

Антибактериальное действие антисептика пиклоксидина дигидрохлорида на конъюнктивальные изоляты грамотрицательных бактерий

© А.С. ХАЛАТЯН¹, Е.Г. ХОЛИНА², М.Г. СТРАХОВСКАЯ^{2,3}, М.В. БУДЗИНСКАЯ¹, Н.В. ШЕВЛЯГИНА⁴, В.Г. ЖУХОВИЦКИЙ⁴

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней», Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия;

³ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России», Москва, Россия;

⁴ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почет. акад. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Применение антисептиков для предоперационной подготовки глаза и послеоперационной профилактики инфекционных осложнений может стать альтернативой антибиотикам при регулярных курсах anti-VEGF-терапии для уменьшения риска выработки антибиотикорезистентности глазной микрофлоры. Среди грамотрицательных бактерий наиболее часто выделяемым патогеном, вызывающим глазные инфекции, является *Pseudomonas aeruginosa*. Для этого возбудителя характерна пониженная чувствительность к антибиотикам и дезинфицирующим средствам.

Цель исследования. Изучить влияние антисептика пиклоксидина дигидрохлорида на выделенные с конъюнктивы грамотрицательные бактерии *Escherichia coli*, *Pseudomonas luteola* и *P. aeruginosa*.

Материал и методы. Идентификацию бактериальных изолятов и исследование антибиотикочувствительности проводили с помощью автоматизированного бактериологического анализатора BD Phoenix 100. Для определения бактерицидной концентрации использовали метод серийных разведений антисептика пиклоксидина дигидрохлорида в жидкой питательной среде. О связывании молекул пиклоксидина дигидрохлорида с клетками грамотрицательных бактерий судили по нейтрализации поверхности бактерий возрастающими количествами антисептика с помощью измерения дзета-потенциала на анализаторе Zetasizer Nano ZS. Исследование ультраструктуры бактериальных клеток проводили с помощью двухлучевого сканирующего ионно-электронного микроскопа Quanta 200 3D.

Результаты. Наибольшую устойчивость проявляет *P. aeruginosa*. Механизм взаимодействия пиклоксидина дигидрохлорида с клетками бактерий заключается в электростатическом связывании положительно заряженных молекул антисептика с отрицательно заряженными клеточными стенками. Согласно результатам электронно-микроскопического исследования, пиклоксидина дигидрохлорид оказывает выраженное деструктивное действие на клеточную стенку и плазмолемму бактерий, что приводит к лизису клеток и выходу внутриклеточного содержимого.

Заключение. Пиклоксидина дигидрохлорид проявляет бактерицидную активность в отношении грамотрицательных конъюнктивальных изолятов и перспективен для профилактического использования при проведении повторяющихся курсов интравитреальных инъекций.

Ключевые слова: микрофлора глаза, грамотрицательные бактерии, *Pseudomonas aeruginosa*, антисептик пиклоксидин дигидрохлорид.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Халатян А.С. — e-mail: anais92@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-6255-5544>

Холина Е.Г. — <https://orcid.org/0000-0002-5918-5084>

Страховская М.Г. — <https://orcid.org/0000-0002-4571-0431>

Будзинская М.В. — <https://orcid.org/0000-0002-5507-8775>

Шевлягина Н.В. — <https://orcid.org/0000-0001-9651-1654>

Жуховицкий В.Г. — <https://orcid.org/0000-0002-4653-2446>

Автор, ответственный за переписку: Халатян А.С. — e-mail: anais92@gmail.com

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Халатян А.С., Холина Е.Г., Страховская М.Г., Будзинская М.В., Шевлягина Н.В., Жуховицкий В.Г. Антибактериальное действие антисептика пиклоксидина дигидрохлорида на конъюнктивальные изоляты грамотрицательных бактерий. *Вестник офтальмологии*. 2021;137(5):238–247. <https://doi.org/10.17116/oftalma2021137052238>

Antibacterial effect of the antiseptic picloxydine dihydrochloride on conjunctival isolates of gram-negative bacteria

© A.S. KHALATYAN¹, E.G. KHOLINA², M.G. STRAKHOVSKAYA^{2,3}, M.V. BUDZINSKAYA¹, N.V. SHEVLYAGINA⁴, V.G. ZHUKHOVITSKY⁴

¹Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russia;

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

³Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia;

⁴Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

ABSTRACT

The preoperative and postoperative use of antiseptics can be an alternative to antibiotics in repeated courses of anti-VEGF therapy for reducing the risk of developing antibiotic resistance in eye microflora. Among gram-negative bacteria, the most frequently isolated pathogen that causes eye infections is *Pseudomonas aeruginosa*, which is characterized by reduced sensitivity to antibiotics and disinfectants.

Purpose — to study the effect of the antiseptic picloxydine dihydrochloride on the gram-negative bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas luteola* and *P. aeruginosa* isolated from the conjunctiva.

Material and methods. The identification of bacterial isolates and study of their sensitivity to antibiotics were carried out using the automated bacteriological analyzer BD Phoenix 100. To determine the bactericidal concentration, the method of serial dilutions of the antiseptic in a liquid nutrient medium was used. The binding of cationic molecules of picloxydine dihydrochloride to bacterial cells was detected by neutralizing the bacterial surface with increasing amounts of antiseptic, and measuring the zeta potential on the Zetasizer Nano ZS analyzer. The ultrastructure of bacterial cells was studied using the two-beam scanning ion-electron microscope Quanta 200 3D.

Results. The most resistant was *P. aeruginosa*. The interaction mechanism of picloxydine dihydrochloride with bacterial cells includes electrostatic binding of positively charged antiseptic molecules to negatively charged cell walls. Picloxydine dihydrochloride has a destructive effect on the bacterial cell wall and plasma membrane, which leads to cell lysis and release of intracellular components.

Conclusion. Picloxydine dihydrochloride exhibits bactericidal activity against gram-negative conjunctival isolates and is promising for preventive use during repeated courses of intravitreal injections.

Keywords: eye microflora, gram-negative bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, antiseptic picloxydine dihydrochloride.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Khalatyan A.S. — e-mail: anaits92@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-6255-5544>

Kholina E.G. — <https://orcid.org/0000-0002-5918-5084>

Strakhovskaya M.G. — <https://orcid.org/0000-0002-4571-0431>

Budzinskaya M.V. — <https://orcid.org/0000-0002-5507-8775>

Shevlyagina N.V. — <https://orcid.org/0000-0001-9651-1654>

Zhukhovitsky V.G. — <https://orcid.org/0000-0002-4653-2446>

Corresponding author: Khalatyan A.S. — e-mail: anaits92@gmail.com

TO CITE THIS ARTICLE:

Khalatyan AS, Kholina EG, Strakhovskaya MG, Budzinskaya MV, Shevlyagina NV, Zhukhovitsky VG. Antibacterial effect of the antiseptic picloxydine dihydrochloride on conjunctival isolates of gram-negative bacteria. *The Russian Annals of Ophthalmology = Vestnik oftal'mologii*. 2021;137(5):238–247. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/oftalma2021137052238>

Микрофлора глаза в норме представляет собой микробиоценоз, состоящий из грамположительных бактерий, к которым относятся коагулазонегативные стафилококки (КНС), в частности *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus*, и коагулазоположительные стафилококки — *Staphylococcus aureus*, ряд других бактерий, например *Propionibacterium* spp., а также грамотрицательные бактерии *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, различные плесневые грибы, такие как *Fusarium* spp., *Cephalosporium* spp. В ходе исследования влияния антибактериальной терапии на состав и свойства микрофлоры конъюнктивы при интравитреальных инъекциях [1–3] нами выявлен рост микрофлоры в 48,3% мазков. Среди

изолятов, которые были выделены с конъюнктивы у пациентов разных групп, преобладали грамположительные стафилококки (93,2%), а среди них — КНС (87,3%).

Вследствие травмы, операции или в условиях иммунодефицита бактерии, заселяющие глазную поверхность, могут вызывать инфекционные заболевания глаз (кератит, эндофтальмит и др.), часто приводящие к потере зрения вследствие несвоевременной и некорректной антимикробной терапии. Терапия инфекционных заболеваний глаз обычно назначается эмпирически: до получения результатов микробиологических исследований — идентификации возбудителя инфекции и оценки его резистентности к антимикробным средствам [4, 5].

При исследовании микрофлоры конъюнктивы у пациентов с инфекционными заболеваниями глаз выделяются как грамположительные (68,5%), так и грамотрицательные (29,8%) виды бактерий [6]. Грамотрицательные бактерии, наиболее часто вызывающие глазные инфекции, включают *P. aeruginosa*, *E. coli* и *Enterobacter* spp. [7], причем самым часто выделяемым патогеном является *P. aeruginosa* [8]. Среди представителей рода *Pseudomonas* распространена множественная лекарственная устойчивость, а острота зрения у пациентов после перенесенного эндофтальмита, вызванного этими бактериями, очень низкая. *P. aeruginosa* известна своей высокой степенью адаптации к различным средам [9]. Сниженная чувствительность к антибиотикам и дезинфицирующим средствам широко распространена у клинических изолятов *P. aeruginosa* [10–12], что затрудняет лечение инфекционных заболеваний, вызванных этими бактериями. *P. aeruginosa* обладает не только хромосомными генами устойчивости ко многим противомикробным препаратам, но также способностью приобретать мобильные генетические элементы (англ. mobile genetic elements — MGE) [13, 14]. Этот механизм лежит в основе возникновения и быстрого распространения лекарственной устойчивости [9].

E. coli относится к группе колиморфных бактерий, является комменсалом в кишечнике человека и других теплокровных млекопитающих [15] и обладает высокой степенью генотипического и фенотипического разнообразия. *E. coli* также обитает на поверхности глаза и внутренней поверхности век и является возбудителем примерно 1,1% всех глазных инфекций [16], таких как кератит [17], эндофтальмит [18, 19], панеофтальмит [20], абсцесс века [21] и конъюнктивит [22]. Обычно инфекция, вызванная данной бактерией, быстро проходит после лечения антибактериальными средствами. Однако в последние годы обнаруживается возрастающая устойчивость *E. coli* к противомикробным препаратам. Так, 10 из 12 изолятов *E. coli* с конъюнктивы, роговицы, из стекловидного тела или слезного мешка пациентов были устойчивы по меньшей мере к одному или нескольким из девяти протестированных антибиотиков. У большинства (8/10) устойчивых к антибиотикам глазных изолятов *E. coli* обнаружена тесная связь между устойчивостью к антибиотикам и способностью образовывать биопленки [23, 24]. Бактерии в биопленке проявляют повышенную устойчивость к антибиотикам благодаря нескольким факторам: связыванию антибиотиков с внеклеточными полимерными веществами, выработке ферментов, которые инактивируют антибиотики, повышению эффективности эффлюксных насосов, тонкой регуляции генов, связанных с лекарственной устойчивостью [25, 26]. Подавляющее количество изолятов (85%), выделенных с поверхности искусственных оптических линз, представляющих собой *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*,

Neisseria spp., *Moraxella* spp., *Bacillus* spp., *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella* spp., продемонстрировали способность образовывать биопленки и были устойчивы к антибиотикам [27].

В глазной хирургии, в частности в хирургии интравитреальных инъекций (ИВИ), существует сложная проблема выбора оптимального средства антибактериальной терапии для профилактики или борьбы с инфекционными послеоперационными осложнениями. Инфекционный эндофтальмит, возникающий после проведения ИВИ, является наиболее опасным осложнением из-за плохого прогноза, связанного с тяжелой и необратимой потерей зрения. Первоначально, на заре эпохи ИВИ, с целью антимикробной профилактики широко использовали антибиотики местного действия, поскольку их применение указано во многих протоколах клинических исследований. Однако антибиотики местного действия, используемые при ИВИ, имеют ряд недостатков, в том числе узкий спектр антибактериальной активности, длительное время, необходимое для проявления бактерицидного эффекта, низкий уровень концентрации в стекловидном теле [28]. Показано, например, что 0,5% моксифлоксацин и 0,3% гатифлоксацин достигают витреальной полости в невоспаленном глазу, однако все показатели концентрации в стекловидном теле были ниже 90% минимальной ингибирующей концентрации для основных бактериальных патогенов, вызывающих острый бактериальный эндофтальмит [29]. Во многих исследованиях доказано отсутствие эффективности антибиотиков местного использования в профилактике постинъекционного эндофтальмита [30–32], а также, что повторное использование данных антибиотиков может потенциально привести к селекции резистентных штаммов [33–35] и даже повысить риск развития указанного заболевания [36]. Прекращение применения местных антибиотиков при ИВИ не увеличивало частоту возникновения эндофтальмита [37]. При выполнении 12 523 инъекций антибиотики не использовали ни до, ни после ИВИ, а применяли лишь повидон-йод во время процедуры — и эндофтальмит не развился [28].

Альтернативным методом обработки глаза, используемым в хирургии ИВИ и по эффективности сопоставимым с действием повидон-йода, является применение антисептиков из группы бигуанидов. Водный раствор хлоргексидина, используемый как антисептическое средство до ИВИ, хорошо переносится пациентами и эффективен, что подтверждается низкой частотой случаев развития эндофтальмита [38]. После обработки 0,05% раствором хлоргексидина наблюдалось значительное уменьшение общей бактериальной нагрузки конъюнктивы (82%), а еще более убедительные результаты отмечены по отношению к КНС (90%) [39].

Как показано в наших исследованиях [2, 3], другой бигуанид — пиклоксидина дигидрохлорид

(N,N'-бис[[[4-хлорфенил)амино]иминометил]-1,4-пиперазиндикарбоксимид дигидрохлорид) проявляет высокую активность в отношении конъюнктивных изолятов стафилококков. Независимо от антибиотикорезистентности изолятов минимальная бактерицидная концентрация пиклоксидина дигидрохлорида составляет 31,25 мкг/мл. С учетом важнейшей роли грамотрицательных бактерий в развитии посттравматических и постоперационных инфекций представляется интересным изучить бактерицидное действие пиклоксидина в отношении этих минорных в микрофлоре глаза видов бактерий.

Цель исследования — изучить влияние антисептика пиклоксидина гидрохлорида на выделенные с конъюнктивы грамотрицательные бактерии *E. coli*, *P. luteola* и *P. aeruginosa*.

Материал и методы

В исследование включены изоляты *E. coli*, *P. luteola* и *P. aeruginosa*, полученные из посевов проб конъюнктивы пациентов. Посев выполняли на транспортную систему со средой Эймса, при взятии материала контакт с кожей ресниц и веками исключен. Идентификацию микроорганизмов и исследование антибиотикочувствительности проводили на панели NMIC/ID-400 с помощью автоматизированного бактериологического анализатора BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, США).

Для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) и минимальной бактерицидной концентрации (МБК) использовали метод серийных разведений антисептика пиклоксидина дигидрохлорида в жидкой питательной среде. Выращивание культур осуществлялось при 37°C в течение 24 ч на агаре Columbia (Becton Dickinson, США) с добавлением 5% бараньей крови. Материал агаровых культур суспендировали в фосфатном буфере (PBS, pH 7,4) до показателя мутности 0,5 МакФарланда (McF). По 20 мкл суспензий бактерий вносили в 200 мкл триптиказо-соевого бульона (TSB; Becton Dickinson, США) без добавок или с разведениями, соответствующими концентрациям пиклоксидина дигидрохлорида 250 мкг/мл, 125 мкг/мл, 62,5 мкг/мл и 31,25 мкг/мл. Культуры выращивали в стерильных 96-луночных планшетах при 37°C. О росте изолятов судили по увеличению оптической плотности культур, которую регистрировали при 490 нм с помощью анализатора Wallac 1420 (Victor 2) (Perkin Elmer, США) в начальный момент времени, при внесении бактерий в жидкую питательную среду, а также через 24 ч и 96 ч роста. МПК определяли как минимальную концентрацию, при которой рост тест-культур отсутствовал через 24 ч культивирования, а МБК — через 96 ч культивирования.

Влияние кратковременных (до 1 ч) воздействий пиклоксидина дигидрохлорида на бактерии в суспензиях (10^8 КОЕ/мл) проводили или непосред-

ственно в глазных каплях, содержащих пиклоксидина дигидрохлорид в концентрации 500 мкг/мл, или при их разведении от 1:1 до 1:16 натрий-фосфатным буферным раствором. После инкубации пробы высевали на агар Columbia (Becton Dickinson, США) и культивировали в течение 24 ч. О связывании катионных молекул пиклоксидина с клетками грамотрицательных бактерий судили по нейтрализации поверхности бактерий возрастающими количествами антисептика с помощью измерения поверхностного потенциала (дзета-потенциала). Бактериальные клетки, выращенные при 37°C в течение 24 ч, суспендировали (до показателя мутности 0,3 McF) в среде, содержащей глюкозу 50 мг/мл, Твин 80 0,25 мг/мл (входят в качестве дополнительных компонентов в содержащие пиклоксидина дигидрохлорид глазные капли) без добавления антисептика, а также в глазных каплях, содержащих 500 мкг/мл пиклоксидина дигидрохлорида без разведения или в разведениях до 1:50 натрий-фосфатным буфером. Через 5—15 мин после суспендирования проводили измерение дзета-потенциала с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания).

Исследование ультраструктуры бактериальных клеток проводили с помощью двухлучевого сканирующего ионно-электронного микроскопа Quanta 200 3D (FEI Company, США). Образцы не подвергали дегидратации, напыляли электропроводящим слоем золота толщиной 5 нм (проба Au₉₉₉), используя модуль для напыления SPI-MODULE Sputter Coater (SPI Supplies, США).

Результаты

Чувствительность к антибиотикам

Среди грамотрицательных бактерий, выделенных из 120 конъюнктивных проб, полирезистентные изоляты не выявлены. Изоляты *E. coli* и *P. luteola* были чувствительны ко всем исследуемым антибиотикам панели NMIC/ID-400. Изолят *P. aeruginosa* обладал резистентностью к триметоприм/сульфаметоксазолу и промежуточной резистентностью к азтреонаму.

Действие пиклоксидина дигидрохлорида на изоляты грамотрицательных бактерий

В соответствии с динамикой роста в жидкой питательной среде, содержащей пиклоксидина дигидрохлорид в концентрациях от 62,5 до 250 мкг/мл, увеличение плотности культур *E. coli* не наблюдалось как через 24 ч, так и через 96 ч культивирования. При концентрации антисептика 31,25 мкг/мл отмечали увеличение плотности культур. Таким образом, для *E. coli* МПК=МБК и составляла 62,5 мкг/мл пиклоксидина дигидрохлорида (табл. 1).

Изолят *P. aeruginosa* обладал существенно большей устойчивостью к антисептику: через 24 ч и 96 ч культивирования рост отмечен даже при наиболь-

шей используемой в данном тесте концентрации — 250 мкг/мл пиклоксидина дигидрохлорида. Чувствительность к антисептику другого вида псевдомонад — *P. luteola* оказалась на уровне грамположительных изолятов: МПК составила 15,625 мкг/мл, а МБК — 31,25 мкг/мл (см. табл. 1).

Инкубация *E. coli* или *P. aeruginosa* (10^8 КОЕ/мл) непосредственно в неразведенных глазных каплях с содержанием 500 мкг/мл пиклоксидина дигидрохлорида в течение 15 мин приводила к полной потере жизнеспособности бактерий (табл. 2), что подтверждалось при последующем высевании и культивировании изолятов на твердой питательной среде при 37°C в течение 24 ч.

Увеличение времени инкубации бактерий с антисептиком до 60 мин позволило достичь полной инактивации микроорганизмов при сниженной в 16 раз концентрации пиклоксидина дигидрохлорида (31,25 мкг/мл; глазные капли с разведением 1:16 натрий-фосфатным буфером). Полученные данные свидетельствуют о том, что для достижения полной инактивации грамотрицательных бактерий в буферном растворе требуются более низкие концентрации пиклоксидина дигидрохлорида по сравнению с жидкой питательной средой. Очевидно, компоненты питательной среды влияют на процесс взаимодействия пиклоксидина дигидрохлорида с бактериальными клетками, ослабляя действие антисептика.

Таблица 1. Минимальные подавляющие рост и минимальные бактерицидные концентрации пиклоксидина дигидрохлорида в отношении конъюнктивных изолятов бактерий при росте на жидкой питательной среде

Table 1. Minimal growth suppressing and antibacterial concentrations of picloxydine dihydrochloride in respect of conjunctival isolates of the bacteria growing in liquid nutrient medium

Изоляты	МПК, мкг/мл	МБК, мкг/мл
<i>Escherichia coli</i>	62,5	62,5
<i>Pseudomonas luteola</i>	15,625	31,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Больше 250	Больше 250
<i>Staphylococcus aureus</i>		
(данные по 5 изолятам)*	15,625	15,625
КНС (данные по 43 изолятам)*	15,625	15,625

Примечание. * — по данным [2, 3]; МПК — минимальная подавляющая концентрация; МБК — минимальная бактерицидная концентрация; КНС — коагулазонегативные стафилококки.

Таблица 2. Бактерицидное и нейтрализующее поверхностный заряд клеток действие пиклоксидина дигидрохлорида при инкубации конъюнктивных изолятов бактерий в глазных каплях без разведения (500 мкг/мл пиклоксидина дигидрохлорида)

Table 2. Antibacterial and neutralizing superficial cell charge action of picloxydine dihydrochloride during incubation of conjunctival isolates of bacteria in eye drops without dilution (500 µg/ml of picloxydine dihydrochloride)

Изоляты	Инкубация			
	без пиклоксидина дигидрохлорида		с добавлением пиклоксидина дигидрохлорида 500 мкг/мл в течение 15 мин	
	КОЕ/мл	Дзета-потенциал, мВ	КОЕ/мл	Дзета-потенциал, мВ
<i>Escherichia coli</i>	10^8	–14,7	0	+3,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10^8	–24,2	0	–3,1

Примечание. КОЕ — колониеобразующие единицы.

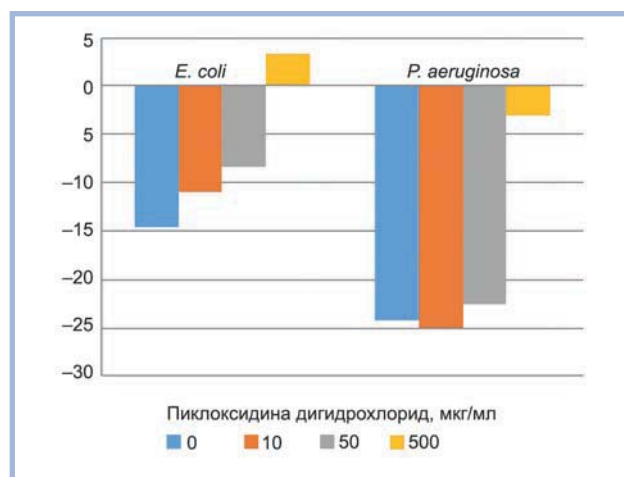


Рис. 1. Дзета-потенциал клеток *E. coli* и *P. aeruginosa* в присутствии 10–500 мкг/мл пиклоксидина дигидрохлорида и без него.

Fig. 1. Zeta potential of *E. coli* and *P. aeruginosa* cells without and in presence of 10–500 µg/ml of picloxydine dihydrochloride.

В отсутствие антисептика клетки бактерий несли отрицательный поверхностный заряд: дзета-потенциал составлял –14,7 мВ для *E. coli* и –24,2 мВ для *P. aeruginosa*. При добавлении возрастающих количеств пиклоксидина дигидрохлорида наблюдали сдвиг дзета-потенциала клеток *E. coli* в сторону менее отрицательных (нейтральных) значений (см. табл. 2, рис. 1). В неразведенном препарате глазных капель, содержащих 500 мкг/мл пиклоксидина дигидрохлорида, клетки *E. coli* принимали положительный заряд: +3,3 мВ. Нейтрализация дзета-потенциала клеток *P. aeruginosa* происходила только в неразведенном препарате глазных капель, содержащих 500 мкг/мл пиклоксидина дигидрохлорида, при этом клетки *P. aeruginosa* приобретали слабоотрицательный дзета-потенциал: –3,12 мВ.

Ультраструктура бактериальных клеток при воздействии пиклоксидина дигидрохлорида

У клеток *E. coli*, потерявших способность к колониеобразованию при воздействии 500 мкг/мл пиклоксидина дигидрохлорида в течение 15 мин или 31,25 мкг/мл в течение 60 мин, наблюдали образование пор в клеточных стенках размером 23–82 нм, разрывы клеточных стенок на полюсах клеток, уменьшение длины клеток (рис. 2).

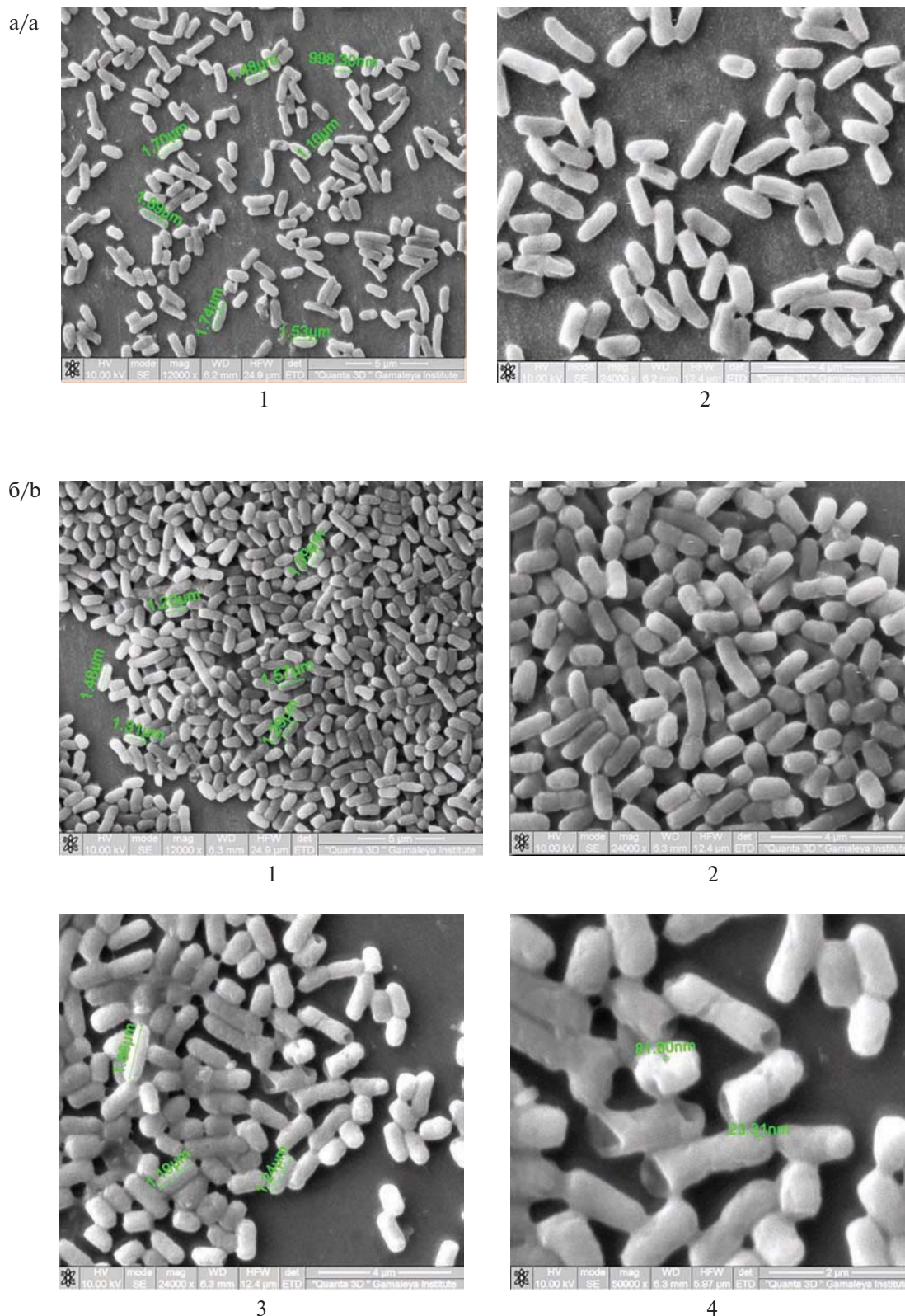


Рис. 2. Результат сканирующей электронной микроскопии. Морфология клеток *E. coli*.

a1, a2 — без воздействия пиклоксидина дигидрохлорида; при воздействии пиклоксидина дигидрохлорида: б1, б2 — 500 мкг/мл 15 мин; б3, б4 — 31,25 мкг/мл 60 мин.

Fig. 2. Results of scanning electron microscopy. Morphology of *E. coli* cells.

a1, a2 — without using picloxydine dihydrochloride; with picloxydine dihydrochloride: b1, b2 — 500 μg/ml for 15 minutes; b3, b4 — 31.25 μg/ml for 60 minutes.

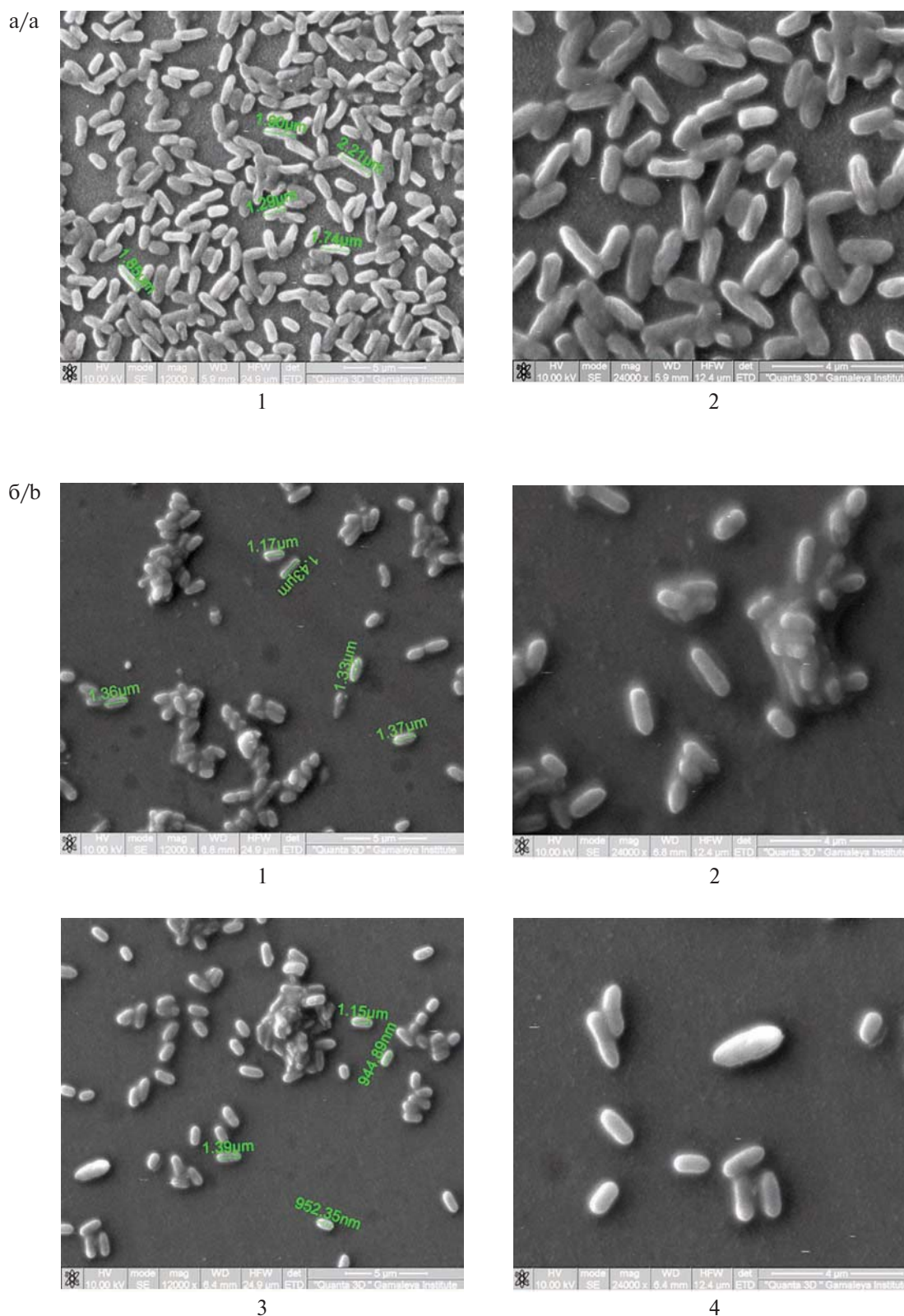


Рис. 3. Результат сканирующей электронной микроскопии. Морфология клеток *P. aeruginosa*.

a1, a2 — без воздействия пиклоксидина дигидрохлорида; при воздействии пиклоксидина дигидрохлорида: б1, б2 — 500 мкг/мл 15 мин; б3, б4 — 31,25 мкг/мл 60 мин.

Fig. 3. Results of scanning electron microscopy. Morphology of *P. aeruginosa* cells.

a1, a2 — without using picloxidine dihydrochloride; with picloxidine dihydrochloride: b1, b2 — 500 μg/ml for 15 minutes; b3, b4 — 31.25 μg/ml for 60 minutes.

У клеток *P. aeruginosa*, которые инактивировали пиклоксидина дигидрохлоридом в концентрации 31,25 мкг/мл в течение 60 мин, наблюдали уменьшение длины клеток (**рис. 3**). При воздействии 500 мкг/мл пиклоксидина дигидрохлорида (неразведенные глазные капли) происходило слипание клеток, образование конгломератов клеток, погруженных в аморфное вещество.

Обсуждение

Бактерии-комменсалы глазной поверхности играют роль в поддержании гомеостаза, а нарушение микробиотоза (дисбиоз), вызванное каким-либо заболеванием или применением лекарственных средств (антисептиков, антибиотиков, противовоспалительных препаратов), может приводить к развитию воспалительной реакции.

Бактерии рода *Pseudomonas*, которые обычно не являются частью нормальной микрофлоры глаза, тем не менее обнаружены во многих исследованиях, даже в тех, в которых использовались строгие процедуры фильтрации, что подтверждает гипотезу о том, что глазная поверхность регулярно подвергается воздействию потенциально опасных микроорганизмов и должна им противостоять [40].

В настоящее время соблюдение строгих правил асептики и антисептики с применением местного антисептика повидон-йода является признанным методом профилактики эндофтальмита после внутриглазных хирургических вмешательств [29, 37]. Повидон-йод обладает следующими достоинствами: (1) отсутствием риска селекции устойчивых бактерий, (2) широким антимикробным спектром и (3) коротким сроком реализации бактерицидного эффекта [28]. Повидон-йод проявляет бактерицидный эффект в течение 15–120 с, в то время как для достижения такого же эффекта антибактериальным глазным каплям с антибиотиками требуется 15–60 мин [41]. Хлоргексидин, катионный антисептик из группы бигуанидов, также успешно зарекомендовал себя как средство для стерилизации глазной поверхности при проведении операций. Однако в исследовании, проведенном К.Г. Косяковой и соавт., установлен высокий уровень устойчивости грамотрицательных бактерий к хлоргексидину (МИК₉₀ от 16 мг/л до 256 мг/л) [42]. В тестах *in vitro* мы показали высокую бактерицидную активность другого бигуанида, пиклоксидина дигидрохлорида, в отношении конъюнктивальных изолятов стафилококков при концентрациях 15,6–31,2 мкг/мл, близких к таковым для хлоргексидина. В этих концентрациях пиклоксидина дигидрохлорид обладает деструктивным свойством в отношении поверхностных структур КНС, преобладающих в микробиоме глаза [2].

В данном исследовании мы установили, что чувствительность *E. coli* к антисептику выше по сравнению с *P. aeruginosa*, однако при воздействии препарата в концентрации 500 мкг/мл (в составе глазных капель)

в течение 15 мин происходила полная гибель обеих бактерий. При сравнении с результатами, полученными в аналогичном исследовании грамположительной флоры [2], чувствительность грамотрицательной флоры к пиклоксидина дигидрохлориду оказалась ниже, чем у грамположительных стафилококков. Бактерицидный эффект пиклоксидина дигидрохлорида по отношению к *P. aeruginosa* достигался только при воздействии полной концентрации препарата в глазных каплях.

Клеточные стенки являются первой линией защиты бактерий от действия различных биоцидов. У грамотрицательных видов клеточные стенки содержат наружную мембрану — асимметричный бислой, внешний листок которого построен преимущественно из липополисахаридов. Как показано для *P. aeruginosa*, снижение общей проницаемости наружной мембраны является одним из механизмов выработки перекрестной резистентности к антимикробным агентам [43]. В то же время отрицательный заряд клеточных стенок бактерий способствует электростатическому связыванию положительно заряженных молекул биоцидов, например антисептиков из группы бигуанидов. Как показано в данном исследовании, в присутствии 10–500 мкг/мл пиклоксидина дигидрохлорида происходит нейтрализация отрицательного дзета-потенциала *E. coli*, а при 500 мкг/мл — *P. aeruginosa*. Уменьшение заряда поверхности бактериальных клеток приводит к их слипанию, что мы наблюдали у обоих видов бактерий при обработке пиклоксидина дигидрохлоридом.

Для хлоргексидина показано, что молекулы этого бигуанида быстро, в течение 20 с, поглощаются клетками бактерий, преодолевают (вероятно, путем пассивной диффузии) клеточную стенку и наружную мембрану, атакуя цитоплазматическую мембрану [44]. Последняя является основной мишенью бигуанидов [44–47], в то время как повреждения наружной мембраны, как предполагалось, не критичны и не вызывают лизиса клеток [44]. Действительно, мы не наблюдали видимых нарушений целостности клеточных стенок у инактивированных пиклоксидина дигидрохлоридом клеток *P. aeruginosa* (**см. рис. 3**). У некоторых клеток *E. coli*, обработанных пиклоксидина дигидрохлоридом в концентрации 500 мкг/мл в течение 15 мин, обнаруживались повреждения клеточных стенок в виде пор и разрывов на полюсах, которые особенно ярко проявлялись при длительных, до 60 мин, сроках обработки пиклоксидина дигидрохлоридом даже в сниженной до 31,25 мкг/мл концентрации (**см. рис. 2**). Катионные антисептики хлоргексидин и пиклоксидина дигидрохлорид связываются с содержащей отрицательно заряженные липиды цитоплазматической мембраной бактерий за счет электростатических сил. Методами молекулярного моделирования нами показано, что при действующих концентрациях антисептиков, соответствующих соотношению с липидами 1:4, 1:8 и 1:24, молекулы антисептиков полностью адсорбируются на мембране,

принимая форму скобы, при этом их незаряженные участки ориентированы в сторону гидрофобной части бислоя, а положительно заряженные группы колокализированы с отрицательно заряженными фосфатными группами липидов на поверхности мембраны. Внедрение молекул антисептиков вызывало локальные флуктуации толщины мембраны, подвижности липидов, снижало порог электропорации бактериальных мембран [48]. На снимках, полученных в настоящей работе при исследовании морфологии клеток с помощью сканирующей электронной микроскопии, видно, что инактивированные пиклоксидина дигидрохлоридом клетки *P. aeruginosa* окружены аморфным веществом, что, очевидно, отражает выход содержимого клеток через разорванную цитоплазматическую мембрану.

Заключение

В данном исследовании *in vitro* впервые исследованы эффективность и механизм бактерицидного действия антисептика пиклоксидина дигидрохлорида в отношении грамотрицательных конъюнктивальных изолятов. Результаты исследования позволяют

сделать вывод о достаточно высоком бактерицидном потенциале антисептика. Это открывает перспективу использования данного антисептика как альтернативы частому профилактическому использованию местных антибактериальных средств без риска выработки лекарственной устойчивости микрофлоры глазной поверхности, в частности при проведении ежемесячных курсов интравитреальных инъекций.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования: Будзинская М.В., Страховская М.Г., Халатян А.С., Жуховицкий В.Г., Шевлягина Н.В.

Сбор и обработка материала: Халатян А.С., Страховская М.Г., Холина Е.Г., Шевлягина Н.В.

Статистический анализ данных: Страховская М.Г., Халатян А.С.

Написание текста: Халатян А.С., Страховская М.Г.

Редактирование: Будзинская М.В., Страховская М.Г., Жуховицкий В.Г.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Будзинская М.В., Страховская М.Г., Андреева И.В., Халатян А.С. Микрофлора конъюнктивы и ее чувствительность к антибиотикам у пациентов после многократных интравитреальных инъекций. *Вестник офтальмологии*. 2019;135(5-2):135-141. Budzinskaya MV, Strakhovskaya MG, Andreeva IV, Khalatyan AS. Conjunctival microflora and its antibiotic sensitivity after serial intravitreal injections. *Vestnik oftal'mologii*. 2019;135(5-2):135-141. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/oftalma2019135052135>
2. Халатян А.С., Будзинская М.В., Холина Е.Г., Страховская М.Г., Колышкина Н.А., Коваленко И.Б., Жуховицкий В.Г. Чувствительность антибиотикорезистентных коагулазонегативных стафилококков к антисептику пиклоксидину. *Клиническая практика*. 2020;11(1):42-48. Khalatyan AS, Budzinskaya MV, Kholina EG, Strakhovskaya MG, Kolyshkina NA, Kovalenko IB, Zhukhovitsky VG. Sensitivity of antibiotic resistant coagulase-negative staphylococci to antiseptic picloxydin. *Klinicheskaya praktika*. 2020;11(1):42-48. (In Russ.). <https://doi.org/10.17816/clinpract17543>
3. Budzinskaya MV, Khalatyan AS, Strakhovskaya MG, Zhukhovitsky VG. Ocular flora in patients undergoing intravitreal injections: antibiotic resistance patterns and susceptibility to antiseptic picloxydin. *International Journal of Ophthalmology*. 2020;13(1):85-92. <https://doi.org/10.18240/ijo.2020.01.13>
4. Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, Richter SS, Gilligan PH, Thomson RB Jr, Bourbeau P, Carroll KC, Kehl SC, Dunne WM, Robinson-Dunn B, Schwartzman JD, Chapin KC, Snyder JW, Forbes BA, Patel R, Rosenblatt JE, Pritt BS. A guide to utilization of the microbiology Laboratory for Diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM). *Clinical Infectious Diseases*. 2013;57(4):22-121. <https://doi.org/10.1093/cid/cit278>
5. Harbarth S, Samore MH. Antimicrobial resistance determinants and future control. *Emerging Infectious Diseases*. 2005;11(6):798-801. <https://doi.org/10.3201/eid1106.050167>
6. Shimizu Y, Toshida H, Honda R, Ohta T, Asada Y, Murakami A. Prevalence of drug resistance and culture-positive rate among microorganisms isolated from patients with ocular infections over a 4-year period. *Clinical Ophthalmology*. 2013;7:695-702. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S43323>
7. Jayahar Bharathi M, Ramakrishnan R, Ramesh S, Murugan N. Extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance among bacterial isolates recovered from ocular infections. *Ophthalmic Research*. 2012;47(1):52-56. <https://doi.org/10.1159/000322807>
8. Summaiya M, Neeta K, Sangita R. Ocular infections: rational approach to antibiotic therapy. *National Journal of Medical Research*. 2012;2(1):22-24.
9. Subedi D, Vijay AK, Willcox M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. *Clinical and Experimental Optometry*. 2018;101(2):162-171. <https://doi.org/10.1111/cxo.12621>
10. Willcox MD. Review of resistance of ocular isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and staphylococci from keratitis to ciprofloxacin, gentamicin and cephalosporins. *Clinical and Experimental Optometry*. 2011;94(2):161-168. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2010.00536.x>
11. Abidi SH, Sherwani SK, Siddiqui TR, Bashir A, Kazmi SU. Drug resistance profile and biofilm forming potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contact lenses in Karachi-Pakistan. *BMC Ophthalmology*. 2013;13:57. <https://doi.org/10.1186/1471-2415-13-57>
12. Mohammadinia M, Rahmani S, Eslami G, Ghassemi-Broumand M, Aghazadeh Amiri M, Aghaie G, Tabatabaee SM, Taheri S, Behgozin A. Contact lens disinfecting solutions antibacterial efficacy: comparison between clinical isolates and the standard ISO ATCC strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Eye*. 2012;26(2):327-330. <https://doi.org/10.1038/eye.2011.284>
13. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases*. 2002;34(5):634-640. <https://doi.org/10.1086/338782>
14. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*. 2010;74(4):621-641. <https://doi.org/10.1128/mmb.00027-10>
15. Conway T, Cohen PS. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* metabolism in the gut. *Microbiology Spectrum*. 2015;3(3):10. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mbp-0006-2014>
16. Sherwal BL, Verma AK. Epidemiology of ocular infection due to bacteria and fungus — a prospective study. *JK Science: Journal of Medical Education and Research*. 2008;10(3):127-131.
17. Gopinathan U, Sharma S, Garg P, Rao GN. Review of epidemiological features, microbiological diagnosis and treatment outcome of microbial keratitis: experience of over a decade. *Indian Journal of Ophthalmology*. 2009;57(4):273-279. <https://doi.org/10.4103/0301-4738.53051>

18. Callegan MC, Engelbert M, Parke DW, Jet BD, Gilmore MS. Bacterial endophthalmitis: epidemiology, therapeutics, and bacterium-host interactions. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002;15(1):111-124. <https://doi.org/10.1128/cmr.15.1.111-124.2002>
19. Jindal A, Pathengay A, Mithal K, Jalali S, Mathai A, Pappuru RR, Narayanan R, Chhablani J, Motukupally SR, Sharma S, Das T, Flynn HW. Endophthalmitis after open globe injuries: changes in microbiological spectrum and isolate susceptibility patterns over 14 years. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*. 2014;4(1):5. <https://doi.org/10.1186/1869-5760-4-5>
20. Murthy TA, Rangappa P, Rao S, Rao K. ESBL *E. coli* urosepsis resulting in endogenous panophthalmitis requiring evisceration of the eye in a diabetic patient. *Case Reports in Infectious Diseases*. 2015;2015:4. <https://doi.org/10.1155/2015/897245>
21. Stratton M, Capitenca C, Christensen L, Paciu-Baja M. *Escherichia coli* eyelid abscess in a patient with alcoholic cirrhosis. *Case Reports in Ophthalmological Medicine*. 2015;2015:2. <https://doi.org/10.1155/2015/827609>
22. Sharma S. Diagnosis of infectious diseases of the eye. *Eye*. 2012;26(2):177-184. <https://doi.org/10.1038/eye.2011.275>
23. Mishra SK, Basakala P, Basakala O, Parajuli K, Pokhrel BM, Rijal BP. Detection of biofilm production and antibiotic resistance pattern in clinical isolates from indwelling medical devices. *Current Microbiology*. 2015;70(1):128-134. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0694-5>
24. Jassim SH, Sivaraman KR, Jimenez JC, Jaboori AH, Federle MJ, de la Cruz J, Cortina MS. Bacteria colonizing the ocular surface in eyes with boston type 1 keratoprosthesis: analysis of biofilm-forming capability and vancomycin tolerance. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2015;56(8):4689-4696. <https://doi.org/10.1167/iov.15-17101>
25. Hoyle BD, Wong CK, Costerton JW. Disparate efficacy of tobramycin on Ca(2+)-, Mg(2+), and HEPES-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Canadian Journal of Microbiology*. 1992;38(11):1214-1218. <https://doi.org/10.1139/m92-201>
26. Elder MJ, Stapleton F, Evans E, Dart JK. Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye*. 1995;9(1):102-109. <https://doi.org/10.1038/eye.1995.16>
27. Katiyar R, Vishwakarma A, Kaistha SD. Analysis of biofilm formation and antibiotic resistance of microbial isolates from intraocular lens following conventional extracapsular cataract surgery. *International Journal of Research of Pure and Applied Microbiology*. 2012;2(2):20-24.
28. Tanaka K, Shimada H, Mori R, Nakashizuka H, Hattori T, Okubo Y. No increase in incidence of post-intravitreal injection endophthalmitis without topical antibiotics: a prospective study. *Japanese Journal of Ophthalmology*. 2019;63(5):396-401. <https://doi.org/10.1007/s10384-019-00684-5>
29. Costello P, Bakri SJ, Beer PM, Singh RJ, Falk NS, Peters GB, Melendez JA. Vitreous penetration of topical moxifloxacin and gatifloxacin in humans. *Retina*. 2006;26(2):191-195. <https://doi.org/10.1097/00006982-200602000-00012>
30. Menchini F, Toneatto G, Miele A, Donati S, Lanzetta P, Virgili G. Antibiotic prophylaxis for preventing endophthalmitis after intravitreal injection: a systematic review. *Eye*. 2018;32(9):1423-1431. <https://doi.org/10.1038/s41433-018-0138-8>
31. Li AL, Wykoff CC, Wang R, Chen E, Benz MS, Fish RH, Wong TP, Major JC Jr, Brown DM, Scheffer AC, Kim RY, O'Malley RE. Endophthalmitis after intravitreal injection: role of prophylactic topical ophthalmic antibiotics. *Retina*. 2016;36(7):1349-1356. <https://doi.org/10.1097/iae.0000000000000901>
32. Storey P, Dollin M, Pitcher J, Reddy S, Vojtko J, Vander J, Hsu J, Garg SJ; Post-Injection Endophthalmitis Study Team. The role of topical antibiotic prophylaxis to prevent endophthalmitis after intravitreal injection. *Ophthalmology*. 2014;121(1):283-289. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.08.037>
33. Kim SJ, Toma HS. Antimicrobial resistance and ophthalmic antibiotics: 1-year results of a longitudinal controlled study of patients undergoing intravitreal injections. *Archives of Ophthalmology*. 2011;129(9):1180-1188. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2010.12.014>
34. Moss JM, Sanislo SR, Ta CN. A prospective randomized evaluation of topical gatifloxacin on conjunctival flora in patients undergoing intravitreal injections. *Ophthalmology*. 2009;116(8):1498-1501. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2009.02.024>
35. Milder E, Vander J, Shah C, Garg S. Changes in antibiotic resistance patterns of conjunctival flora due to repeated use of topical antibiotics after intravitreal injection. *Ophthalmology*. 2012;119(7):1420-1424. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.01.016>
36. Cheung CS, Wong AW, Lui A, Kertes PJ, Devenyi RG, Lam WC. Incidence of endophthalmitis and use of antibiotic prophylaxis after intravitreal injections. *Ophthalmology*. 2012;119(8):1609-1614. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.02.014>
37. Shimada H, Hattori T, Mori R, Nakashizuka H, Fujita K, Yuzawa M. Minimizing the endophthalmitis rate following intravitreal injections using 0.25% povidone-iodine irrigation and surgical mask. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2013;251(8):1885-1890. <https://doi.org/10.1007/s00417-013-2274-y>
38. Merani R, McPherson ZE, Luckie AP, Gilhotra JS, Runciman J, Durkin S, Muecke J, Donaldson M, Aralar A, Rao A, Davies PE. Aqueous chlorhexidine for intravitreal injection antisepsis: a case series and review of the literature. *Ophthalmology*. 2016;123(12):2588-2594. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.01.032>
39. Gili NJ, Noren T, Törnquist E, Crafoord S, Bäckman A. Preoperative preparation of eye with chlorhexidine solution significantly reduces bacterial load prior to 23-gauge vitrectomy in Swedish health care. *BMC Ophthalmology*. 2018;18(1):167. <https://doi.org/10.1186/s12886-018-0844-9>
40. Ozkan J, Willcox MD. The Ocular Microbiome: Molecular Characterization of a Unique and Low Microbial Environment. *Current Eye Research*. 2019;44(7):685-694. <https://doi.org/10.1080/02713683.2019.1570526>
41. Hyon JY, Eser I, O'Brien TP. Kill rates of preserved and preservative-free topical 8-methoxy fluoroquinolones against various strains of *Staphylococcus*. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. 2009;35(9):1609-1613. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2009.04.036>
42. Косякова К.Г., Эсауленко Н.Б., Каменева О.А. Казаков С.П., Дубинина А.Ю., Мезина Е.Ю., Зайцев А.А. Распространенность генов карбапенемаз, qacE, qacED1 и cepA у многократно-резистентных грамотрицательных бактерий с различной чувствительностью к хлоргексидину. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2020;19(5):49-60. Kosyakova KG, Esaulenko NB, Kameneva OA, Kazakov SP, Dubinina AY, Mezina EYu, Zaitsev AA. Prevalence of Carbapenemase Genes, qacE, qacED1 and cepA in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria with Different Susceptibility to Chlorhexidine. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2020;19(5):49-60. (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-5-49-60>
43. Loughlin MF, Jones MV, Lambert PA. *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002;49(4):631-639. <https://doi.org/10.1093/jac/49.4.631>
44. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999;12(1):147-179. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.1.147>
45. Denyer SP. Mechanisms of action of antibacterial biocides. *International Biodegradation Biodegradation*. 1995;36:227-245. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(96\)00015-7](https://doi.org/10.1016/0964-8305(96)00015-7)
46. Sheppard FC, Mason DJ, Bloomfield SF, Gant VA. Flow cytometric analysis of chlorhexidine action. *FEMS Microbiology Letters*. 1997;154(2):283-288. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12657.x>
47. Chawner J, Gilbert P. Interaction of the bisbiguanides chlorhexidine and alexidine with phospholipid vesicles: evidence for separate modes of action. *The Journal of Applied Bacteriology*. 1989;66(3):253-258. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb02476.x>
48. Kholina EG, Kovalenko IB, Bozdaganyan ME, Strakhovskaya MG, Orekhov PS. Cationic Antiseptics Facilitate Pore Formation in Model Bacterial Membranes. *The Journal of Physical Chemistry*. 2020;124(39):8593-8600. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c07212>

Поступила 30.03.2021

Received 30.03.2021

Принята к печати 20.05.2021

Accepted 20.05.2021