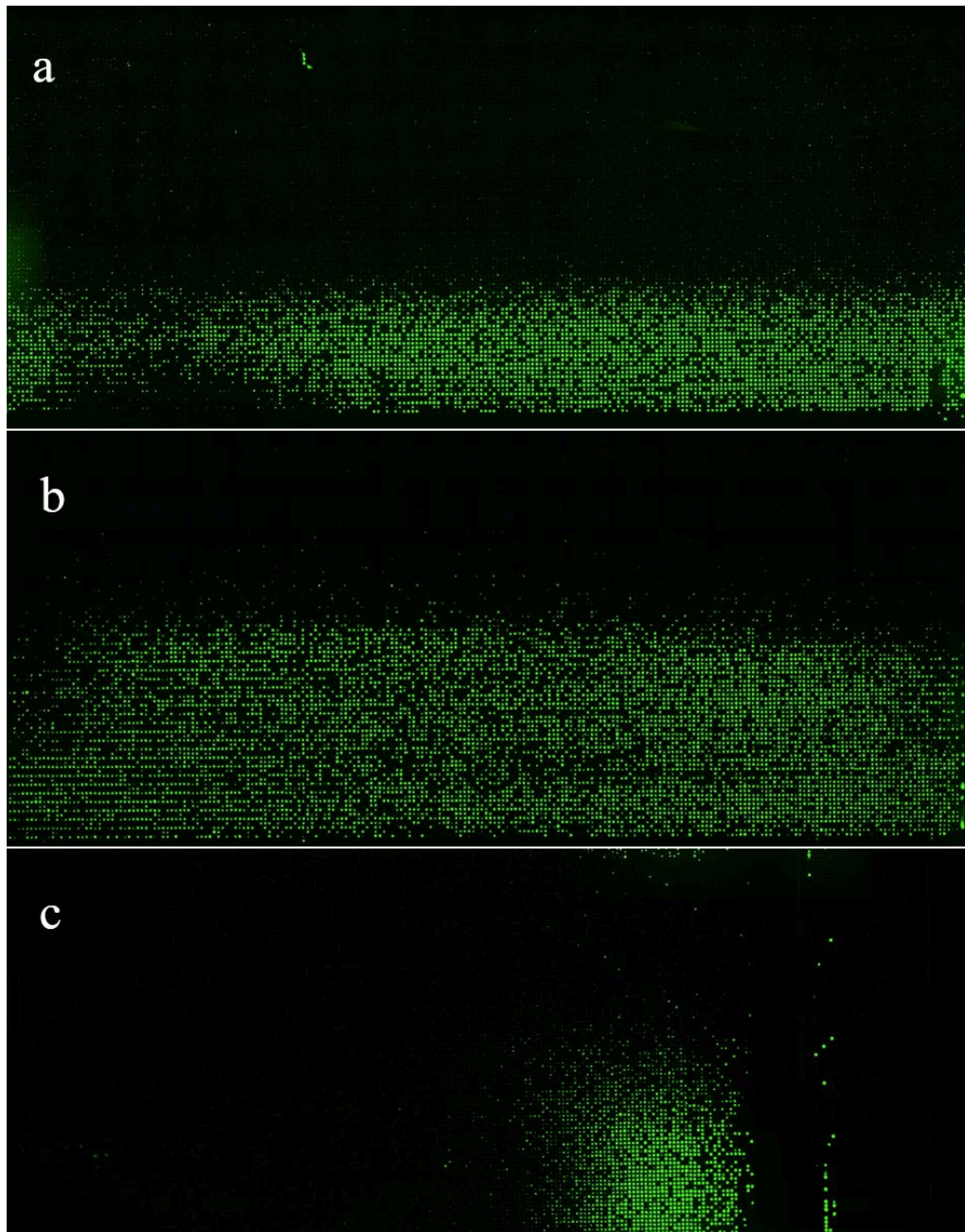
- associated urinary tract infections’, *Int J Antimicrob Agents*, vol. 45, no. 4, pp. 359–367, Apr. 2015, doi: 10.1016/J.IJANTIMICAG.2014.11.008.
- [35] F. Fernández-Cuenca, L. Martínez-Martínez, A. Pascual, and E. J. Perea, ‘In vitro activity of azithromycin in combination with amikacin, ceftazidime, ciprofloxacin or imipenem against clinical isolates of *Acinobacter baumannii*’, *Chemotherapy*, vol. 49, no. 1–2, pp. 24–26, 2003, doi: 10.1159/000069774.
- [36] V. Magri *et al.*, ‘Fluoroquinolone-macrolide combination therapy for chronic bacterial prostatitis: Retrospective analysis of pathogen eradication rates, inflammatory findings and sexual dysfunction’, *Asian J Androl*, vol. 13, no. 6, pp. 819–827, Nov. 2011, doi: 10.1038/AJA.2011.36.
- [37] I. Gajic *et al.*, ‘Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods’, *Antibiotics (Basel)*, vol. 11, no. 4, Apr. 2022, doi: 10.3390/ANTIBIOTICS11040427.
- [38] O. Gefen, B. Chekol, J. Strahilevitz, and N. Q. Balaban, ‘TDtest: easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay’, *Sci Rep*, vol. 7, Feb. 2017, doi: 10.1038/SREP41284.
- [39] W. Postek, N. Pacocha, and P. Garstecki, ‘Microfluidics for antibiotic susceptibility testing’, *Lab Chip*, vol. 22, no. 19, pp. 3637–3662, Sep. 2022, doi: 10.1039/D2LC00394E.
- [40] T. G. Fernandes, M. M. Diogo, D. S. Clark, J. S. Dordick, and J. M. S. Cabral, ‘High-throughput cellular microarray platforms: applications in drug discovery, toxicology and stem cell research’, *Trends Biotechnol*, vol. 27, no. 6, pp. 342–349, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.tibtech.2009.02.009.
- [41] R. H. Cole *et al.*, ‘Printed droplet microfluidics for on demand dispensing of picoliter droplets and cells’, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 114, no. 33,

- pp. 8728–8733, Aug. 2017, doi: 10.1073/PNAS.1704020114/SUPPL_FILE/PNAS.201704020SI.PDF.
- [42] A. A. Popova, K. Demir, T. G. Hartanto, E. Schmitt, and P. A. Levkin, ‘Droplet-microarray on superhydrophobic–superhydrophilic patterns for high-throughput live cell screenings’, *RSC Adv*, vol. 6, no. 44, pp. 38263–38276, Apr. 2016, doi: 10.1039/C6RA06011K.
- [43] P. L. Urban *et al.*, ‘High-density micro-arrays for mass spectrometry’, *Lab Chip*, vol. 10, no. 23, pp. 3206–3209, Nov. 2010, doi: 10.1039/C0LC00211A.
- [44] S. Sakakihara, S. Araki, R. Iino, and H. Noji, ‘A single-molecule enzymatic assay in a directly accessible femtoliter droplet array’, *Lab Chip*, vol. 10, no. 24, pp. 3355–3362, Dec. 2010, doi: 10.1039/C0LC00062K.
- [45] J. Campbell, C. McBeth, M. Kalashnikov, A. K. Boardman, A. Sharon, and A. F. Sauer-Budge, ‘Microfluidic advances in phenotypic antibiotic susceptibility testing’, *Biomed Microdevices*, vol. 18, no. 6, Dec. 2016, doi: 10.1007/S10544-016-0121-8.
- [46] A. S. Opalski, A. Ruszczak, Y. Promovych, M. Horka, L. Derzsi, and P. Garstecki, ‘Combinatorial Antimicrobial Susceptibility Testing Enabled by Non-Contact Printing’, *Micromachines 2020, Vol. 11, Page 142*, vol. 11, no. 2, p. 142, Jan. 2020, doi: 10.3390/MI11020142.
- [47] S. P. Riley, M. E. Woodman, J. Holt, and B. Stevenson, ‘Culture of *Escherichia coli* and Related Bacteria’, *Curr Protoc Essent Lab Tech*, vol. 15, no. 1, pp. 4.2.1–4.2.30, Nov. 2017, doi: 10.1002/CPET.17.
- [48] A. R. Tuttle, N. D. Trahan, and M. S. Son, ‘Growth and Maintenance of *Escherichia coli* Laboratory Strains’, *Curr Protoc*, vol. 1, no. 1, p. e20, Jan. 2021, doi: 10.1002/CPZ1.20.

- [49] H. Mi *et al.*, ‘Dimethyl Sulfoxide Protects *Escherichia coli* from Rapid Antimicrobial-Mediated Killing’, *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 60, no. 8, pp. 5054–5058, Aug. 2016, doi: 10.1128/AAC.03003-15.
- [50] ‘ISO 20776-1:2019 - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases’. <https://www.iso.org/standard/70464.html> (accessed May 31, 2023).
- [51] B. Li *et al.*, ‘Gradient microfluidics enables rapid bacterial growth inhibition testing’, *Anal Chem*, vol. 86, no. 6, pp. 3131–3137, Mar. 2014, doi: 10.1021/AC5001306/SUPPL_FILE/AC5001306_SI_001.PDF.
- [52] M. Ardré, G. Doulcier, N. Brenner, and P. B. Rainey, ‘A leader cell triggers end of lag phase in populations of *Pseudomonas fluorescens*’, *microLife*, vol. 3, Dec. 2022, doi: 10.1093/FEMSML/UQAC022.
- [53] V. I. Martínez-Santos *et al.*, ‘Enteraggregative *Escherichia coli* is associated with antibiotic resistance and urinary tract infection symptomatology’, *PeerJ*, vol. 9, p. e11726, Aug. 2021, doi: 10.7717/peerj.11726.
- [54] I. Brook, ‘Inoculum Effect’, *Rev Infect Dis*, vol. 11, no. 3, pp. 361–368, May 1989, doi: 10.1093/CLINIDS/11.3.361.
- [55] ‘Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents’, *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 6, no. 9, pp. 503–508, Sep. 2000, doi: 10.1046/J.1469-0691.2000.00149.X.
- 6.

ДОДАТКИ

Додаток 1



Повний профіль флуоресценції GFP мікрофлюїдних експериментів тестування антибіотикової чутливості: а) експеримент 1, градієнт ципрофлоксацину, б) експеримент 2, градієнт азитроміцину, в) експеримент 3, перехресний градієнт ципрофлоксацину та азитроміцину.