

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Винахід стосується композицій, що містять тіосірку, зокрема пропілпропантіосульфонат [PTSO, англ.: propyl-propane thiosulfonate) і пропілпропантіосульфінат PTS, англ.: propyl-propane-thiosulfinate]. Такі композиції корисні для лікування інфекції та зменшення або руйнування біоплівки як *in vivo*, так і *in vitro*. Зокрема, такі композиції корисні для лікування розладів, пов'язаних з біоплівкою, включаючи мастит, пальцевий дерматит і хронічні ранові інфекції, але не обмежуючись цим.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Стан здоров'я вимені відіграє важливу роль для молочних тварин як з точки зору здоров'я та благополуччя, так і з точки зору економіки. Інфекція молочних залоз молочних тварин, таких як корови, відома як мастит, має значний економічний вплив на молочні ферми в усьому світі. Загальні глобальні втрати на рік оцінюють в чотири-п'ять мільярдів євро. При маститі у молочних тварин вим'я не здатне забезпечити ефективну захисну реакцію на вторгнення мікроорганізмів. Відомо, що кілька факторів порушують баланс на рівні вимені, що може поставити під загрозу здатність молочної тварини знищувати мікроорганізми, що викликають мастит. Отже, механізми відповіді господаря можуть бути не здатними забезпечити ефективну захисну відповідь для усунення вторгнення патогенів, що призводить до бактеріальної колонізації вимені та початку клінічного або субклінічного маститу.

З колонізацією бактерій і особливо з утворенням бактеріальних резервуарів у вимені молочної худоби, як правило, важко боротися, що призводить до хронічних інфекцій, які можуть зберігатися, незважаючи на певні стратегії лікування з антибіотиками або без них. Важливими факторами, пов'язаними з персистенцією бактеріальних інфекцій вимені у молочної худоби, є адгезія епітелію, утворення біоплівки та схильність бактерій до фагоцитозу.

Було застосовано кілька стратегій для боротьби з маститом або його запобіганню у молочних корів, таких як лікування антибіотиками та вакцинація, і це тільки деякі з них, а також для зменшення клінічних та економічних наслідків захворювання. Однак, більшість способів лікування та стратегій мають незначний ефект або зовсім не впливають на полегшення захворювання. Декілька причин можуть пояснити недостатню ефективність. По-перше, хоча ряд факторів вірулентності було запропоновано як потенційні антигени для однокомпонентних вакцин, експериментальні випробування показали, що індукція імунітету до окремих факторів недостатня для забезпечення надійного захисту від бактерій, що викликають мастит у молочних корів. По-друге, бактеріальні антигени мають низьку імуногенність і вимагають адекватного ад'юванту. По-третє, основною проблемою в боротьбі з маститом є ефективні антибіотики, здатні досягати бактеріальних пулів у вимені, наприклад, у результаті утворення біоплівки бактеріями.

Мікроорганізмам, таким як бактерії, не обов'язково потрібно утворювати біоплівку, але вони мають набагато кращі можливості для виживання в організмі хазяїна, якщо вони можуть прилипати, наприклад, до епітеліальних клітин. Адгезія - це активний процес, що включає серію прикріплень і від'єднань, що призводить до утворення біоплівки, що супроводжується значними генетичними та подальшими фізіологічними змінами в мікроорганізмах, що призводить, серед іншого, до втрати чутливості практично до всіх класів антибіотиків. Отже, лікування бактеріальних інфекцій вимені стає дедалі складнішим через появу та збільшення поширеності бактеріальних патогенів, стійких до антибіотиків. У деяких випадках низькі дози антибіотиків можуть навіть посилити утворення біоплівки, що свідчить про природний захисний механізм бактерій, щоб уникнути летального ефекту антибіотиків. Через цю складну та проблематичну ситуацію мастит залишається однією з найважливіших хвороб молочної худоби, незважаючи на прогрес, досягнутий у покращенні загального здоров'я вимені за останні роки.

Крім того, коли велику рогату худобу часто або постійно лікують антибіотиками, антибіотики та продукти розпаду також виявляються в гної. Гній, що містить антибіотики та продукти розпаду, розкидають по ґрунту. Показано, що наявність антибіотиків впливає на різноманітність бактерій у ґрунті. Це небажаний вплив на навколишнє середовище. Альтернативна композиція для лікування інфекцій великої рогатої худоби попередить поширення антибіотиків у навколишньому середовищі та відновлення мікробіому ґрунту.

Хоча опис бактеріальних біоплівок можна знайти в науковій літературі набагато раніше, значення біоплівок стало відомо в 1982 році, коли Костертон помітив, що *Staphylococcus aureus* утворив біоплівку на електроді кардіостимулятора. Подальші дослідження та клінічні спостереження показали, що бактеріальні біоплівки можна знайти на імплантатах і катетерах, протезах та інших імплантованих біоматеріалах. Ще більш актуальним було спостереження про те, що мікробні біоплівки можуть утворюватися також на біологічних поверхнях тканин людини та тварин, таких як слизова оболонка пародонту в ротовій порожнині (зубний наліт), носові пазухи (хронічний синусит), внутрішнє вухо (середній отит), кровоносні судини і серцеві клапани (ендокардит), альвеолярній поверхні (множинні захворювання легень) або жовчний та сечовий міхур.

Перший етап утворення біоплівки включає прикріплення клітин до поверхні. На другому етапі відбувається розмноження клітин, що супроводжується утворенням зрілих структур, які мають багато

шарів клітин. Також утворюється шар слизу, який додатково захищає бактерії. [Див., наприклад, Melchior et al. *Veterinary Journal* 2006 171:398-407]. Після досягнення критичної маси зовнішній шар клітин біоплівки може вивільнити "планктонні організми". Ці організми можуть далі колонізувати інші поверхні. Біоплівки можуть утворюватися на різноманітних поверхнях, у тому числі на живих тканинах, медичних пристроях, промислових або питних системах водопостачання або природних водних системах. Як буде зрозуміло фахівцю в даній галузі, не всі інфекції призводять до розвитку біоплівок.

Дослідження останніх 20 років показали, що утворенню колективної біоплівки сприяє бактеріальна комунікаційна система, яка позначається як відчуття кворуму [QS, англ.: quorum sensing]. QS виникає за допомогою малих хімічних молекул (так званих автоіндукторів, AI), які постійно виділяються бактеріями в навколишнє середовище. Ці сигнальні молекули (наприклад, олігопептиди (AIP) або N-ацетилглюкозамінлактози (AHL)) розпізнаються та контролюються за допомогою специфічних рецепторів іншими бактеріями по сусідству. Коли досягається певна щільність AI (кворум), бактеріальні клітини спільно змінюють експресію генів і або виробляють фактори вірулентності для атаки на клітини організму, або активують метаболічні шляхи для формування біоплівки на поверхні тканин. Утворення біоплівки включає утворення позаклітинного матриксу, що складається з великих полімерів, спочатку переважно полісахаридів, які після дозрівання стабілізуються білками та ліпідами, що призводить до утворення тривимірної структури.

Після того, як біоплівова інфекція була встановлена, її може бути дуже важко викоринити. Зрілі біоплівки періодично вивільняють планктонні клітини. Це може призвести до хронічних інфекцій з періодичними загостреннями. Хоча антибіотики або імунна відповідь господаря можуть усунути симптоми, спричинені планктонними клітинами, зрілі біоплівки можуть залишитися.

Мікробні клітини під захистом біоплівки часто більш стійкі до антибіотиків, а також до природних імунних реакцій організму. Сплячі бактерії є метаболічно неактивними і, отже, не експресують типові мішені багатьох антибіотиків, такі як білки синтезу компонентів стінки бактеріальної клітини (мішень для бета-лактамних антибіотиків, таких як пеніциліни, цефалоспорины та ванкоміцини) і швидкий білок (мішень для аміноглікозидів, тетрациклінів, макролідів і лінезоліду) і білки синтезу ДНК (фторхінолони та рифампіцини) або синтезу фолієвої кислоти (сульфонаміди, амінопіримідини (такі як триметоприм)). Таким чином, лише лікування антибіотиками, як правило, недостатньо для ліквідації біоплівокових інфекцій [див. також Wu et al. *Int J Oral Sci.* 2015 Mar; 7(1): 1-7]. Незважаючи на те, що антибіотики можуть бути ефективними проти диспергованих (планктонних) бактерій, у біоплівці важко досягти мінімальної концентрації антибіотика, необхідної для знищення мікроорганізмів у біоплівці. У різних експериментах *in vitro* було продемонстровано, що бактерії, що ростуть у біоплівці, у 10-1000 разів більш стійкі до різних антимікробних агентів порівняно з планктонними бактеріями того самого штаму [див., наприклад, Amorena et al. 1999 *J. Antimicrob. Chemother.* 44:43-55; Ceri et al., 1999 *J. Clin. Microbiol.* 37:1771-1776 та Olson et al., 2002 *Can. J. Vet. Res.* 66:86-92]. Olsen et al. розглядає пізні механізми індукованої біоплівокою резистентності та толерантності до антибіотиків [*Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015 34:877-886].

Про мастит великої рогатої худоби це повідомлялося в дослідженні з польовими штамами *Staphylococcus aureus* [Melchior, Gaastra & Fink-Gremmels, *J. Vet. Med.* 2006 53:326-332]. MIC₅₀, мінімальна бактеріальна концентрація (BMIC) і MBEC (мінімальна концентрація знищення біоплівки) були визначені для 7 штамів, виділених від інфікованих маститом корів. Протестовані антибіотики включали ті, які зазвичай використовують для лікування маститу великої рогатої худоби, такі як пеніцилін, амоксицилін, клоксацилін, цефалотин, цефоперазон, цефтріаксон, комбінація клоксацилін/пеніцилін, комбінація клоксацилін/пеніцилін, лінкоміцин, пірліміцин, тирозин, неоміцин, гентаміцин, триметоприм/сульфаметоксазол, флорфенікол і данофлосаксин. Для всіх досліджених антибіотиків різниця між MIC (планктонні бактерії) і MBEC (концентрації знищення біоплівки) відрізнялася більш ніж у 256 разів, а дуже часто більше ніж у 2048 разів.

Є також докази того, що антибіотики можуть стимулювати утворення біоплівки. Наприклад, деякі антибіотики (такі як тетрацикліни, хінопристин-дальфопристини та еритроміцин) можуть стимулювати експресію генів (наприклад, генів *ica*) у бактеріях, що сприяє прилипанню бактерій [Melchior et al., вище]. Цікаво, що було показано, що існує висока поширеність генів *ica* серед ізолятів маститу *S. aureus* [розглянуто у Melchior et al., вище]. Ці результати підтверджують гіпотезу про те, що інфекції молочної залози пов'язані з утворенням біоплівки.

Біоплівки також можуть містити сплячі бактерії. Біоплівки використовують низку механізмів для ухилення від імунної відповіді господаря, включаючи активацію регуляторів/супресорів, які впливають на активність імунних клітин і діють як фізичний бар'єр для імунних клітин [Gonzalez *Pathog Dis.* 2018 Apr; 76(3)], але можуть вийти зі стану спокою та стати активними. Загалом, імунна система діє лише проти активних бактерій, тому сплячі бактерії можуть уникнути імунної системи людини. Сплячі бактерії здатні від'єднатися від біоплівки та швидко стати активними та шкідливими для господаря.

Також відомо, що біоплівки, пов'язані з грибками, є більш стійкими до протигрибкових препаратів порівняно з планктонними клітинами [див., наприклад, Fanning and Mitchell *PLOS Pathog* 2012

8:e1002585 для огляду]. Відповідно, сполуки, що мають протимікробну дію, не завжди підходять для лікування або профілактики біоплівки.

У зрілій біоплівці перехід в стадія спокою відбувається за рахунок пригнічення (зсув генів) первинного метаболізму. Стан спокою включає в себе те, що біоплівкові бактерії майже повністю пригнічують експресію типових мішеней для антибіотиків, як то синтез білків і ДНК, і відновлення клітинної стінки. Отже, біоплівки за своєю природою нечутливі до антибіотиків і часто у 1000 разів стійкіші до них, ніж планктонні (вільно плаваючі) бактерії. Крім того, вища щільність клітин, виявлена в біоплівках, значно збільшує ймовірність горизонтального перенесення генів, що збільшує ймовірність появи штамів з підвищеною стійкістю або зміненими профілями вірулентності. Клінічним результатом є фенотипова стійкість до звичайних (навіть сучасних) антибіотиків.

У захисному середовищі такої біоплівки час виживання бактерій збільшується. Крім того, самостійно сконструйована інертна багата полісахаридами матриця не є імуногенною, захищаючи вбудовані в біоплівку бактерії від розпізнавання (через PAMPS - молекулярні патерни, пов'язані з патогенами) і поглинання імунними клітинами хазяїна.

Утворення біоплівок може мати серйозні негативні наслідки в медичних, промислових і природних умовах. Зокрема, інфекції, пов'язані з біоплівкою (тобто розлади, пов'язані з біоплівкою), є серйозною проблемою як для людей, так і для тварин. Такі розлади можуть характеризуватися хронічною запальною реакцією з рецидивуючими гострими епізодами та резистентністю до протимікробної терапії та/або захисних сил організму. Ранові біоплівки затримують відновлення тканин, що призводить до хронічних ран. Було припущено, що біоплівкові інфекції зараз становлять до 80 % усіх мікробних інфекцій людини [Bartell JA et al., 20 Evolutionary highways to persistent bacterial infection. Nature Communications (2019) 10:629 та Sharma et al. 2019 Antimicrobial Resistance and Infection Control 8:76]. Jamal et al. повідомили, що Національний інститут здоров'я зазначив, що 65 % мікробних інфекцій і 80 % хронічних інфекцій пов'язані з утворенням біоплівки [Journal of Chinese Medical Association 81:7-11]. Біоплівки та розлади, пов'язані з біоплівками, широко обговорюються в літературі; див., наприклад, [Sharma et al. 2019 Antimicrobial Resistance and Infection Control 8:76; Roy et al. 2018 Virulence 9:522-554 та Jamal et al. 2018 Journal of the Chinese Medical Association 81:7-11. Vestby et al.] зробили огляд бактеріальних біоплівок та їх ролі у захворюваннях [Antibiotics (Basel). 2020 Feb; 9(2): 59]. У 2014 році Європейське клінічне товариство мікробіології та інфекційних захворювань представило повний огляд біоплівкових інфекцій, див. також [David Lebeaux et al. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2014; doi:10.1128/MMBR.00013-14].

Наприклад, *Pseudomonas aeruginosa*, мікроорганізм, що викликає нозокоміальні інфекції, утворює біоплівки на таких різноманітних поверхнях, як муковісцидозна легенева тканина, контактні лінзи та лінії катетера. *P. aeruginosa*, що росте у вигляді біоплівки, також виявлена в хронічних ранах і може призвести до погіршення загоєння ран. Біоплівки, зокрема, біоплівки *P. aeruginosa*, також викликають хронічні інфекції при респіраторних захворюваннях, таких як бронхоектатична хвороба, хронічне обструктивне захворювання легень і хронічний риносинусит. Біоплівки, що утворюються на медичних пристроях, служать резервуаром бактерій, які можуть потрапляти в організм, що призводить до хронічної системної інфекції. *Candida albicans* (дріжджі) є найпоширенішою грибовою біоплівкою, яка зустрічається в лікарнях, але вона надзвичайно важко лікується та погано реагує на типове протигрибкове лікування.

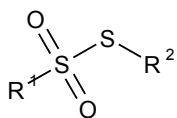
Перші дослідження утворення бактеріальної біоплівки були зосереджені на *Staphylococcus aureus* (грампозитивний) і *Pseudomonas aeruginosa* (грамнегативна) через їх участь у рецидивуючих маститах у молочної худоби та ускладнених ранових інфекціях. Крім того, утворення біоплівки *Streptococcus* ssp., патогенної для птахів *E. coli* (APEC) і біоплівки *C. jejuni* привернули увагу, оскільки ці види бактерій актуальні для охорони здоров'я. Згодом інші важливі патогени тварин, включаючи *Actinobacillus pleuropneumoniae* (важкі легеневі інфекції у свиней, які можуть призвести до летального результату), *Escherichia coli* (місцеві та системні інфекції та системна септицемія, яка часто є летальною для домашньої птиці), шкірні та кишкові захворювання у собак і котів та ранові інфекції та ендометрит у коней були визнані біоплівковими інфекціями. Цей список не є вичерпним, оскільки утворення біоплівки є загальною рисою майже всіх мікроорганізмів.

Відповідно, існує потреба в альтернативних способах лікування розладів, пов'язаних з біоплівкою.

КОРОТКИЙ ОПИС СУТІ ВІНАХОДУ

Винахід надає наступні переважні варіанти здійснення.

1. Сполука формули I

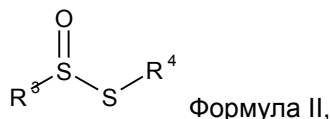


Формула I,

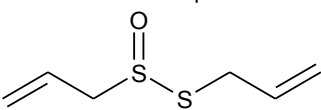
де R1 і R2 незалежно вибрані з необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкенілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкінілу, необов'язково заміщеного арилу, необов'язково заміщеного циклоалкілу, необов'язково заміщеного гетероциклоалкілу, або композиція, що містить сполуку формули I, переважно, де композиція по суті не містить діалітїосульфінат, для застосування в лікуванні розладу, пов'язаного з біоплівкою.

2. Сполука або композиція для застосування за варіантом здійснення 1, де сполука являє собою пропілпропантіосульфінат (PTSO).

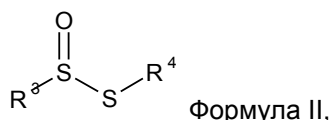
3. Сполука або композиція для застосування за варіантом здійснення 1, яка додатково містить сполуку для застосування формули II



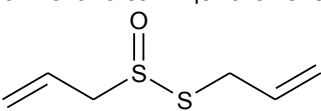
де R3 і R4 незалежно вибрані з необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкенілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкінілу, необов'язково заміщеного арилу, необов'язково заміщеного циклоалкілу, необов'язково заміщеного гетероциклоалкілу, при цьому формула II не являє собою

, переважно, де сполука формули II являє собою пропілпропантіосульфінат (PTS).

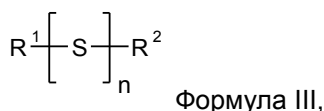
4. Сполука формули II



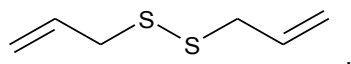
де R3 і R4 незалежно вибрані з необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкенілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкінілу, необов'язково заміщеного арилу, необов'язково заміщеного циклоалкілу, необов'язково заміщеного гетероциклоалкілу, при цьому формула II не являє собою

, переважно, де сполука являє собою пропілпропантіосульфінат (PTS), або композиція, що містить сполуку формули II, переважно, де композиція по суті не містить діалітїосульфінат, для застосування в лікуванні розладу, пов'язаного з біоплівкою.

5. Сполука або композиція для застосування за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, яка додатково містить сполуку, що має формулу III



де n дорівнює 1, 2 або 3 та R1 і R2 незалежно вибрані з необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкенілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкінілу, необов'язково заміщеного арилу, необов'язково заміщеного циклоалкілу, необов'язково заміщеного гетероциклоалкілу, при цьому формула III не являє собою



6. Сполука або композиція для застосування за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, де застосування додатково включає введення протимікробного агента, переважно вибраного з протигрибкового засобу або антибіотика.

7. Сполука або композиція для застосування за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, де застосування додатково включає введення протизапального агента.

8. Сполука або композиція для застосування за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, де лікування призначене для зменшення утворення або росту біоплівки та/або для руйнування або зменшення біоплівки.

9. Сполука або композиція для застосування за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, де розлад, пов'язаний з біоплівкою, являє собою хронічну та/або персистуючу інфекцію.

10. Сполука або композиція для застосування за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, де розлад, пов'язаний з біоплівкою, являє собою пальцевий дерматит або хронічну ранову інфекцію.

11. Сполука або композиція для застосування за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, де розлад, пов'язаний з біоплівкою, являє собою інфекцію молочної залози, переважно де розлад, пов'язаний з біоплівкою, являє собою мастит.

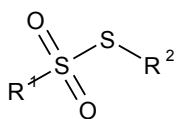
12. Сполука або композиція для застосування за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, де лікування призначене для ссавця.

13. Сполука або композиція для застосування за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, де лікування призначене для жуйних тварин, переважно корів.

14. Сполука або композиція для застосування за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, де композиція по суті не містить діалілтіосульфінат.

15. Сполука або композиція для застосування за будь-яким із попередніх варіантів здійснення, де біоплівка містить бактерії, дріжджі, гриби, мікрородорості або їх комбінацію.

16. Спосіб лікування розладу, пов'язаного з біоплівкою, у індивіда, де зазначений спосіб включає введення індивіду, який цього потребує, композиції, що містить сполуку формули I



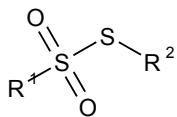
Формула I,

де R1 і R2 незалежно вибрані з необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкенілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкінілу, необов'язково заміщеного арилу, необов'язково заміщеного циклоалкілу, необов'язково заміщеного гетероциклоалкілу,

переважно, де сполука являє собою пропілпропантіосульфонат (PTSO),

де композиція по суті не містить діалілтіосульфінат.

17. Виріб, поверхня якого принаймні частково покрита композицією, що містить сполуку формули I



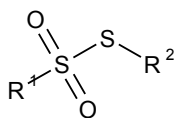
Формула I,

де R1 і R2 незалежно вибрані з необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкенілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкінілу, необов'язково заміщеного арилу, необов'язково заміщеного циклоалкілу, необов'язково заміщеного гетероциклоалкілу, де композиція по суті не містить діалілтіосульфінат, переважно, де виріб є продуктом для чищення, медичним пристроєм або хірургічним пристроєм.

18. Спосіб in vitro запобігання або зменшення утворення або росту біоплівки на поверхні або руйнування чи зменшення біоплівки на поверхні,

де зазначений спосіб включає застосування композиції до поверхні для запобігання або зменшення утворення або росту біоплівки на поверхні,

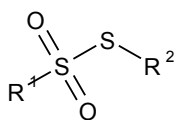
або для руйнування чи зменшення біоплівки на поверхні, де зазначена композиція містить сполуку формули I



Формула I,

де R1 і R2 незалежно вибрані з необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкенілу, необов'язково заміщеного лінійного

або розгалуженого алкінілу, необов'язково заміщеного арилу, необов'язково заміщеного циклоалкілу, необов'язково заміщеного гетероциклоалкілу, або де композиція по суті не містить діалітіосульфінат, 19. Композиція, що містить сполуку формули I



Формула I,

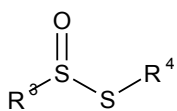
де R¹ і R² незалежно вибрані з необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкенілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкінілу, необов'язково заміщеного арилу, необов'язково заміщеного циклоалкілу, необов'язково заміщеного гетероциклоалкілу, де композиція по суті не містить діалітіосульфінат, і де композиція є фармацевтичною композицією або функціональним харчовим продуктом.

20. Виріб, спосіб або композиція за будь-яким із варіантів здійснення 16-19, де сполука являє собою PTSO.

21. Виріб, спосіб або композиція за будь-яким із варіантів здійснення 16-20, де композиція додатково містить протимікробний агент, переважно вибраний із протигрибкового засобу або антибіотика.

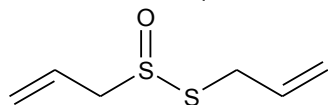
22. Виріб, спосіб або композиція за будь-яким із варіантів здійснення 16-21, де композиція додатково містить протизапальний агент.

23. Виріб, спосіб або композиція за будь-яким із варіантів здійснення 16-22, де композиція додатково містить сполуку формули II

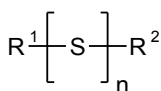


Формула II,

де R³ і R⁴ незалежно вибрані з необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкенілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкінілу, необов'язково заміщеного арилу, необов'язково заміщеного циклоалкілу, необов'язково заміщеного гетероциклоалкілу, при цьому формула II не являє собою

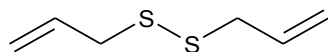


та/або композиція додатково містить сполуку формули III



Формула III,

де n дорівнює 1, 2 або 3 та R¹ і R² незалежно вибрані з необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкенілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкінілу, необов'язково заміщеного арилу, необов'язково заміщеного циклоалкілу, необов'язково заміщеного гетероциклоалкілу, при цьому формула III не являє собою



КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фіг. 1. Процедура, що використовується для вимірювання впливу QS1 і QS2 на знищення біоплівки під час вимірювань у лунках мікротитраційних планшетів. На Фіг. 1А показано спосіб, який використовують для вимірювання біоплівок у мікротитраційних планшетах, а на Фіг. 1В показано спосіб вимірювання утворення біоплівки на кілках.

Фіг. 2А. Вплив QS1 і QS2 на пізнє утворення біоплівки *P. aeruginosa* і *S. aureus* в умовах багатого середовища. Фіг. 2В. Вплив QS1 і QS2 на пізнє утворення біоплівки *P. aeruginosa* і *S. aureus* в умовах мінімального середовища. Фіг. зліва: вплив на пізнє утворення біоплівки в лунках; фіг. справа: вплив

на пізнє утворення біоплівки на кілках. Рівні значущості показані зірочками (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; ****: $P < 0,0001$).

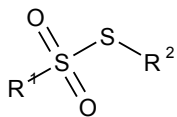
Фіг. 3 (А). Біоплівка, що виділяється безпосередньо з вимені після доїння; (В) біоплівка, отримана після просіювання молока після доїння корови з маститом, через один-три дні після лікування таблеткою PTSO/PTS.

Фіг. 4. Перебіг інфекції (прямі стрілки) і загоєння (пунктирні стрілки).

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВАРІАНТІВ ЗДІЙСНЕННЯ ВІНАХОДУ

Винахід надає сполуки, корисні для зменшення, руйнування та/або запобігання утворенню біоплівок. Несподівано було виявлено, що описані в даному документі сполуки руйнують біоплівки, що містять дуже гетерогенні мікробні популяції (див., наприклад, Приклад 2), а також біоплівки, що містять відомі патогени людини (див., наприклад, Приклади 3 і 4). Винахід також надає, що сполуки активні проти біоплівок не тільки *in vitro*, але також *in vivo*, і їх можна вводити як системно (наприклад, перорально), так і місцево (див., наприклад, Приклади 5-8).

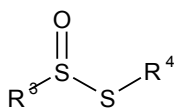
Винахід надає тіосульфат формули I



Формула I,

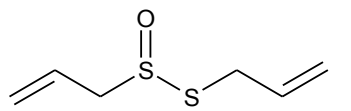
де R^1 і R^2 незалежно вибрані з необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкенілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкінілу, необов'язково заміщеного арилу, необов'язково заміщеного циклоалкілу, необов'язково заміщеного гетероциклоалкілу.

У деяких варіантах здійснення винахід надає тіосульфінат формули II

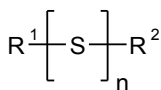


Формула II,

де R^3 і R^4 незалежно вибрані з необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкенілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкінілу, необов'язково заміщеного арилу, необов'язково заміщеного циклоалкілу, необов'язково заміщеного гетероциклоалкілу, при цьому формула II не являє собою



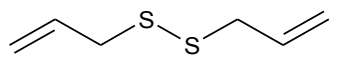
У деяких варіантах здійснення винахід надає сполуку, що має формулу III



Формула III,

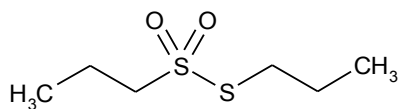
де n дорівнює 1, 2 або 3 та R^1 і R^2 незалежно вибрані з необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкенілу, необов'язково заміщеного лінійного або розгалуженого алкінілу, необов'язково заміщеного арилу, необов'язково заміщеного циклоалкілу, необов'язково заміщеного гетероциклоалкілу,

при цьому формула III не являє собою

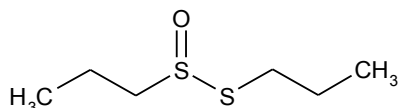


Сполуки, що мають формулу I, II або III, згадуються в даному документі як "сполуки", "терапевтичні сполуки" або "терапевтичні сполуки тіосірки". Сполуки включають солі формули I, II або III. Переважно, сполуки мають формулу I або формулу II. Сполуки, що мають формулу I або формулу II, можна

використовувати разом із сполуками, що мають формулу III. Більш переважно, сполука має формулу I. Переважно, сполука формули I являє собою пропілпропантиосульфат (PTSO). PTSO має структуру:



Переважає, сполука формули II являє собою пропілпропантиосуфінат (PTS). PTS має структуру:



Пропілпропантиосульфат (PTSO) і пропілпропантиосуфінат (PTS) є природними сполуками, які містяться в рослинах сімейства Allium. Наприклад, Allium sativum (часник), Allium sera (цибуля ріпчаста), Allium ampeloprasum (цибуля виноградна), Allium schoenoprasum (цибуля шніт) та Allium chinense (цибуля китайська). Сполуки можуть бути екстраговані з природного джерела або можуть бути отримані синтетичним шляхом. Обидві сполуки PTS і PTSO також комерційно доступні.

У деяких варіантах здійснення сполуки отримують із природних джерел, таких як рослини. Сполуки можна екстрагувати з рослинного матеріалу різними способами. Відповідний метод залежить від хімічних властивостей сполук. Наприклад, екстракцію можна починати з неполярного розчинника, а потім використовувати розчинники зі зростаючою полярністю. Крім того, сполуки з рослини можна екстрагувати спиртом. Такі екстракти можуть містити, наприклад, приблизно 80 % PTSO і приблизно 20 % PTS. У переважних варіантах здійснення композиції, описані в даному документі, містять PTSO та PTS у співвідношенні щонайменше 3:1, переважно приблизно 4:1 за масою. Не бажаючи бути зв'язаними теорією, винахід надає, що активність проти біоплівки в основному зумовлена PTSO.

Екстракти часнику раніше були описані для використання в дієтичних добавках. Часник - це трава, яку вирощують у всьому світі. Він пов'язаний з цибулею, цибулею виноградною і цибулею шніт. Екстракти часнику і особливо сполуки алліцину були вивчені на предмет їх потенціалу для лікування різних захворювань. Найчастіше їх використовують при станах, пов'язаних із серцем і кровоносною системою. Ці стани включають високий кров'яний тиск, високий рівень холестерину або інших жирів у крові та ущільнення артерій.

Наприклад, Garlicon - це таблетка, що містить екстракт часнику. Він описується як часниковий порошок, висушений при контрольованій температурі, у спеціальній лікарській формі, а саме таблетках, вкритих кишковорозчинною оболонкою. Це покриття захищає таблетку під час проходження через шлунок і розчиняється в тонкій кишці, вивільняючи вміст. Garlicon представлений як захист від ризику високого рівня холестерину в сироватці крові та серцевих захворювань. Крім того, EP 2110128 розкриває використання отриманих з Alliaceae сполук як природної добавки до корму для тварин як альтернативи антибіотикам.

На відміну від екстрактів часнику, які містять велику кількість різних сполук, де PTSO є другорядним компонентом, композиції, представлені в даному документі, переважно містять PTSO у вищій концентрації, ніж природні екстракти часнику. Крім того, хоча природні екстракти часнику містять велику кількість різних речовин, кожна з яких має різний (іноді небажаний) ефект, представлені в даному документі композиції є корисними для забезпечення PTSO без будь-яких небажаних побічних ефектів інших компонентів екстракту часнику. Крім того, композиції, збагачені PTSO, допускають більш високі дозування.

Наприклад, екстракт часнику має сильний запах. Коли тваринам дають такі екстракти часнику, ці запахи також виявляються в продуктах тваринного походження, таких як молоко та яйця. Споживачі сприймають продукти, що мають ці запахи, як зіпсовані, і такі запахи також можуть впливати на смак таких продуктів. На практиці продукти тваринного походження, зібрані під час використання екстракту часнику, як правило, потрібно утилізувати. Вживання екстракту часнику людьми може призвести до появи запаху тіла та неприємного запаху з рота.

Навпаки, терапевтичні сполуки, описані в даному документі, переважно не мають негативних ефектів екстракту часнику, описаних вище. Наприклад, для сільськогосподарських тварин це мало велику комерційну перевагу, оскільки отримані продукти тваринного походження (такі як молоко та яйця) були придатними для споживачів. У деяких варіантах здійснення винахід пропонує способи, що включають введення індивіду, який цього потребує, композиції, як описано в цьому документі, де зазначене лікування не призводить до запаху тіла, неприємного запаху з рота, наявності ненормальних запахів у рідинах організму (таких як молоко) або, у випадку з птахами, не викликає ненормального запаху яєць або, щонайменше, меншою мірою, ніж екстракт часнику.

Винахід пропонує композиції, що містять сполуки, як описано в цьому документі, зокрема композиції, що містять сполуки формули I та/або сполуки формули II. Переважно такі композиції по суті не містять діалілтіосульфінат. Діалілтіосульфінат більш відомий під назвою аліцин. Аліцин є сіркоорганічною сполукою. Коли свіжий часник нарізають або подрібнюють, фермент аліїназа перетворює аліін в аліцин, який відповідає за аромат свіжого часнику. Утворений аліцин є нестабільним і швидко перетворюється на серію інших сірковмісних сполук, таких як діалілдисульфід. Один зубчик часнику містить від 5 до 18 мг аліцину.

Як використовується в цьому документі, "по суті вільний" стосується композицій, що містять менше 5 мас. % діалілтіосульфінату. У деяких варіантах здійснення композиції містять менше 1 мас. % діалілтіосульфінату, переважно менше 0,5 мас. % діалілтіосульфінату. У деяких варіантах здійснення композиція містить терапевтичні сполуки тіосірки (наприклад, PTSO та PTS) у масовому співвідношенні до діалілтіосульфінату щонайменше 10:1, більш переважно щонайменше 100:1.

Композиції за даним винаходом також переважно по суті не містять діалілдисульфиду. У деяких варіантах здійснення композиції містять менше 1 мас. % діалілтіосульфінату, переважно менше 0,5 мас. % діалілтіосульфінату. У деяких варіантах здійснення композиція містить сполуку формули I та/або формули II (наприклад, PTSO та PTS) у масовому співвідношенні до діалілдисульфиду щонайменше 10:1, більш переважно щонайменше 100:1.

У деяких варіантах здійснення пропонують композиції, у яких щонайменше 50 %, переважно щонайменше 90 % за масою активних інгредієнтів є сполуками за формулою I, II або III, як описано в цьому документі. У деяких варіантах здійснення пропонують композиції, у яких єдиними активними інгредієнтами є сполуки за формулою I, II або III, необов'язково включаючи додаткові протимікробні агенти та/або протизапальні агенти. У деяких варіантах здійснення пропонують композиції, у яких щонайменше 50 %, переважно щонайменше 90 % за масою активних інгредієнтів є сполуками за формулою I або II, як описано в цьому документі. У деяких варіантах здійснення пропонують композиції, у яких єдиними активними інгредієнтами є сполуки за формулою I або II, необов'язково включаючи додаткові протимікробні агенти та/або протизапальні агенти.

Сполуки, описані в цьому документі, і композиції, що їх містять, корисні для лікування або профілактики інфекції. Наприклад, конкретне використання для лікування або профілактики респіраторної інфекції, кишкової інфекції, інфекції молочної залози, інфекції вимені, інфекції шкіри, інфекції сечового міхура, інфекції вуха, системної інфекції, інфекції суглобів, інфекції мозку.

Використовуваний в даному документі термін "інфекція" стосується, наприклад, патогенних інфекцій, які можуть призвести до захворювання. Зокрема, такими інфекціями є бактеріальні або грибові інфекції. У кращому варіанті здійснення інфекція є бактеріальною інфекцією. Бактерії та грибки зустрічаються майже скрізь і існують у дуже різноманітних формах. Більшість з них не є шкідливими і насправді незамінні для життя на землі та необхідні для здоров'я рослин, тварин і людини. Наприклад, мікробіом у кишківнику людей і тварин, де бактерії та грибки живуть як симбіонти зі своїм господарем, є так званою кишковою флорою. Крім того, на шкірі природно присутні бактерії, які є частиною імунної системи. Іншим прикладом є біологія ґрунту, яка здебільшого складається з бактерій і грибків. Деякі бактерії та грибки можуть викликати патогенні інфекції, наприклад у тварин або людини. Ці патологічні інфекції можуть призвести до захворювання та хвороби інфікованої особи.

Використовуваний в даному документі термін "лікування інфекції" означає зменшення тяжкості та/або тривалості інфекції, та/або зменшення тяжкості та/або тривалості симптомів інфекції. Переважно, зазначене лікування призводить до відновлення здоров'я індивіда. Бажано, щоб індивід мав менше симптомів захворювання або протягом більш короткого часу. Як використовується в даному документі, "профілактика інфекції" стосується запобігання або альтернативного відстрочення початку інфекції або одного чи кількох симптомів, пов'язаних з інфекцією.

Деякі мікроорганізми, такі як бактерії, мікроводорості, грибки, тощо, можуть утворювати біоплівки. Сполуки, описані в цьому документі, також корисні для запобігання або зменшення утворення або росту біоплівки, та/або для руйнування або зменшення біоплівки. Переважно, сполуки та композиції, що їх містять, є корисними для лікування або профілактики розладів, пов'язаних з біоплівкою.

Термін біоплівка спочатку використовувався в технічній та екологічній мікробіології для опису спільноти "сидячих" бактерій та інших мікроорганізмів, прикріплених до природних або штучних поверхонь. Утворення мікробної біоплівки ініціюється колонізацією бактерій на поверхні, до якої вони прикріплюються та утворюють слизову плівку, що складається з органічних полімерів. Ця первинна бактеріальна плівка приваблює інші мікроорганізми, такі як водорості та найпростіші, грибки та найпростіші, що призводить до утворення видимої багатовидової біоплівки. Такі тривимірні біоплівки є всюдишними в природі і знаходяться на всіх поверхнях, які контактують з водою. Проблема охорони здоров'я викликають мікробні біоплівки в муніципальних системах водопостачання та побутових водопровідних трубопроводах і пристроях. Ефективність сполук формули I, II та III щодо таких багатовидових біоплівок навколишнього середовища продемонстрована в прикладах 2 та 3.

Використовуваний в даному документі термін "біоплівка" стосується популяції мікроорганізмів, які сконцентровані на межі розділу (зазвичай тверда речовина/рідина) і зазвичай оточені позаклітинною

полімерною слизовою матрицею. Біоплівки можуть утворюватися на живих або неживих поверхнях і зустрічаються в природних, промислових і лікарняних умовах. Біоплівки можуть містити багато різних типів мікроорганізмів, наприклад, бактерії, археї, найпростіші, грибки та водорості. Переважно такі біоплівки містять бактерії, мікроводорості (такі як *Prototheca* spp.) або грибки.

Як використовується в цьому документі, "лікування розладу, пов'язаного з біоплівкою", також згадується тут як "розлад, пов'язаний з біоплівкою", відноситься до зменшення тяжкості та/або тривалості розладу, та/або зменшення тяжкості та/або тривалості симптомів розладу, зокрема симптомів інфекції. Переважно, зазначене лікування призводить до відновлення здоров'я індивіда. Бажано, щоб індивід мав менше симптомів захворювання або протягом більш короткого часу.

Як використовується в даному документі, "запобігання або зменшення утворення або росту біоплівки" стосується запобігання, затримки або зменшення утворення або росту біоплівки. Як буде зрозуміло фахівцю в даній галузі, таке зменшення утворення або росту біоплівки може уповільнити ріст біоплівки порівняно з ростом необроблених біоплівок. Переважно, композиції корисні для зменшення утворення або росту біоплівки. Як використовується в цьому документі, "руйнування або зменшення біоплівок" стосується часткового або повного видалення біоплівки. Як буде зрозуміло фахівцю в даній галузі, після такої обробки планктонні бактерії все ще можуть бути присутніми.

Сполуки, описані в цьому документі, можуть бути здатними порушувати структуру біоплівки, наприклад, позаклітинного слизового матриксу. У деяких варіантах здійснення сполуки корисні для інгібування клітинної адгезії. Зокрема, сполуки можуть запобігати адгезії (без знищення бактерій) до статичної або живої поверхні всіх типів клітин, які зустрічаються в мікробних біоплівках, зокрема вільно живучих мікробів.

Не бажаючи бути зв'язаними теорією, даний винахід пропонує, що терапевтичні сполуки, описані в даному документі, можуть проявляти частину своїх ефектів, впливаючи на відчуття кворуму. Передача сигналів відчуття кворуму (QS) відіграє важливу роль у контролі, наприклад, експресії факторів вірулентності бактерій. QS передбачає накопичення сигнальних молекул у навколишньому середовищі, що дозволяє одній клітині відчувати щільність кількості бактерій і сигнальних молекул, а отже, бактеріальна популяція в цілому може дати скоординовану відповідь. Ці системи міжклітинної комунікації регулюють різні функції бактерій, такі як рухливість, вірулентність, споруляція, продукування антибіотиків, обмін ДНК і розвиток більш складних багатоклітинних структур, таких як біоплівки. Таким чином, втручання в сигнальні системи QS може запропонувати нову стратегію боротьби з персистуючими (хронічними) бактеріальними інфекціями. Здатність певних речовин, таких як природні сполуки, які мають здатність пригнічення кворум (QQ, англ.: Quorum Quenching), можна використовувати як антиадгезивні сполуки та як сполуки, які перешкоджають утворенню біоплівок.

Сполуки, описані в цьому документі, особливо корисні для лікування розладів, пов'язаних з біоплівкою, де розлад характеризується хронічною та/або персистуючою інфекцією. Персистуюча інфекція та хронічна інфекція часто використовують взаємозамінно, але базуються на різних механізмах. Персистуючі інфекції зазвичай стримуються імунним захистом, але можуть активуватися, коли такий імунний захист ослаблений. Персистуючі інфекції часто протікають безсимптомно і стають клінічно помітними лише тоді, коли імунний захист не в змозі контролювати патогена. Незважаючи на те, що персистуючі інфекції часто протікають безсимптомно, фахівець у даній галузі добре знає засоби виявлення таких персистуючих інфекцій, включаючи, наприклад, виявлення мікроорганізмів у зразках від пацієнтів (наприклад, крові або сечі). При хронічній інфекції патогени залишаються в групі клітин/частинах тканини (наприклад, суглобів або легеневій тканині). У пацієнта завжди є симптоми захворювання, хоча вони можуть бути слабшими, ніж у гострій фазі інфекції.

Найяскравішим прикладом біоплілкових захворювань залишається мастит великої рогатої худоби. Мастит великої рогатої худоби є клінічним терміном для інфекцій молочної залози корів і може бути спричинений кількома патогенами, найпоширенішими формами яких є *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, а також *Serratia marescens* та інші факультативно патогенні *Enterobacteriaceae* і *Prototheca* spp, останній вважається новим патогеном, що викликає агресивний, невиліковний мастит у багатьох регіонах світу. Винахід охоплює обробку біоплівок, що містять такі мікроорганізми, сполуками та композиціями, описаними в цьому документі.

Наведені в цьому документі приклади описують вражаючу ефективність PTSO в різних польових випробуваннях на коровах, демонструючи його широку активність щодо біоплілкових інфекцій. Іншим яскравим прикладом біопліркової інфекції є хронічні незагоєвані ранові інфекції. Пальцевий дерматит, відоме захворювання великої рогатої худоби, пов'язане з біоплівкою, служить прикладом такого уповільненого процесу загоєння ран, і його успішно лікували за допомогою PTSO (див. приклад 7). У деяких варіантах здійснення рани, оброблені сполукою за винаходом, включають, наприклад, *Staphylococcus aureus*; стрептококи; грамнегативні бактерії, наприклад, *Treponema* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* або дріжджі/гриби, наприклад, *Candida* spp. (*albicans*), *Cladosporidium herbarum*, *Trichosporum*, *Rhodosporidium* і *Malassezia*.

Зараз загально визнано, що мікроорганізми, пов'язані з біоплівкою, спричиняють велику кількість інфекцій, включаючи ендокардит, остеомієліт, синусит, інфекції сечовивідних шляхів, хронічний простатит, пародонтит, хронічну легеневу інфекцію у пацієнтів з кістозним фіброзом, інфекції середнього вуха та різноманітні внутрішньолікарняні інфекції, особливо пов'язані з усіма відомими постійними пристроями (катетери, імплантати). Тяжкість біопліткових захворювань є значною і являє собою серйозну проблему для медичної допомоги.

Хоча відомо, що майже всі види бактерій здатні утворювати біоплівки в умовах стресу, у сучасній клінічній практиці кілька видів бактерій і грибів представляють значний інтерес, оскільки пов'язані з ними інфекції майже повністю стійкі до терапії, навіть якщо небіопліткова, планктонна форма того самого виду та штамів демонструє дуже хорошу чутливість до звичайних терапевтичних агентів (антибіотиків та антимікотичних/фунгіцидних агентів).

Нижче наведено приклади патогенів, які викликають серйозне клінічне занепокоєння через резистентність до терапії, пов'язаної з біоплівкою:

Aspergillus fumigatus - аспергілез легень (грибкове захворювання)

Burkholderia cepacia - легенева муковісцидозна суперінфекція

Candida spp. (дріжджі) - слизові оболонки шлунково-кишкового та сечостатевого тракту.

Gardnerella vaginalis (урогенітальний тракт)

Escherichia coli (множинні органи та септицемія)

Pseudomonas aeruginosa (інфекції багатьох органів і легень, включаючи муковісцидоз)

Staphylococcus aureus (множинні тканинні та ранові інфекції, нозокоміальні інфекції)

Staphylococcus epidermidis (множинні тканинні та ранові інфекції)

Stenotrophomonas maltophilia (хронічні захворювання дихальних шляхів).

Даним винаходом охоплено лікування таких розладів, пов'язаних з біоплівкою, і мікроорганізмів, пов'язаних з біоплівкою.

Мікробні біоплівки утворюються не лише бактеріями, але й іншими мікроорганізмами, зокрема патогенними грибами (*Aspergillus fumigatus*, основним збудником багатьох захворювань легень, пов'язаних з *Aspergillus*) та дріжджами (*Candida* spp.), що колонізують слизові поверхні шлунково-кишкового тракту та сечостатевого шляхів. Найпоширеніші біоплівки, пов'язані з імплантатами, утворюють *Staphylococcus aureus* (MSSA та MRSA), *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* та *Enterococcus faecalis*. Крім того, мікроводорості, такі як, наприклад, *Prototheca* spp., можуть утворювати біоплівки та є джерелом захворювань у людей і тварин (протекоз).

У деяких варіантах здійснення біоплівка містить бактерії, вибрані з одного або кількох *Treponema* spp., *Yersinia pestis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Serratia marcescens*, *Trueperella pyogenes*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Streptococcus pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Fusobacterium necrophorum*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Streptococcus* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* та *Pseudomonas aeruginosa*. У деяких варіантах здійснення біоплівка містить гриби, вибрані з *Absidia* spp., *Actinomyces* spp., *Aspergillus* spp., *Botrytis* spp., *Candida* spp., *Centrospora* spp., *Cephalosporium* spp., *Ceratocystis* spp., *Chaetomium* spp., *Chaetomium* spp., *Cladosporium* spp., *Colletotrichum* spp., *Conidiobolus* spp., *Fulvia* spp., *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp., *Guignardia* spp., *Helminthosporium* spp., *Histoplasma* spp., *Lecytophora* spp., *Malassezia* spp., *Nectria* spp., *Nocardia* spp., *Oospora* spp., *Ophiobolus* spp., *Paecilomyces* spp., *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium* spp., *Phymatotrichum* spp., *Phytophthora* spp., *Pythium* spp., *Piedraia hortai*, *Rhizoctonia* spp., *Rhizopus* spp., *Rhodospiridium* spp., *Saccharomyces* spp., *Sclerotium* spp., *Sclerotinia* spp., *Torulopsis* spp. та *Trichophyton* spp. Відомо, що багато важливих з медичної точки зору грибів, таких як *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Coccidioides* і *Pneumocystis*, утворюють біоплівки. У деяких варіантах здійснення біоплівка містить мікроводорості, наприклад, *Prototheca* spp.

У певних варіантах здійснення бактеріальна інфекція або розлад, пов'язаний з біоплівкою, спричинені грамнегативною бактерією. У певних варіантах здійснення бактеріальна інфекція або розлад, пов'язаний з біоплівкою, спричинені бактерією, резистентною до множини лікарських засобів. У певних варіантах здійснення бактеріальна інфекція є інфекцією, пов'язаною з метицилін-резистентним *Staphylococcus aureus* (MRSA), або інфекцією, пов'язаною з *Staphylococcus epidermidis* (наприклад, MRSE).

У переважному варіанті здійснення бактерією, що утворює біоплівку, є *Escherichia coli*, переважно біоплітковою інфекцією є рецидивуюча інфекція сечовивідних шляхів, пов'язана з катетером інфекція сечовивідних шляхів або інфекція жовчних шляхів.

У переважному варіанті здійснення бактерією, що утворює біоплівку, є *Pseudomonas aeruginosa*, переважно біоплітковою інфекцією є легенева інфекція муковісцидозу, хронічна ранова інфекція, пов'язана з катетером інфекція сечовивідних шляхів, хронічний риносинусит, хронічний середній отит,

бронхоектатична хвороба, хронічне обструктивне захворювання легень або пов'язаний з контактними лінзами кератит.

У переважному варіанті здійснення бактерією, що утворює біоплівку, є *Staphylococcus aureus*, переважно біоплівковою інфекцією є хронічний остеомієліт, хронічний риносинусит, ендокардит, хронічний середній отит або інфекція (ортопедичних) імплантатів.

У кращому варіанті здійснення бактерією, що утворює біоплівку, є *Staphylococcus epidermidis*, переважно біоплівковою інфекцією є інфекція центрального венозного катетера, ортопедичних імплантатів або хронічний остеомієліт.

У переважному варіанті здійснення бактерією, що утворює біоплівку, є *Streptococcus pneumoniae*, переважно біоплівковою інфекцією є інфекція носоглотки, хронічний ринозинозит, хронічний середній отит або інфекція при хронічному обструктивному захворюванні легень.

У переважному варіанті здійснення бактерією, що утворює біоплівку, є *Streptococcus pyogenes*, переважно біоплівковою інфекцією є інфекція ротової порожнини та носоглотки, рецидивуючий тонзиліт.

Клінічні ознаки біоплівковою інфекцій відомі практикуючому лікарю [див., наприклад, таблицю 1 у Wu et al. Int J Oral Sci. 2015 Mar; 7(1): 1-7]. Такі біоплівкові розлади можуть призвести до хронічних інфекцій. Визначення гострої та хронічної інфекції також відомо практикуючому лікарю. Наприклад, за даними клініки Mayo, поява дріжджової інфекції 4 або більше разів протягом року вказує на наявність хронічної дріжджової інфекції, тоді як поява двох або більше інфекцій сечового міхура протягом 6-місячного періоду вказує на наявність хронічної інфекції сечового міхура (також називається рецидивною інфекцією сечовивідних шляхів).

Найпоширенішим способом лікування патологічної бактеріальної інфекції є використання антибіотиків. Сучасні антибіотики діють переважно через механізми, що залежать від росту, і спрямовані на бактерії, що швидко діляться. Проте нереплікативні бактерії або бактерії, що повільно ростуть (наприклад, сплячі персистуючі клітини, біоплівки), демонструють високий рівень толерантності та/або резистентності до антибіотиків, сприяючи резистентній і рецидивуючій інфекції. Сполуки, описані в цьому документі, придатні для використання при інфекціях або біоплівках, що містять резистентні до антибіотиків бактерії, толерантні до антибіотиків бактерії та стійкі до антибіотиків бактерії. Сполуки, описані в цьому документі, також придатні як терапія другої лінії, точніше, для осіб, у яких не було відповіді на попереднє лікування (наприклад, протимікробне лікування) або розлад повернувся протягом, наприклад, одного року або 6 місяців.

У винаході додатково запропоновані сполуки, як описано в цьому документі, і композиції, що їх містять, для лікування будь-якого розладу, спричиненого біоплівками або пов'язаного з ними. Розлади, спричинені біоплівками або пов'язані з ними, добре відомі фахівцю в даній галузі. Зокрема, такими розладами є інфекції, пов'язані з біоплівкою. Відповідні розлади для лікування включають, наприклад, бактеріальний простатит, бактеріальний вагіноз, інфекції жовчних шляхів, хронічний синусит, хронічні захворювання легень, карієс зубів, ендокардит, камені в нирках, ларингіт, легенеvu інфекцію при муковісцидозі, гінгівостоматит, інфекції середнього вуха, незоміальні (кровотікні) інфекції, обструктивні захворювання легень, остеомієліт, середній отит, пародонтит, пневмонію, простатит, риносинусит, гайморит, тонзиліт, туберкульоз, інфекції сечовивідних шляхів та ранові інфекції. Наприклад, відомо, що *Mycoplasma Bovis* викликає інфекцію вимені та інфекцію суглобів. Розлади, пов'язані з біоплівками, також включають розлади, спричинені біоплівками, що утворюються на внутрішніх пристроях (наприклад, медичних імплантатах, катетерах тощо). Як правило, такі розлади лікують шляхом видалення/заміни імплантату. У кращому варіанті здійснення розладом є мастит. У деяких варіантах здійснення захворювання не є маститом. У деяких варіантах здійснення лікування призначене не для запального захворювання кишківника і, зокрема, коліту.

Сполуки та композиції, як описано в цьому документі, також корисні для лікування та запобігання інфекціям імплантованих медичних пристроїв, таких як протези суглобів і серцевих клапанів, як описано далі в цьому документі.

Показано, що сполуки за винаходом впливають на вим'я корови. Це вказує на те, що сполуки можуть проходити крізь гемато-молочний бар'єр. Гемато-молочний бар'єр утворений менш проникними щільними з'єднаннями між епітеліальними клітинами молочної залози для запобігання витоку молока. Проходження щільного бар'єру між кровоотоком і молоком вказує на те, що сполуки також можуть проходити через гематоенцефалічний бар'єр і лікувати інфекції головного мозку та кишкового епітелію, дозволяючи системно лікувати розлади, пов'язані з біоплівкою. Дані з прикладів також демонструють безпеку та ефективність *in vivo*, включаючи фармакокінетичні властивості, які роблять сполуки придатними для терапії.

У винаході додатково запропоновані сполуки, як описано в цьому документі, і композиції, що їх містять, для запобігання або зменшення запалення у відповідь на бактеріальну інфекцію або біоплівку. Запалення є частиною складної біологічної відповіді тканин організму на шкідливі подразники, такі як патогени, і є захисною реакцією за участю імунних клітин і молекулярних медіаторів. Функція запалення полягає в усуненні патогенів.

У переважному варіанті здійснення лікування індивіда сполуками, як описано в даному документі, або композиціями, що їх містять, запобігає або зменшує клінічне запалення у тварини, переважно у корови. Переважно лікування запобігає або зменшує (клінічне) запалення вимені. В іншому варіанті здійснення лікування індивіда сполуками та композиціями, що їх містять, запобігає або зменшує (клінічне) запалення у людини. Наприклад, лікування запобігає або зменшує запалення шкіри, переважно запобігає екземі.

Не бажаючи бути зв'язаними теорією, лікування індивіда сполуками, як описано в цьому документі, або композиціями, що їх містять, зменшує утворення або ріст біоплівки та/або викликає руйнування або зменшення біоплівок. Тому людина більше не реагує запальною реакцією на присутність патогенів. Іншими словами, очищення від біоплівок і патогенів усередині цих біоплівок зменшує запальну реакцію та запобігає клінічному запаленню.

Під час обробки біоплівки мікроорганізми (такі як бактерії та гриби) вивільняються з біоплівки. У деяких випадках імунна система людини реагує на активний мікроорганізм. Це може призвести до запалення тканини. Активовані імунні клітини та запальна реакція також можуть пошкодити тканину, наприклад, у молочній залозі. Тому пригнічення запальної реакції може запобігти або зменшити пошкодження тканини. Наприклад, молочна залоза менше пошкоджується, і молочна продуктивність корови відновиться швидше.

Крім того, після того, як тканина була пошкоджена і запалення закінчилося, організм починає відновлення. Все ще присутні макрофаги стимулюють утворення нових кровоносних судин. Вони також забезпечують атракцію фібробластів. Ці фібробласти зрештою викликають утворення грануляційної тканини. Наприклад, у разі лікування дійної корови замість тканини, що виробляє молоко, може утворитися рубцева тканина. Тому продуктивність молока у корови може бути нижчою, ніж до запалення.

На додаток до сполук, описаних в даному документі, можна вводити інші протизапальні препарати для пригнічення запальної відповіді та зменшення пошкодження тканини, наприклад, у молочній залозі. У переважному варіанті здійснення лікування, описане в цьому документі (як терапевтичне, так і профілактичне), додатково включає введення протизапального агенту. Протизапальні агенти включають, наприклад, нестероїдні протизапальні агенти (cox/lox-інгібітори), такі як ібупрофен, парацетамол, аспірин, диклофенак, кетопрофен, толметин, етодолак і фенопрофен. Також можна використовувати природні протизапальні агенти, такі як куркумін, імбир, спіруліна, кайенський перець, кориця, гвоздика, шавлія, розмарин, чорний перець, натуральні аспірини, босвелія, сангвінарія та/або зелений чай. У деяких варіантах здійснення способи та застосування, описані в цьому документі, включають комбіноване лікування терапевтичними сполуками тієї ж тканини, описаними в цьому документі, з протизапальним агентом. Сполуки можна вводити разом або окремо. У деяких варіантах здійснення пропонувані композиції, що містять терапевтичні сполуки тієї ж тканини, описані в цьому документі, з протизапальним агентом.

У деяких варіантах здійснення способи включають введення індивіду, який цього потребує, композицій, що містять сполуки, описані в цьому документі, переважно для запобігання або зменшення утворення або росту біоплівки, руйнування або зменшення кількості біоплівки, та/або лікування або запобігання бактеріальної чи грибкової інфекції. У деяких варіантах здійснення композицію можна вводити індивіду для лікування (наприклад, терапевтичний засіб) або профілактики (наприклад, профілактичний засіб) захворювання, розладу або інфекції. У деяких варіантах здійснення в індивіда є або існує ризик розвитку інфекції, пов'язаної з біоплівкою.

Композиції можна вводити будь-якій людині, зокрема тваринам. Переважно тварина є жуйною (такою як корови та кози), більш переважно коровою. У деяких варіантах здійснення тварина являю собою корову. Переважно, тварина не є жуйною, такою як одношлункова тварина, гризун, примат, що не являю собою людину, свиня, коня, собаку, котячий або птах. У деяких варіантах здійснення тварина являю собою людину. У деяких варіантах здійснення тварина не являю собою людину. У деяких варіантах здійснення тварина не є водною твариною, такою як риба, молюски та ракоподібні. Переважно, тварина являю собою ссавця або птаха.

Не бажаючи бути зв'язаними теорією, винахід передбачає, що описані в даному документі композиції можуть мати сприятливий ефект після одноразового введення. У кращому варіанті здійснення ефекти досягаються одноразовим пероральним введенням композиції, описаної в цьому документі. Таке пероральне дозування може бути, наприклад, у вигляді таблетки, яка забезпечує подовжене вивільнення сполук, описаних у цьому документі.

Винахід також передбачає множинне введення. Наприклад, композиції можна вводити більше одного разу на день, щодня, щотижня або щомісяця. У типовому варіанті здійснення композицію можна вводити один раз на день протягом тижня або до ослаблення симптомів.

Фактичні рівні дозування фармацевтичних препаратів, описаних у цьому документі, можна змінювати таким чином, щоб отримати кількість активного інгредієнта, ефективного для досягнення бажаної терапевтичної відповіді для конкретного пацієнта, композиції та способу введення, не будучи токсичним для пацієнта. Вибраний рівень дозування залежатиме від ряду факторів, включаючи

активність конкретної сполуки, шлях введення, час введення, швидкість виведення конкретної сполуки, що використовується, тривалість лікування, інші препарати, сполуки та/або матеріали, що використовуються в комбінації, вік, стать, масу, стан, загальний стан здоров'я та попередню історію хвороби пацієнта, якого лікують, і подібні фактори, добре відомі в медицині. Лікар або ветеринар, який має звичайний досвід у даній галузі, може легко визначити та призначити необхідну ефективну кількість фармацевтичної композиції.

У деяких варіантах здійснення жуйні тварини, зокрема велика рогата худоба, отримують щонайменше 1 грам сполук, описаних у цьому документі, переважно щонайменше два грами, та більш переважно щонайменше 5 грамів. У деяких варіантах здійснення жуйним тваринам, зокрема великій рогатій худобі, дають щонайменше 3 г PTSO. Композиції, що містять сполуки для жуйних тварин, переважно представлені у вигляді таблеток для перорального застосування.

Фахівцю в даній галузі зрозуміло, що менші кількості сполук можна вводити дрібним жуйним тваринам, наприклад, козам. Приклади описують введення коровам таблетки, яка містить 3,84 г PTSO плюс 0,96 грам PTS. Оскільки середня маса корови становить приблизно 650 кг, це відповідає дозі приблизно 5,9 мг/кг PTSO та 1,5 мг/кг PTS. Фахівцю відомо, що менші тварини мають вищі швидкості метаболізму, тому меншим тваринам потрібна більша доза препарату в перерахунку на масу. Перетворення доз між тваринами, а також між людьми і тваринами розглянуто в [Nair and Jacob J Basic Clin Pharm. March 2016-May 2016; 7(2): 27-31] та Holliday, et al., (1967 The Relation of Metabolic Rate to Body Weight and Organ Size. A Review. *Pediat.Res.* 1: 185-195].

У деяких варіантах здійснення способів і застосувань, описаних у цьому документі, принаймні 5 мг/день сполук, описаних у цьому документі, вводять людині (наприклад, шляхом перорального введення). Переважно, вводять щонайменше 10 мг/день сполук. У деяких варіантах здійснення PTSO вводять людині в дозі від 0,1 мг/кг до 100 мг/кг. Такі кількості сполук особливо корисні при системному введенні сполук (наприклад, перорально). Фахівець у даній галузі зрозуміє, що менші кількості можна використовувати при місцевому введенні (наприклад, на шкіру, ясна, рану). Композиції, описані в цьому документі, бажано застосовувати протягом щонайменше одного тижня або доки симптоми не зменшаться. Хоча такі композиції можна вводити кілька разів (наприклад, один раз на тиждень, один раз на місяць, двічі на рік тощо), профілактичний і терапевтичний ефекти спостерігаються після одноразового використання.

У деяких варіантах здійснення композиція за винаходом, що містить сполуки, описані в цьому документі, разом з одним або більше додатковими агентами, такими як антибіотики (наприклад, антибактеріальні агенти, противірусні агенти, протигрибкові агенти), протизапальні агенти, жарознижуючі агенти і знеболюючі агенти.

У деяких варіантах здійснення винаходу сполуки, описані в цьому документі, використовують разом з протимікробним агентом, таким як протигрибкові препарати або антибіотики. Не бажаючи бути зв'язаними теорією, винахід передбачає, що описані в цьому документі сполуки націлені на біоплівки. Потім протимікробні препарати можуть впливати на залишкові планктонні клітини, а також на мікробні клітини у зруйнованій біоплівці. Як буде зрозуміло фахівцю у даній галузі, комбінація протимікробного засобу зі сполуками, описаними в цьому документі, може зменшити дозування та/або частоту дозування протимікробного засобу.

Приклади протимікробних засобів, які можна використовувати в комбінованому лікуванні, включають протигрибкові засоби, такі як міконазол, кетоконазол, еконазол, тербінафін, циклопірокс, толнафтат, сертаконазол, сульконазол, амфотерицин В, холорксилеол, кліохінол, бутенафін, нафтифін, ністатин і клотримазол. Приклади антибіотиків включають пеніциліни, тетрацикліни, цефалоспорини, хінолони, лінкоміцини, макроліди, сульфонаміди, глікопептиди, аміноглікозиди та карбапенеми.

Винахід пропонує композиції, що містять сполуку, описану в цьому документі (зокрема, сполуку формули I) разом із протимікробним засобом. Як буде зрозуміло фахівцю у даній галузі, сполука та протимікробний засіб також можуть вводитися окремо. У деяких варіантах здійснення сполука та протимікробна терапія перекриваються. У деяких варіантах здійснення терапія сполукою за винаходом передує протимікробній терапії.

У деяких варіантах здійснення композиції, описані в цьому документі, вводять як або в харчовому продукті або функціональному харчовому продукті. Термін "функціональна харчовий продукт", як використовується в цьому документі, стосується тих харчових продуктів, які готують не тільки з огляду на їх харчові характеристики, але також для виконання певної функції, такої як покращення здоров'я або зниження ризику зараження хворобами. Такі функціональні харчові продукти також можуть називатися дієтичними добавками або харчовими (кормовими) добавками. Для цього додають біологічно активні сполуки, такі як мінерали, вітаміни, жирні кислоти, бактерії з корисною дією, харчові волокна та антиоксиданти, тощо. Такі харчові продукти можуть бути в будь-якій формі, придатній для перорального споживання, наприклад, у формі рідини, гелю, порошку, пігулки, таблетки або в гелевих капсулах.

Функціональні харчові продукти можуть також включати перевар тваринної тканини, наприклад, будь-який матеріал, який є результатом хімічного та/або ферментативного гідролізу чистої та нерозкладеної тканини тварини. Функціональні харчові продукти можуть також включати висушені пивні дріжджі, наприклад, висушений неактивний агент, який є побічним продуктом пивоварної промисловості. Встановлено, що перевар тваринної тканини та висушені пивні дріжджі покращують смакові властивості функціональних харчових продуктів. За наявності у функціональних харчових продуктах, перевар тваринної тканини складає від приблизно 10 % до приблизно 90 % функціонального харчового продукту, а висушені пивні дріжджі складають від приблизно 1 % до приблизно 30 % функціонального харчового продукту.

У типовому варіанті здійснення винахід пропонує композицію, що містить пектин, юку, вітамін Е, карбонат кальцію, пробіотики, рослинні екстракти, трави та орегано. Переважно зазначена композиція містить приблизно від 1 до 5 грамів терапевтичних сполук тіосірки. Зазначена композиція придатна у вигляді таблеток, зокрема для лікування корів. Як описано в прикладах, композиція підходить для зменшення кількості клітин у молоці та для лікування маститу.

У деяких варіантах здійснення винахід пропонує композиції, що містять терапевтичні сполуки тіосірки, як описано в цьому документі, разом із щонайменше одним фармацевтично прийнятним носієм, розріджувачем та/або ексципієнтом. [див. напр., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, April 1997]. Використовуваний в цьому документі термін "фармацевтично прийнятний" стосується тих композицій або комбінацій агентів, матеріалів або композицій та/або їхніх лікарських форм, які знаходяться в межах обґрунтованого медичного висновку та придатні для використання в контакті з тканинами людей і тварин без надмірної токсичності, подразнення, алергічної реакції чи інших проблем чи ускладнень, пропорційних обґрунтованому співвідношенню користь/ризик. Крім того, термін "фармацевтично прийнятний розріджувач або носій" стосується фармацевтично прийнятного матеріалу, композиції або носія, такого як рідкий або твердий наповнювач, розріджувач, ексципієнт, розчинник або інкапсулюючий матеріал, який бере участь у перенесенні або транспортуванні пептиду з одного органу або частини тіла до іншого органу або частини тіла.

Фармацевтичну композицію можна вводити будь-яким придатним шляхом і способом. Як буде зрозуміло фахівцю в даній галузі, шлях і/або спосіб введення буде змінюватися в залежності від бажаних результатів. Фармацевтичні композиції можуть бути складені відповідно до звичайних процедур для введення будь-якими шляхами, такими як парентеральний, місцевий (включаючи очний), пероральний, сублінгвальний, трансдермальний або шляхом інгаляції. Парентеральне введення включає, наприклад, внутрішньовенне, внутрішньом'язове, внутрішньоартеріальне, внутрішньокоронарне, інтратекальне, інтракапсулярне, інтраорбітальне, внутрішньосерцеве, інтрадермальне, інтраперитонеальне, транстрахеальне, підшкірне, субкутикулярне, внутрішньосуглобове, субкапсулярне, субарахноїдальне, інтраспінальне, епідуральне та інтратермальне введення та інфузію. Переважними шляхами є пероральне або місцеве введення.

Композиції можуть бути в будь-яких придатних формах, таких як рідкі, напівтверді та тверді лікарські форми. Композиції можуть бути у формі таблеток, капсул, порошків, гранул, пастилок, кремів або рідких препаратів (зокрема, для нанесення на шкіру або введення в очі), таких як стерильні парентеральні розчини або суспензії, або у формі спрею, аерозолу або іншим звичайним методом інгаляції. Фармацевтичні композиції за винаходом включають композиції, придатні для перорального, назального, місцевого (включаючи буккальне та сублінгвальне), ректального, вагінального та/або парентерального введення. У конкретних варіантах здійснення композиція є місцевою композицією у формі крему, гелю, мазі, лосьйону, піни, суспензії, спрею, аерозолу або порошкового аерозолу. Композиції особливо корисні для нанесення на шкіру. Придатні композиції також включають композиції для догляду за порожниною рота, наприклад, зубну пасту, засіб для чищення зубів, зубний порошок, зубний гель, підясневий гель, ополіскувач для рота/зубний еліксир, штучну слину, засіб для зубних протезів, спрей для рота, пастилки, таблетки для перорального застосування та жувальну гумку.

Винахід також пропонує використання *in vitro* композицій, як описано в цьому документі, для запобігання або зменшення утворення або росту біоплівки на поверхні, та/або для руйнування або зменшення кількості біоплівок на поверхні. Переважно, способи спрямовані на зменшення біоплівки або утворення біоплівки на поверхні. У деяких варіантах здійснення спосіб включає приведення в контакт біоплівки, прикріпленої до поверхні, з композиціями, описаними в даному документі. Композиції включають, наприклад, очищувальні або стерилізаційні композиції.

Будь-яка поверхня може бути оброблена композиціями, описаними в даному документі, для покриття таких поверхонь. Поверхні можна, наприклад, обприскувати, занурювати або просочувати композиціями. Поверхня включає скло, метал, пористі та непористі поверхні. Це також стосується зовнішніх і внутрішніх поверхонь обладнання, яке може бути забруднене, наприклад обладнання харчової промисловості або медичного обладнання в лікарнях і закладах охорони здоров'я, а також сантехнічних систем (наприклад, злив раковини), стільниць, будівельних матеріалів, повітропроводів, чистих приміщень. Поверхня також стосується внутрішньої або зовнішньої частини труб, наприклад

дренажів, а також басейнів, резервуарів (наприклад, для аквакультури), очисних фільтрів, унітазу, раковин, поверхонь у теплиці. Поверхня також включає воду, наприклад, з поїлки.

У деяких варіантах здійснення поверхня є медичним пристроєм, таким як протези (імпланти кульшового суглоба, зубні імпланти, протезування суглоба, голосове протезування, протезування статевого члена), механічний серцевий клапан, кардіостимулятор, артеріовенозний шунт, склеральний затискач, катетери (наприклад, центральний венозний катетер, внутрішньосудинний катетер, сечовий катетер, катетер Хікмана, катетер для перитонеального діалізу, ендотрахеальний катетер), тимпаностомічна трубка, трахеостомічна трубка, хірургічний шов, кістковий фіксатор, кістковий гвинт, інтраокулярна лінза, контактна лінза, внутрішньоматкова спіраль, аортофеморальний трансплантат або судинний трансплантат. Інші інфекції від медичних пристроїв включають інфекції черевних дренажів, стентів жовчних шляхів, грудних імплантів, кардіостимуляторів, шунтів спинномозкової рідини, контактних лінз, дефібриляторів, зубних протезів, електричних діалізаторів, ендотрахеальних трубок, постійних сечових катетерів, внутрішньоматкових спіралей, внутрішньовених катетерів, протезів суглобів, механічних серцевих клапанів, нефростомічних трубок, ортопедичних імплантів, катетерів для перитонеального діалізу, протезів клапанів серця, протезів суглобів, алопластичних ортопедичних виробів, тканинних наповнювачів, уретральних стентів, судинних протезів, ШВЛ-асоційовану пневмонію, інфекції вентрикулярних допоміжних пристроїв, вентрикулярних відведень, вентрикулярних шунтів та голосових протезів.

У деяких варіантах здійснення поверхня є хірургічним пристроєм, таким як затискач, щипці, ножиці, гачок для шкіри, трубка, голка, ретрактор, скалер, дриль, долото, рашпіль або пила.

Як використовується в цьому документі, "містити" та його відмінювання вживаються в необмежувальному значенні для позначення того, що елементи, що йдуть після слова, включені, але елементи, конкретно не згадані, не виключаються. Крім того, дієслово "складатися з" може бути замінено на "складатися по суті з", що означає, що сполука або допоміжна сполука, як визначено в цьому документі, може містити додатковий(і) компонент(и), ніж ті, які конкретно визначені, причому зазначений додатковий(і) компонент(и) не змінює унікальну характеристику винаходу.

Однину використовують в даному документі для позначення одного або більше ніж одного (тобто, щонайменше одного) об'єкта. Наприклад, "елемент" означає один елемент або більше ніж один елемент.

Слово "приблизно" або "близько" при використанні в поєднанні з числовим значенням (приблизно 10, близько 10) переважно означає, що значення може бути заданим значенням 10 та значенням, більшим або меншим від нього на 1 %.

Сполуки та композиції, описані в цьому документі, є корисними для терапії та терапевтичних процедур і, таким чином, можуть бути корисними як лікарські засоби та використовуватися в способі приготування лікарського засобу. У деяких варіантах здійснення у винаході запропоновані способи, які не є лікуванням тіла людини або тварини, та/або способи, які не включають процес модифікації генетичної ідентичності зародкової лінії людини,

де клітина не є клітиною зародкової лінії людини.

Усі посилання на патенти та літературу, наведені в цьому описі, включені в даний документ у повному обсязі шляхом посилання.

Винахід додатково пояснюється в наступних прикладах. Ці приклади не обмежують обсяг винаходу, а служать лише для пояснення винаходу.

ПРИКЛАДИ

Кілька сполук, виділених з Allium, були вивчені *in vitro*, щоб визначити їх вплив на бактерії з метою розробки альтернатив антибіотикам. Наприклад, Sorlozano-Puerto et al. [Biomed Research International 2018 Article ID 7861207] описує антибактеріальну активність PTS і PTSO проти великої кількості патогенів людини (212 грамнегативних бацил і 267 грампозитивних коків, виділених з клінічних зразків, отриманих від 479 різних пацієнтів), використовуючи рекомендований стандартний метод (CLSI) для визначення значень MIC50 і MIC90, а також значень MBC50 і MBC90 (останні використовуються для демонстрації прямого бактерицидного ефекту) як показника антибактеріальної активності. Дані щодо PTSO та PTS порівнювали з низкою антибіотиків, що використовуються в клінічній практиці проти таких патогенів. Результати показують, що для всіх штамів бактерій кілька антибіотиків із досліджуваної групи були ефективнішими, ніж PTSO або PTS, на що вказують нижчі значення MIC антибіотика. Виходячи з цих результатів *in vitro*, фахівець у цій галузі не розглядатиме PTSO або PTS як корисну альтернативу звичайним антибіотикам у лікуванні бактеріальних інфекцій.

Дослідження *in vitro*, описані в Sorlozano-Puerto et al. вимірюють пригнічення росту планктонних мікроорганізмів. Як буде зрозуміло фахівцю в даній галузі, дія сполуки проти планктонних мікроорганізмів не вказує на дію таких сполук проти біоплівки. Це було продемонстровано для ряду протимікробних препаратів, як обговорювалося раніше, і також добре відомо в літературі. Див., наприклад, [Roy et al.], який вказує на те, що бактерії в біоплівках мають підвищену резистентність до звичайних антибіотиків приблизно в 1000 разів [2018 Virulence 9:522-554].

На відміну від досліджень, пов'язаних з планктонними мікроорганізмами, у цих експериментах вперше продемонстровано вплив PTSO та PTS на біоплівки. У таких дослідженнях середовище та умови культивування (постійне струшування чашок, щоб викликати стрес через силу зсуву, порівняну з тим, що відбувається в кровотоці) стимулюють мікроорганізми, наприклад бактерії, швидко утворювати біоплівки. Такий аналіз біоплівки можна проводити двома способами: шляхом додавання досліджуваної сполуки (наприклад, PTSO) з початку експерименту, щоб оцінити її здатність запобігати утворенню біоплівки, або шляхом додавання досліджуваної сполуки до зрілої біоплівки для оцінки ефекту розчинення біоплівки (відповідає, наприклад, прикладу 2, у якому існуючу біоплівку обробляли PTSO).

Основні механізми дії сполуки в аналізі біоплівки пов'язані або з її інгібуванням відчуття кворуму та наступним колективним перемиканням генів, що призводить до адгезії бактерій і синтезу, або зі збиранням позаклітинного матриксу для формування тривимірної структури біоплівки. Ці механізми повністю відрізняються від чистого антибактеріального/протимікробного ефекту "знищення". Якщо сполука, яка ефективно перевірена в аналізі біоплівки, але не має антибактеріального ефекту (наприклад, певні антитіла, вироблені проти специфічних білків біоплівки для дестабілізації структури біоплівки), потім сполуку можна комбінувати з антибіотиком, щоб забезпечити знищення бактерій, що вивільняються з біоплівки. Особливо це стосується випадків, коли імунна система тварини скомпрометована. Якщо речовина, така як PTSO, має певну антибактеріальну ефективність (хоча і за допомогою інших механізмів), це буде розглядатися як бажаний додатковий ефект у клінічній терапії, що підтримує знищення бактеріальної популяції вродженою імунною системою...

Приклади 2-4 описують дію сполук за винаходом з використанням досліджень біоплівки *in vitro*. Такі дослідження значно відрізняються від досліджень, таких як описані в [Sorlozano-Puerto et al.], які вимірюють інгібування росту планктонних мікроорганізмів. Дані приклади неочікувано демонструють, що сполуки за винаходом впливають на знищення біоплівки.

Приклад 1 Виділення PTSO і PTS

Обсяг: PTSO і PTS виділяли з рослинного екстракту, що містить 56 % PTSO і 14 % PTS (названі в даному документі "рослинний екстракт, збагачений PTSO/PTS").

Схема дослідження: порядок елюювання сполук відповідно до їх полярності оцінюють за допомогою ВЕРХ, а умови для розділення визначають за допомогою ТШХ з використанням гептану та етилацетату як рухомої фази. Флеш-колонку довжиною 110 см і діаметром 25 см заповнювали 15 кг діоксиду кремнію (розмір частинок 40-60 мкм від ACROS Organics™) у гептані, і колонці давали стабілізуватися протягом ночі. Очищення проводили шляхом поступового збільшення полярності від 0 % до 40 %. Фракції, що представляють інтерес, PTS (= пік 6) і PTSO (= пік 7), обидві ідентифіковані за допомогою ¹H-ЯМР, почали елюватися після використання 20 літрів рухомої фази та були зібрані у фракції розміром 2 літри. Фракції розділяли згідно з ідентифікацією кожної сполуки методом ТШХ, і відповідні фракції для кожної сполуки (PTS або PTSO) об'єднували. Розчинник випарювали за допомогою роторного випарника, щоб отримати очищену фракцію PTS (32435-2-A) і 2 очищені фракції PTSO (MHA32435-2-B, MHA32435-2-C), як зазначено в таблиці 1.

Необхідна чистота >98 % була досягнута лише з фракцією MHA32435-2-B (=PTSO), тоді як фракція MHA32435-2-A (PTS) і MHA32435-2-C (= 2-а фракція PTSO) показали чистоту < 98 % і потребували додаткового очищення окремо за допомогою другої флеш-хроматографії для отримання бажаної чистоти.

Повторне очищення PTS (MHA32435-2-A) проводили шляхом наповнення флеш-колонки (довжиною 50 см і діаметром 20 см) 2 кг діоксиду кремнію (розмір частинок 40-60 мкм від ACROS Organics™), використовуючи етилацетат і гептан як рухому фазу та збільшуючи полярність від 0 % до 20 %. Фракції, що представляють інтерес, збирали у фракції розміром 250 мл, ідентифікували за допомогою ТШХ і об'єднували. Розчинник випарювали на роторному випарнику для отримання PTS (EWR32514-01-1) з чистотою >98 %.

Повторне очищення нечистої фракції PTSO (MHA32435-2-B) проводили на тій же флеш-колонці, використовуючи ту саму рухому фазу, що й для MHA32435-2-A, з різницею в 3 кг діоксиду кремнію (для заповнення колонки), збільшуючи полярність від 0 % до 30 %, а розмір фракції становив 100 мл. Повторне очищення призвело до отримання двох фракцій (EWR32514-02-1 і EWR32514-02-02) PTSO з чистотою >98 %, як показано в таблиці 1.

Таблиця 1

Пік 6 і пік 7 чистоти та % відновлення з рослинного екстракту, збагаченого PTSO/PTS

1-й етап очищення PTS (пік 6) і PTSO (пік 7) з рослинного екстракту, збагаченого PTSO/PTS (992 г)					
Піки	Маса (г)	ВЕРХ	¹ H-ЯМР	Чистота (%)	% відновлення

6 (= PTS)	64	MHA32435-2-A	MHA-32435-2-A	93	6
7 (= PTSO)	651	MHA32435-2-C	MHA-32435-2-C	99	86 (з обох фракцій)
7 (= PTSO)	198	MHA32435-2-B	MHA-32435-2-B	72	
2-й етап повторного очищення піку 6 і піку 7 (фр. з чистотою 72)					
6 (= PTS)	46	EWR32514-01-1	EWR32514-01-4	99	5
7 (= PTSO)	123	EWR32514-02-1	EWR32514-02-4	99	82 (з усіх фракцій з чистотою >98 %)
7 (= PTSO)	39	EWR32514-02-02	EWR32514-02-5	99	

З цього прикладу показано, що PTSO і PTS були очищені до високого ступеня чистоти. Зразки з чистотою >99 % використовували, як зазначено в прикладах у цьому документі, і позначали як "чистий PTSO" і "чистий PTS".

Приклад 2 Біоплівка в ФБР (фотобіореактор)

Щоб визначити ефект PTSO, PTS і DPD (дипропілдісульфід) проти біоплівки, біоплівку вирощували в контрольованих умовах у реакторі зі скляною трубкою, ФБР. Як модельну систему використовували фотобіореактор, оскільки у скляних трубках було чітко видно утворення біоплівки. Після утворення зрілої біоплівки додавали зростаючі рівні чистого PTSO, PTS або DPD, біоплівку видаляли титруванням чистим PTSO, PTS або DPD, і визначали дози, при яких біоплівку було знищено. Після цього визначали мікробний склад біоплівки методом глибокого секвенування.

Схема дослідження

Гетеротрофна мікробна біоплівка: біоплівку культивували в 26,5-літровому скляному фотобіореакторі (ФБР) з довжиною труби 37 метрів вкл. вигини (скло GemTube RD-25 від LGEM). ФБР заповнювали 22 літрами нестерилізованого середовища (Табл. 1).

Таблиця 2

Склад середовища для культивування біоплівки

Іон	Концентрація
Макроелементи	
NH ₄ ⁺	0,3 мМ
K ⁺	10 мМ
Ca ²⁺	6,8 мМ
Mg ²⁺	3,1 мМ
NO ₃ ⁻	18 мМ
SO ₄ ²⁻⁻	4,6 мМ
PO ₄ ³⁻	2,4 мМ
Мікроелементи	
Fe ²⁺	31 мкМ
Mn ²⁺	14 мкМ
Zn ²⁺	10 мкМ
B ⁻	65 мкМ
Cu ²⁺	1,5 мкМ
Mo ²⁺	1 мкМ

Середовище додатково містило 1 г/л глюкози. Інокуляція відбувалася шляхом додавання 500 мл води з каналу з Zuidpolder поблизу Delfgauw. Повітря закачували зі швидкістю 1,0 літр/хв: при цьому налаштуванні циркуляція середовища через ФБР у середовищі була якомога меншою, але була стабільна затримка для реалізації циркуляції середовища в ФБР. ФБР був закритий темним пластиковим екраном, щоб запобігти впливу світла. Інкубацію проводили при 12-18° С, рН контролювали 5 разів на тиждень до 5,2-5,7, раз на 1,5 дня. Після загальної дози 5 г/л глюкози (через 1 тиждень) утворився слизистий шар (біоплівка), який покриває всю внутрішню поверхню скляної трубки. Середовище було замінено свіжим середовищем без глюкози, коли утворилася біоплівка.

PTSO, PTS або DPD були додані до ФБР, як зазначено в таблицях. Чистий PTSO і PTS отримували, як зазначено в прикладі 1, і стабільні розчини готували у воді обробкою ультразвуком 1000-кратно розведених сумішей. DPD (дипропілдісульфід чистоти >98 %) був поставлений Sigma. Після кожного етапу додавання культуру біоплівки інкубували протягом 24 годин для спостереження за стабільністю біоплівки.

Кількість аеробних, анаеробних/мікроаерофільних і грибових КУО в біоплівці та надосадовій рідині визначали відповідно до стандартних операційних процедур, як описано нижче: для аеробних

колонієутворюючих одиниць на мл (КУО/мл) див. <https://www.iso.org/standard/53728.html>; для визначення анаеробних КУО/мл див. [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AN0025A#/AN0025A] (чашки інкубують у безкисневому контейнері) і щодо кількості колонієутворюючих одиниць для грибів [див. http://edgeanalytical.com/wp-content/uploads/Food_AOAC-997.02.pdf (див. таблицю 2)].

Склад мікробної популяції біоплівки визначали за допомогою метагеномного аналізу (Глибоке секвенування Illumina).

Було взято ще один зразок біоплівки, і частину зберігали при температурі мінус 80 градусів як інокулят для подальших досліджень. Іншу частину біоплівки розчиняли за допомогою м'якої обробки ультразвуком і використовували для визначення кількості аеробних, анаеробних та грибкових колонієутворюючих одиниць, як описано вище. Після цього було розраховано, чи відповідає кількість колонієутворюючих мікроорганізмів у середовищі кількості мікроорганізмів у біоплівці до обробки. Таким чином було підраховано, чи були знищені мікроорганізми під час обробки, чи бактерії залишилися живими, а лише біоплівка була солюбілізована.

Знищення біоплівки за допомогою PTSO

Мікроскопічний аналіз показав суміш грибів, найпростіших і бактерій.

Метагеномний аналіз показав, що біоплівка складається з сильно змішаної популяції. Було виявлено щонайменше 611 різних родів бактерій. Нижче наведено п'ять найпоширеніших родів та їхню відносну чисельність: *Pseudomonas* 46 %, *Acidovorax* 13 %, *Burkholderia* 4 %, *Achromobacter* 4 % і *Lelliotia* 3 %. Було виявлено щонайменше 5 різних родів грибів. Нижче наведено п'ять найпоширеніших родів та їхню відносну чисельність: *Cladobotryum* 5 %, *Emiricellopsis* 31 %, *Fusicolla* 17 %, *Mucor* 37 % і *Rozella* 10 %.

Додавання PTSO призвело до дезінтеграції біоплівки. Це можна було побачити після першого дозування 0,05 мкл/л PTSO шляхом звільнення скупчень біоплівки, тоді як при загальному дозуванні 0,65 мкл/л біоплівка стала значно тоншою і виглядає майже повністю розкладеною при найвищому дозуванні.

Для того, щоб дослідити, чи PTSO має дестабілізуючий ефект на біоплівки чи просто знищує мікроорганізми, зразки були відібрані з біоплівки перед обробкою, а зразки рідкого середовища були відібрані до та після обробки та були інокульовані, як описано вище, щоб визначити кількість колонієутворюючих одиниць. Колонієутворюючі одиниці на мл біоплівки та в супернатанті оцінювали за допомогою методів посіву та наведені в Таблиці 3. Після цього було розраховано, чи відповідає кількість колонієутворюючих мікроорганізмів у середовищі кількості мікроорганізмів у біоплівці до обробки. Таким чином було підраховано, чи мікроорганізми були знищені під час обробки, чи бактерії залишилися живими, а лише біоплівка була солюбілізована (Таблиця 6).

Таблиця 3

Кількість вивільнених клітин під час солюбілізації гетеротрофно вирощеної біоплівки після додавання різних дозувань PTSO. Кількість аеробних, анаеробних/мікроаерофільних і грибкових КУО відповідала стандартній робочій процедурі, як описано в даному документі

День	Доза (мкл PTSO/л культури)	Кумулятивне дозування (мкл PTSO/л культури)	Аеробні КУО через 24 години (x 1000)	Анаеробні КУО через 24 години (x 1000)	Грибкові КУО через 24 години (x 1000)
0	0	0	300	47	18
2	0,05	0,05	2033	383	150
6	0,1	0,15	3367	750	150
8	0,5	0,65	6267	1127	517
13	1,0	1,65	17333	4400	20333
15	2,0	3,65	5867	2933	1567

Навіть при найнижчому дозуванні PTSO аеробні, анаеробні/мікроаерофільні та грибкові КУО збільшуються. Це вказує на те, що навіть при низьких дозуваннях PTSO починає руйнувати шар біоплівки з подальшим вивільненням бактерій. При найвищій концентрації PTSO аеробні, анаеробні/мікроаерофільні та грибкові КУО зменшуються, що вказує на те, що при більш високих дозах PTSO впливає на планктонні мікроорганізми.

Знищення біоплівки за допомогою PTS

Біоплівку вирощували, як описано вище. Метагеномний аналіз показав, що біоплівка складається з сильно змішаної популяції. Було виявлено щонайменше 362 різних родів бактерій. Нижче наведено

п'ять найпоширеніших родів та їхню відносну чисельність: *Pseudomonas* 72 %, *Raoultella* 6 %, *Flavobacterium* 3 %, *Enterobacter* 1,5 % і *Acidovorax* 1 %.

Візуальний розпад біоплівки можна було виявити після додавання загального дозування чистого PTS 11,65 мкл/л. Солюбілізація біоплівки призвела до збільшення КУО для аеробних, анаеробних бактерій і грибів у культурі (таблиця 3).

Таблиця 4

Кількість вивільнених клітин під час солюбілізації гетеротрофно вирощеної біоплівки після додавання різних дозувань PTS. Кількість аеробних, анаеробних/мікроаерофільних і грибкових КУО відповідала стандартній робочій процедурі, як описано в даному документі

Додаткова кількість	доза очищеного PTS (мкл/л)	Загальна доза очищеного PTS (мкл/л)	Аеробні КУО (x 1000)	Анаеробні КУО (x 1000)	Грибкові КУО (x 1000)
0	0	0,0	1600	453,333	14,333
1	0,05	0,05	600	536,667	11,667
2	0,10	0,15	466,667	129	90
3	0,50	0,65	1000	19,6676	23,667
4	1,00	1,65	1190	216	25,333
5	2,50	4,15	1003,333	253,333	24
6	2,5	6,65	1566,667	290,000	19,333
7	2,50	9,15	1410	74,667	12,667
8	2,50	11,65	540	59	12
9	2,50	14,15	1430	573,333	103,333
10	2,50	16,65	2366,667	1033,333	223,333
11	2,50	19,15	2200	930	273,333
12	2,50	21,65	1183,333	620	126,667
13	2,50	23,15	756,667	234	59
14	2,50	2,65	230	109,333	12,333

До першого дозування PTS вже спостерігалось певне незалежне від PTS-дозування вивільнення мікроорганізмів з біоплівки, тоді як біоплівка була помітно стабільною. Перше вимірювання в точці 0, ймовірно, є артефактом. Подібно до PTSO, PTS призводить до збільшення живих мікроорганізмів у надосадовій рідині, що свідчить про руйнування біоплівки. При більш високих дозах КУО знижується, що свідчить про те, що при більш високих дозах PTS впливає на планктонні мікроорганізми.

Знищення біоплівки за допомогою DPD

Біоплівку вирощували, як описано вище. Мікроскопічний аналіз показав, що біоплівка складається як з грибів, так і з бактерій. Аналіз мікробної популяції не проводився, оскільки не очікувалося істотних відмінностей щодо мікробної популяції біоплівки.

DPD додавали до культури, як зазначено в Таблиці 5. Під час перших 7 доз у реакторі була присутня біоплівка, яка візуально не зростала і не зменшувалася залежно від доданих доз DPD. Після 8-ої дози, загального додавання 167 мкл чистого DPD/літр культури (= 160 мг чистого DPD/літр) біоплівка почала вивільнятися зі скла та розчинялася в середовищі. Цей процес продовжувався до загального дозування 317 мкл чистого DPD/літр чистої культури. При більш високих дозуваннях на склі залишалися лише плями біоплівки, де була раніше товста біоплівка. Подальші додавання DPD не видалили залишок тонкої біоплівки.

Таблиця 5

Кількість вивільнених клітин під час солюбілізації гетеротрофно вирощеної біоплівки після додавання різних дозувань DPD. Кількість аеробних, анаеробних/мікроаерофільних і грибкових КУО відповідала стандартній робочій процедурі, як описано в даному документі

Доза DPD (мкл чистого DPD/літр культури)	Загальна доза DPD (кумулятивна) (мкл/л)	Аеробні КУО через 24 години (x 1000)	Анаеробні КУО через 24 години (x 1000)	Грибкові КУО через 24 години (x 1000)
0	0	413333	48333	31000
0,50	1	400000	45333	33333
1,00	2	440000	43333	29000

Таблиця 5

Кількість вивільнених клітин під час солюбілізації гетеротрофно вирощеної біоплівки після додавання різних дозувань DPD. Кількість аеробних, анаеробних/мікроаерофільних і грибкових КУО відповідала стандартній робочій процедурі, як описано в даному документі

Доза DPD (мкл чистого DPD/літр культури)	Загальна доза DPD (кумулятивна) (мкл/л)	Аеробні КУО через 24 години (x 1000)	Анаеробні КУО через 24 години (x 1000)	Грибкові КУО через 24 години (x 1000)
5,00	7	390000	43333	35000
10,00	17	403333	39333	25333
50,00	67	376667	40333	24000
50,00	117	426667	37667	22333
50,00	167	563333	43000	18333
50,00	217	1766667	267000	18667
50,00	267	1413333	340000	17000
50,00	317	936667	100000	223333
50,00	367	163333	35667	273333
50,00	417	107333	19333	24333
50,00	467	103333	9333	12667
50,00	517	98333	5467	8000

На підставі таблиці 5 виявляється, що DPD (зразкова сполука формули III) починає впливати на біоплівку після загальної дози приблизно 167 мкл/л. При більш високих концентраціях, анаеробні/мікроаерофільні та грибкові КУО зменшуються, що вказує на те, що при більш високих дозах DPD впливає на планктонні мікроорганізми.

Таблиця 6

Загальна кількість колонієутворюючих одиниць у біоплівках до та після обробки зазначеними сполуками в середовищі ФБР 0* означає: біоплівка зникла

Експеримент у ФБР	% об'єму біоплівки по відношенню до об'єму культури	Загальна кількість (вивільнена з біоплівки) колонієутворюючих одиниць/мл (x 1000)	
Експеримент 1 (PTSO) (гетеротрофна накопичувальна культура)		У біоплівці	У надосадовій рідині культури
До початком обробки	18	205 000	365
0,9 мг чистого PTSO/літр культури	0	0*	42 000
Експеримент 2 (PTS) (гетеротрофна накопичувальна культура)			
До початком обробки	11	36 000	2 068
20 мг чистого PTS/літр культури	0	0	3 403
Експеримент 3 (DPD) (гетеротрофна накопичувальна культура)			
До початком обробки	7	52 000	493
208 мг чистого DPD/літр культури	0	0	3 403

З даних таблиці 6 було несподівано продемонстровано, що, незважаючи на те, що варіація кількості мікроорганізмів, які виявлені в біоплівці, була високою, ймовірно через високу гетерогенність біоплівки, стало зрозуміло, що ефект знищення біоплівки зазначеними молекулами полягає не у солюбілізації біоплівки шляхом знищення мікроорганізмів з подальшим розчиненням біоплівки, а у зміні мікробної фізіології таким чином, що лише біоплівка була дестабілізована та розчинена.

Приклад 3 Дослідження біоплівки in vitro

Схема дослідження: утворення біоплівки вивчали з грампозитивним *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) і грамнегативною *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Ці зразки є потенційними патогенами, і ефект знищення біоплівки двох зразків, що містять PTSO, досліджувався *in vitro*.

Випробувані композиції мають наступний склад:

QS1: 236 мг рослинного екстракту, збагаченого PTSO/PTS, з 530 мг/літр PTSO і 133 мг/літр PTS змішували з 250 мл демінералізованої води.

QS2: 135 мг чистого PTSO, отриманого, як зазначено в прикладі 1, і розведеного в 250 мл демінералізованої води шляхом перемішування протягом ночі, що відповідає 540 мг/літр PTSO у воді.

Утворення біоплівки вивчали з використанням грампозитивного *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (*S. aureus*) і грамнегативної *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (*P. aeruginosa*). Експериментальний метод був адаптований з ASTM-E2799-17 (Стандартний метод тестування для тестування ефективності дезинфікуючого засобу проти біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* за допомогою аналізу [MBEC ASTM International, West Conshohocken, PA, 2017]. У цьому методі використовується *P. aeruginosa*, і в цьому прикладі той самий тест також було застосовано для перевірки впливу на *S. aureus*. Аналіз MBEC (мінімальна концентрація знищення біоплівки, англ.: Minimum Biofilm Eradication Concentration) - це високопродуктивний скринінговий інструмент для визначення ефективності агентів проти біоплівок різноманітних мікроорганізмів. Для перевірки впливу QS1 і QS2 на біоплівки, вирощені в 96-лункових планшетах, використовували два методи. На Фіг. 1A показано спосіб, який використовують для вимірювання біоплівок у мікротитраційних планшетах, а на Фіг. 1B показано спосіб вимірювання утворення біоплівки на кілках.

Коротко, нічну культуру *P. aeruginosa* та *S. aureus* розводили до 0,1 (OD600). Після цього бактеріальні суспензії вносили піпеткою в 96-лункові планшети в мінімальне або багате середовище у співвідношенні 1 до 9. Мінімальне середовище має наступний склад: казеїн, 0,5 %; глюкоза, 2 г/л; $MgSO_4$, 1 мМ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 мг/л. рН встановлювали на рівні рН 7,3 з подальшою стерилізацією. Збагачене середовище містить наступні поживні речовини: казеїновий пептон, 17 г/л; соєвий пептон, 3 г/л; дикалію гідрофосфат, 2,5 г/л; натрію хлорид, 5 г/л; глюкози моногідрат, 2,5 г/л. рН встановлювали на рівні 7,3 з подальшою стерилізацією. 96-лункові планшети інкубували протягом 24 годин при 37 °C і утворювалася біоплівка. Після цього біоплівку піддають впливу досліджуваних розчинів, як показано на Фіг. 1.

Раннє утворення біоплівки відбувається в період часу 0-24 години, пізнє утворення біоплівки відбувається в період 24-48 годин. Суспензію видаляють, а лунки/кілки промивають демінералізованою H_2O . Потім додають кристалічний фіолетовий (0,1 %) і забарвлюють протягом 15 хв; далі відбувається промивання демінералізованою H_2O . Відповідно, біоплівку знебарвлювали оцтовою кислотою і переносили на мікротитраційний планшет, як це було зроблено в прикладі 4. Поглинання вимірювали при 550 нм.

Результати і обговорення:

Аналіз MBEC використовувався для визначення впливу QS1 і QS2 на біоплівку (утворення), як показано на Фіг. 2. Результати показані у відсотках зростання (нормалізовані для бактерій без ефектора 100 %); додавання слова "кілок" (цифри) вказує на зростання на конусі з полістиролу; без "кілка" вказує на ріст всередині лунки традиційного мікротитраційного планшета. Як показано на Фіг. 2A (пізнє утворення біоплівки), спостерігалася пригнічення росту в лунках, коли QS1 і QS2 додавали в багате середовище для обох бактеріальних зразків. Крім того, додавання QS1 і QS2 призвело до пригнічення росту *P. aeruginosa* і *S. aureus* в лунках і на кілках в умовах мінімального середовища (Фіг. 2B).

Виходячи з аналізу біоплівки (адаптовано з ASTM-E2799), явні інгібуючі ефекти QS1 та QS2 на ріст біоплівки спостерігалися у *P. aeruginosa* та *S. aureus*. Біоплівки обох бактерій зазнали сильного впливу QS1 і QS2 у цьому аналізі під час утворення біоплівки.

Приклад 4 Дослідження біоплівки *in vitro*

Обсяг: як описано в цьому документі, дія сполуки проти планктонних мікроорганізмів не вказує на дію таких сполук проти біоплівки. Проте, були розроблені моделі *in vitro* для вивчення біоплішкових інфекцій, і результати таких моделей можуть краще передбачити ефект *in vivo*. Наприклад, Bahamondez-Canas et al. *Biomedicines*. 2019 Jun; 7(2): 34 описує низку моделей *in vitro* для вивчення ранової біоплішкової інфекції. У цьому прикладі проводилися експерименти *in vitro* з різними штамми потенційно патогенних бактерій [*Staphylococcus aureus* і *Streptococcus uberis*], мікробними зразками, які викликають мастит у корів, а також щодо [*Staphylococcus aureus*] у людей.

Схема дослідження:

У цьому прикладі були використані такі штами бактерій:

Staphylococcus aureus ATCC 25923, отриманий з колекції ATCC; *Staphylococcus aureus* 074, люб'язно наданий проф. Фінком, факультет ветеринарної медицини Утрехтського університету, Нідерланди, описаний як клінічний ізолят від корів з маститом. Інформація щодо штаму наведена далі в: [Melchior, M. B., Fink-Gremmels, J., & Gastra, W. (2006). Comparative Assessment of the Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis in Biofilm Versus Planktonic Culture.

Journal of Veterinary Medicine Series B, 53(7), 326-332; *Staphylococcus aureus* ATCC 15564, отриманий із колекції ATCC, і клінічний ізолят *Streptococcus uberis*] від корови з маститом, частина з колекції кафедри ветеринарної мікробіології, інфекційних та паразитарних хвороб Тракійського університету, Болгарія.

Мінімальну інгібуючу концентрацію біоплівки [MBIC, англ.: Minimum Biofilm Inhibitory Concentration] і мікротитраційну концентрацію знищення біоплівки [MBEC, англ.: Microtiter Biofilm Eradication concentration] визначають та вимірюють, як зазначено в таблиці 7.

Таблиця 7

Методи, застосовані для визначення MBIC 90 і MBEC у цьому дослідженні

Параметр	Посилання	Визначення
MBIC 90	Haney EF, Trimble MJ, Cheng JT, Vallé Q, Hancock REW. Critical Assessment of Methods to Quantify Biofilm Growth and Evaluate Antibiofilm Activity of Host Defence Peptides. <i>Biomolecules</i> . 2018 May 21;8(2):29.	Як найнижча концентрація, яка інгібувала щонайменше 90 % утворення біоплівки.
MBEC	Cruz CD, Shah S, Tammela P. Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for Gram-positive clinical reference strains. <i>BMC Microbiol</i> . 2018 Nov 3;18(1):173.	Мінімальна концентрація, необхідна для зменшення кількості клітин біоплівки нижче межі виявлення використовуваних аналізів

Застосовуючи методи, коротко описані в таблиці 7, вищезгадані бактерії тестували з рослинним екстрактом, збагаченим PTSO/PTS, чистим PTSO та чистим PTS, як описано в прикладі 1, і DPD, як описано в прикладі 2. Результати представлені в таблицях нижче.

Таблиця 8

MBIC 90 для штамів *Staphylococcus aureus* і *Streptococcus uberis*

Бактеріальні штами	Рослинний екстракт, збагачений PTSO/PTS, мкг/мл	DPD мкг/мл	PTSO мкг/мл	PTS мкг/мл
<i>St. aureus</i> ATCC 25923	64	>1024	128	128
<i>St. aureus</i> 074	64	>1024	128	128
<i>St. aureus</i> ATCC 15564	64	>1024	128	128
<i>Str. uberis</i>	>64	>1024	128	512

Таблиця 9

MBEC (знищення біоплівки) для штамів *Staphylococcus aureus* і *Streptococcus uberis*

Бактеріальні штами	Рослинний екстракт, збагачений PTSO/PTS, мкг/мл	DPD мкг/мл	PTSO мкг/мл	PTS мкг/мл
<i>St. aureus</i> ATCC 25923	512	>1024	512	>1024
<i>St. aureus</i> 074	512	1024	256	256
<i>St. aureus</i> ATCC 15564	512	>1024	256	256
<i>Str. uberis</i>	256	>1024	512	64-128

Найнижчі значення MBEC спостерігалися для рослинного екстракту, збагаченого PTSO/PTS, за яким йшли лише PTSO та лише PTS. Оскільки дані отримані за допомогою логарифмічної серії розведень, чисельна різниця представляє лише один крок розведення. У сукупності ці експерименти *in vitro* продемонстрували активність сполук за винаходом проти біоплівки, що підтверджується клінічними результатами, описаними в наступних прикладах.

Приклади 5-8: Лікування розладів, пов'язаних з біоплівкою, *in vivo*

Щоб продемонструвати *in vivo* ефекти описаних в даному документі сполук, PTSO та PTS були досліджені на ряді розладів, пов'язаних з біоплівкою, *in vivo*.

Мастит великої рогатої худоби - це захворювання, яке щорічно вражає мільйони корів у всьому світі. Хвороба спричинена великою кількістю різноманітних бактерій та в деяких випадках дріжджів, які вражають молочну залозу лактуючих корів, викликаючи персистуючу інфекцію та запальну реакцію. Мастит великої рогатої худоби може бути спричинений різними грампозитивними та грамнегативними патогенами, і поширеність окремих збудників може певною мірою відрізнятися в різних країнах і на континентах. Найбільш яскравою клінічною ознакою всіх форм маститу є небажане збільшення кількості соматичних клітин у молоці, призначеному для споживання людиною, спричинене (хронічною) запальною реакцією тканини вимені. Це вторинне запалення зменшує виробництво молока і, отже, спричиняє серйозні економічні втрати для фермера. За останні десятиліття на ринку з'явилися численні фармацевтичні продукти, що містять різні класи антибіотиків, які застосовують окремо або в комбінації для лікування основних інфекційних агентів, діагностованих як причина маститу. Ці фармацевтичні продукти вводять системно (шляхом ін'єкцій) або місцево через канал соска для боротьби з бактеріальними інфекціями. Однак, незважаючи на ці великі зусилля, мастит великої рогатої худоби залишається найпоширенішим захворюванням у молочних корів, оскільки антибіотикотерапія, як правило, лише тимчасово ефективна, і, за багатьох причин, кількість соматичних клітин (SCC, англ.: somatic cell counts), як клінічний маркер маститу, залишалася високою та негативно впливала на надой молока.

Мастит - це відомий розлад, пов'язаний з біоплівкою. Утворення бактеріальних біоплівок було продемонстровано в експериментах *in vitro* з культивуванням збудника маститу в умовах, що сприяють утворенню бактеріальної біоплівки (можна визначити після забарвлення та шляхом вимірювання генів, які керують утворенням біоплівки), а також шляхом *in situ* забарвлення матриці біоплівки в інфікованому вимені великої рогатої худоби. Наприклад, Фіг. 1 у Schönborn S and Krömker V [2016 Journal Veterinary Microbiology, 30;196:126-128], на якій зображено матрицю біоплівки з тканини вимені корів, які страждають на мастит.

Біомедичні дослідження останніх десятиліть показали, що утворення біоплівки відбувається не лише у випадках інфекції вимені та маститу великої рогатої худоби, але є загальною ознакою мікроорганізмів, що проникають у тканини людини та тварин і викликають персистуючі інфекції та запалення. На сьогоднішній день мікробні біоплівки є однією з головних невирішених проблем сучасної терапії інфекційних захворювань людей і тварин.

Клінічні докази, наведені в наведених нижче прикладах, виявили несподіваний терапевтичний ефект PTSO (і, меншою мірою, його похідного PTS) у лікуванні важливих біоплішкових захворювань, таких як бичачий мастит та інфіковані хронічні рани (наприклад, пальцевий дерматит і UCD). Описано кілька польових досліджень, які демонструють, що застосування PTSO безпосередньо пов'язане з тривалим стабільним зменшення кількості соматичних клітин у корів, які отримували лікування, що свідчить про лікування бактеріальної інфекції та регенерацію тканин. Подальші приклади описують вплив на хронічні рани, пов'язані з біоплівкою (тобто, пальцевий дерматит і дерматит ущелини вимені (UCD)).

Ці відкриття є чудовими, оскільки загальновизнано, що звичайні антибіотики не ефективні проти біоплішкових інфекцій. Ці спостереження описані в численних наукових статтях з медицини людини та ветеринарії, усі вони припускають, що утворення біоплівок є основною причиною рецидивуючих і персистуючих інфекцій, а також запалень і пошкоджень тканин. Представлена експериментальна (*in vitro*) та *in vivo* (клінічні спостереження) ефективність PTSO та PTS проти прототипних біоплішкових інфекцій демонструє, що ці сполуки можна ефективно використовувати в клінічній практиці для запобігання та лікування біоплішкових інфекцій. Утворення та розділення біоплівки відбувається як пряма взаємодія між молекулами та мікробами і тому не залежить від господаря (тварини чи людини). Оскільки механізм, який бере участь у формуванні біоплівки, є висококонсервативним у різних видів бактерій, можна також припустити, що сполуки ефективні проти широкого спектру біоплішкових інфекцій у людей і тварин. Приклади також демонструють, що PTSO та PTS можна вводити перорально та впливати на різні ділянки (наприклад, молочні залози та копита).

Приклад 5 Мастит

Обсяг

Були проведені експерименти, щоб перевірити вплив таблетки, яка містить 3,84 г PTSO плюс 0,96 грам PTS, на кількість клітин або кількість соматичних клітин (SCC) у молоці.

SCC пов'язаний з кількістю патогенів, які знаходяться в чверті, видимій для імунної системи. Кількість клітин у кожної корови вимірювали за допомогою реєстрації виробництва молока [MPR, англ.: milk production registration]. Таку MPR проводять періодично кожні 30-40 днів на всіх фермах.

Кількість соматичних клітин (SCC) є основним показником якості молока. Більшість соматичних клітин - це лейкоцити (білі кров'яні клітини), кількість яких стає все більшою в молоці, як правило, в результаті імунної відповіді на патоген, що викликає мастит, - невелика кількість епітеліальних клітин, які є клітинами, що виробляють молоко, що виділяються зсередини вимені, коли відбувається інфікування. Запалення часто відбувається в одній з чвертей вимені, що призводить до підвищення кількості клітин у цьому вимені. Однак через розбавлення іншими чвертями вимені загальне

збільшення кількості клітин буде нижчим. SCC кількісно визначається як кількість клітин на мл молока. SCC вказує на наявність (субклінічної) інфекції вимені з патогенами, що викликають, наприклад, мастит, і є основним показником якості молока. Взаємозв'язок SCC і маститу розглянуто в [Sharma et al., 2011 Asian-Aust J Anim Sci 24:429-438].

SCC і MPR

Дані SCC були отримані від реєстрації виробництва молока (MPR). MPR - це бази даних, що показують усі дані (наприклад, SCC) щодо виробленого молока від кожної окремої корови. MPR відібраних ферм були доступні періодично кожні 30-40 днів. SCC кількісно визначається як кількість клітин на мл молока. У загальних рисах: окрема корова зі значенням SCC 100000 або менше вказує на "неінфіковану" корову, і не було значних втрат продуктивності через субклінічний мастит. Порогове значення SCC у 150000 визначило б, чи заражена корова маститом. Корови з результатом понад 150000 мають високу ймовірність бути інфікованими принаймні на одній чверті. Корови, заражені значними патогенами, мають SCC 300000 або більше.

Приклади 5.1

Дослідження кількості клітин у 18 корів за допомогою описаного вище планшета.

Дослідження кількості клітин у 9 корів за допомогою вищеописаного планшета та порівняння з 11 коровами, які не отримували лікування.

Для дослідження було обрано три ферми. У таблиці 10 наведено інформацію про розміри ферм та вироблене молоко.

Таблиця 10

описи ферм, використаних у прикладі 5.1

	Ферма 1	Ферма 2	Ферма 3
Розмір ферми	550 корів	200 корів	250 корів
Кількість літрів (у середньому на корову на рік)	11,500 літрів	11,200 літрів	8,200 літрів
Середній відсоток жиру в молоці	4,0 %	4,6 %	4,3 %
Середній відсоток білка в молоці	3,5 %	3,7 %	3,5 %
Спосіб доїння	Роботизоване доїння	Роботизоване доїння	Роботизоване доїння
Доступ до вулиці	Так	Так	Так

Для введення таблетки відбирали корів із SCC перед лікуванням понад 250000 клітин/мл. З кожної ферми було відібрано таку кількість корів:

- На фермі 1: 6 корів;
- На фермі 2: 7 корів;
- На фермі 3: 5 корів.

В результаті вийшло 18 корів.

Дані SCC були проаналізовані до лікування та в 3-тю MPR після лікування.

Результати і обговорення

Кількість і середня кількість соматичних клітин у молоці від 18 корів наведено в таблиці 11. Після лікування всі корови мали кількість клітин нижче 150000 клітин/мл при MPR 3. MPR 3 настає приблизно через 80-100 днів після лікування. Загалом 60 % мали кількість клітин навіть нижчу за 100000 клітин/мл.

Таблиця 11

Кількість і середня кількість соматичних клітин (x 1000) у молоці від 18 корів

	номер корови	Кількість соматичних клітин			
		MPR 0	MPR 1	MPR 2	MPR 3
Ферма 1	корова 1	385	856	106	45
	корова 3	289	145	148	133
	корова 4	256	85	105	104
	корова 5	304	19	30	32
	корова 6	371	243	59	17
	корова 9	2354	1077	507	91
Ферма 2	корова 2	311	45	27	53
	корова 5	361	816	345	119

Таблиця 11

Кількість і середня кількість соматичних клітин (x 1000) у молоці від 18 корів

	номер корови	Кількість соматичних клітин			
	корова 6	444	168	356	17
	корова 8	473	126	139	115
	корова 10	265	18	33	131
	корова 11	414	124	623	198
	корова 12	318	507	84	46
Ферма 3	корова 1	3096	223	19	24
	корова 2	258	25	17	26
	корова 3	580	115	82	51
	корова 5	358	14	9	14
	корова 8	228	107	52	178
	Середнє	615	262	152	77

Висновок

Показано, що SCC у молоці знизилася у відібраних корів після лікування таблеткою. Це було дуже дивно, тому що це чітко показало, що PTISO/PTS поглинається кишківником, а потім потрапляє в кров. PTISO/PTS застосовували перорально в клінічних дослідженнях маститу, описаних в даному документі. Оскільки клінічно значущий ефект спостерігався в тканині вимені, це свідчить про те, що PTISO/PTS не тільки проходить через рубець (що свідчить про стійкість до мікроорганізмів рубця), але також досягає постпечінкового кровотоку (що свідчить про мінорну або незначну печінкову біотрансформацію та інактивацію), і в кінцевому підсумку молочної залози в концентрації, яка є терапевтично ефективною. Це приклад того, що таблетка ефективно зменшує SCC і, отже, має хороший терапевтичний ефект при інфекціях, пов'язаних з вименем. Крім того, усі корови продемонстрували нижчий SCC, ніж 150000 клітин/мл після MPR 3, що вказує на ефективність для всіх окремих корів у цьому дослідженні.

Приклад 5.2

Для аналізу використовували Ферму 1 і Ферму 2, як зазначено нижче. Коров відбирали на основі кількості клітин з MRP 0 (перед лікування). Від 200000 клітин/мл до 500000 клітин/мл корів отримували або не отримували таблетку, яка містила 3,84 г PTISO плюс 0,96 грам PTS за той самий період.

Для корів групи лікування було відібрано таку кількість корів:

Ферма 1: 5 корів

Ферма 2: 4 корів

Для корів групи без лікування було відібрано таку кількість корів:

Ферма 1: 5 корів

Ферма 2: 6 корів

Для групи лікування та групи без лікування було обрано рівень SCC 150000 клітин/мл на основі здорового максимального рівня клітин у молоці молодих корів (телиць). Відсоток корів нижче цього рівня наведено в таблиці 12. Результати показали, що відсоток корів нижче 150000 у групі лікування збільшується, тоді як у групі без лікування - ні. Група лікування нарешті досягає 100 % після MPR 4. Корови, які не отримували лікування, показали велике поширення SCC і не показали жодного значного зменшення кількості клітин.

Таблиця 12

Відсоток корів, у яких SCC нижча за 150000 клітин/мл з лікуванням і без нього, а також відповідне значення P. Не всі корови у дослідженнях були перевірені на SCC у кожній MPR: це вказано в останніх 2 колонках

	Відсоток з лікуванням нижче 150000 клітин/мл (середня SCC x 1000)	Відсоток без лікування нижче 150000 клітин/мл	значення P	Кількість корів, перевірених на SCC	Кількість корів, не перевірених на SCC
MPR 0 (перед лікуванням)	0 % (290)	0 % (290)		9	11
MPR1	89 %	36 %	0.028	9	11

Таблиця 12

Відсоток корів, у яких SCC нижча за 150000 клітин/мл з лікуванням і без нього, а також відповідне значення Р. Не всі корови у дослідженнях були перевірені на SCC у кожній MPR: це вказано в останніх 2 колонках

	Відсоток з лікуванням нижче 150000 клітин/мл (середня SCC x 1000)	Відсоток без лікування нижче 150000 клітин/мл	значення Р	Кількість корів, перевірених на SCC	Кількість корів, не перевірених на SCC
	(159)	(431)			
MPR2	89 % (111)	18 % (322)	0 005	9	11
MPR3	89 % (77)	33 % (212)	0 050	9	9
MPR4	100 % (75)	29 % (320)	0 021	7	7

Введення таблеток коровам із кількістю клітин у межах 200000-500000 клітин/мл чітко продемонструвало ефективність у зменшенні кількості соматичних клітин порівняно з коровами, які не отримували лікування.

Приклад 5.3

Дослідження проводилося на дев'яти фермах з використанням доїльних роботів, мінімальний розмір стада становив 80 корів (гольштинська порода). Були включені лише корови з підвищеною SCC. Вважається, що корови мають підвищену SCC, якщо вимірюється понад 300000 клітин на мл. Корови перебували на ранніх стадіях лактації до 5 місяців перед нелактаційним періодом. Таким чином за ними можна було стежити протягом більш тривалого періоду часу.

Дані SCC були зібрані на основі MPR. Корів, які отримували таблетку, що містить 3,84 г PTSC плюс 0,96 г PTS, аналізували на вплив на SCC. Далі оцінювали дані щодо кількості корів, у яких спостерігалось зменшення SCC, і загального зменшення кількості клітин. Крім того, було проведено порівняння між групами корів з різними стадіями лактації за наявності впливу віку.

Зменшення SCC після введення таблетки

Результати щодо кількості корів, які демонструють зменшення SCC на набір даних MPR, наведені в Таблиці 13. Перша MPR після прийому таблетки була доступна для всіх 63 корів. Для 44 корів введення таблетки ефективно зменшило SCC. Для 42 корів SCC була менша 300000 клітин. Друге вимірювання MPR було доступне для 48 корів. Для 31 корови SCC була нижча, ніж до прийому таблетки. Серед них 31 корова показала SCC меншу 300000 клітин. Третє вимірювання MPR доступне лише для 12 корів. З цих 12 корів у 9 корів все ще була нижча кількість клітин, ніж до введення таблетки.

Крім того, було також оцінено загальне зменшення кількості клітин. Результати першої MPR наведені в Таблиці 14, результати другої MPR - у Таблиці 15. Результати показують, що більшість корів, які демонструють зменшення SCC, віднесені до групи 100000-500000 клітин. Коли середнє зменшення SCC перед введенням таблетки порівнюють із середнім SCC після введення, середнє зменшення становить 250000 клітин/мл.

Таблиця 13

Кількість корів зі зменшеною кількістю клітин (SCC)

	Загальна кількість корів	Кількість зі зменшенням	Кількість корів < 300 тис. клітин
Перша MPR після таблетки	63	44	42
Друга MPR після таблетки	48	31	31
Третя MPR після таблетки	12	9	8

Таблиця 14

Зменшення кількості клітин при першій MPR

Зменшення в клітинах	Кількість корів	Відсоток
0-100000 клітин	11	17 %
100000-500000 клітин	19	30 %
> 501000 клітин	12	19 %
Без ефекту	21	33 %

Таблиця 15

Зменшення кількості клітин при другій MPR

Зменшення в клітинах	Кількість корів	Відсоток
0-100000 клітин	6	13 %
101000-500000 клітин	17	35 %
> 501000 клітин	8	17 %
Без ефекту	17	35 %

Стадія лактації

У молодих корів (перша або друга стадія лактації) після введення таблетки можливий більш виражений ефект зменшення SCC, ніж у старших тварин. З 63 корів, залучених у дослідження, 32 корови знаходяться в першій або другій лактації (молоді корови), тоді як інші 31 корови варіюються від третьої до шостої лактації. Серед корів, які перебувають у першій або другій лактації, 23 корови із 32 корів мають знижені рівні кількості клітин (72 %). З 31 корови, які вже мали кілька лактацій, 18 корів мали знижені рівні кількості клітин (58 %). Несподівано, це свідчить про те, що лікування має кращий ефект на корів, які перебувають у першій або другій лактації. Для молодших корів кількість клітин також залишалася нижчою після вимірювання другої MPR. Це чітко демонструє ефективність таблетки, що містить PTISO/PTS, щодо зменшення SCC, що вважається ознакою наявності (субклінічного) маститу.

Приклад 5.4

Молоко корів із підвищеними значеннями SCC досліджували на наявність біоплівки, які можна виділити з молока у вигляді пластівців. У свіжому молоці корови з підвищеною SCC були виділені пластівці. Зразки готували для мікроскопічного дослідження (забарвлювали стандартним забарвленням за Грамом і кристалічним фіолетовим) і спостерігали за допомогою флуоресцентного мікроскопа NIKON. Були виявлені бактерії. Біоплівку висівали на чашки з агаром і виділяли бактерії.

Для *Staphylococcus aureus* 100 мкл зразка молока висівали на агар Бейрда-Паркера з 5 % емульсією яєчного жовтка з 3,5 % L-телуриту. Чашки інкубували при 37 °C протягом 24 годин. Після цього чисту культуру ідентифікованої колонії *S. aureus* готували на агарі з овечою кров'ю. Щодо виділення *Streptococcus uberis*, 100 мкл зразка молока висівали на агар з овечою кров'ю з 10 мг/мл поліміксину та неоміцину та інкубували при 37 °C протягом 24 годин. Відібрали колонію та готували чисту культуру шляхом різних посівів на 5 % агар із овечої крові. Виділені штами заморожували в 1,5 мл середовища TSB (триптонний соєвий бульйон) з додаванням 20 % гліцерину. Ідентифікацію штаму проводили за допомогою Vitek2 [Biomérieux Benelux B.V., Амерсфорт, Нідерланди].

Для приготування біоплівки клітини розводили до концентрації 10^8 КУО/мл у середовищі TSB. 20 мкл переносили в 180 мкл середовища TSB, що містить 2 г/л глюкози, в 96-лунковому планшеті. Планшети інкубували при 37 °C протягом 5 днів без укладання. Після цього надлишок середовища видаляли, а біоплівку промивали надлишком фосфатно-сольового буферу ФСБ. Лунки висушували на повітрі та готували до мікроскопічного забарвлення та аналізу, як описано вище.

Вплив на молоко спостерігали протягом кількох днів після введення корові таблетки PTISO/PTS (3,84 г PTISO плюс 0,96 грам PTS).

Результати і обговорення

Мікроскопічне спостереження біоплівки, виділеної з молока, чітко продемонструвало наявність клітин, пов'язаних з біоплівкою. Ці клітини використовувалися для приготування чистих культур і були ідентифіковані як *S. aureus* і *S. uberis*. Потім біоплівки культивували *in vitro*. Це чітко продемонструвало участь біоплівок у маститних інфекціях.

Невдовзі після введення корові таблетки PTISO/PTS молоко від корови, яка отримувала лікування, містило грудочки, коли виходило з вимені (Fig. 3A і B). Протягом декількох днів з вимені йде молоко з грудочками, після чого корова знову починає виробляти нормальне молоко. Після цього червоний

інфекційний колір вимені зник, а SCC значно зменшилась протягом наступних тижнів. Вищеописані спостереження є звичайним процесом загоєння маститу після прийому таблетки PTSO/PTS.

Приклад 5.5

Кількість клітин є важливим показником здоров'я вимені, і його вимірюють для вивчення впливу таблетки, яка містить 3,84 г PTSO плюс 0,96 грам PTS, на здоров'я вимені. Досліджували дві групи по 20 корів з двох різних ферм. Корів відбирають, коли кількість клітин перевищує межу 250000 клітин/мл на останній або передостанній MPR. У кожної корови досліджуваної групи беруть пробу перед тим, як давати таблетку PTSO/PTS. Після отримання таблетки у корови брали зразки один раз на тиждень і зразок аналізували на кількість соматичних клітин протягом трьох місяців, а аналіз на кількість клітин проводили щотижня протягом трьох місяців.

Середня кількість клітин для обох ферм, вимірювана щотижня, наведена в таблиці 16.

Таблиця 16

Середня кількість клітин, виміряна на фермі 1 і фермі 2 протягом трьох місяців

Тиждень	Кількість клітин - ферма 1 (x 1000 клітин/мл)	Кількість клітин - ферма 2 (x 1000 клітин/мл)
0	742	562
1	797	1487
2	988	1410
3	816	739
4	1162	1102
5	530	676
6	409	936
7	201	738
8	169	292
9	180	312
10	273	200
11	242	403
12	206	389

Результати обох ферм вказують на швидке зменшення кількості клітин протягом перших приблизно шести тижнів з подальшим поступовим зменшенням через сім тижнів. Що відповідає очікуваному ефекту дози. Висновок полягав у тому, що після лікування першою дозою таблетки PTSO/PTS у корів із кількістю клітин вище 250000 клітин/мл спостерігалось значне зменшення кількості клітин приблизно до 250000 клітин/мл. З цього прикладу було продемонстровано, що вплив на зменшення SCC був надзвичайно тривалим.

Приклад 5.6

Чотири окремі ферми та загалом 47 корів досліджували вплив таблетки, яка містить 3,84 г PTSO плюс 0,96 грам PTS, на SCC.

Схема дослідження

Ферма 1: 11 корів, загалом 3 MPR після першого лікування.

Ферма 2: 8 корів, загалом 9 MPR після першого лікування.

Ферма 3: 16 корів, загалом 13 MPR після першого лікування.

Ферма 4: 12 корів, загалом 2 MPR після першого лікування.

Додаткові дані про ферми наведені в таблиці 17.

Таблиця 17

Дані ферм 1 - 4

	Ферма 1	Ферма 2	Ферма 3	Ферма 4
Розмір ферми	170 корів	200 корів	100 корів	250 корів
Кількість літрів (у середньому на корову на рік)	8000 літрів	11200 літрів	9000 літрів	10000 літрів
Спосіб доїння	Доїння в доїльних залах	Роботизоване доїння	Доїння в доїльних залах	Роторне доїння
Доступ до вулиці	Так	Так	Так	Так

Результати і обговорення

У таблиці 18 наведено середню кількість клітин в молоці з окремих ферм.

Таблиця 18

	MPR 0	MPR 1	MPR 2	MPR 3	MPR 4
середнє	1856,787	707,5319	447,3261	225,3438	213,7727
кількість корів	47	47	46	32	22

У всіх випадках кількість SCC знижується після лікування. Для Ферми 2 і 3 були доступні множинні MPR, які показували стабільно низьке значення SCC. Це вказує на ефективність таблетки щодо зменшення SCC протягом більш тривалого періоду часу.

Приклад 5.7

На одній фермі з 5500 корів у Хенфорді, штат Каліфорнія, щомісяця вимірювали кількість соматичних клітин і статистику виробництва молока, щоб вивчити вплив таблетки, яка містить 3,84 г PTISO плюс 0,96 грам PTS, на здоров'я вимені. Корів відбирали на основі різних критеріїв, як зазначено нижче, і лікували, як зазначено нижче. Було перевірено ефективність таблетки PTISO/PTS порівняно з контрольною групою щодо зменшення SCC.

Цілі полягали в тому, щоб дослідити, чи були значні відмінності при порівнянні наступних груп після лікування:

- Нижча загальна середня SCC у групі лікування PTISO/PTS порівняно з контрольною групою
- Більше корів з показником нижче 200 тис. у групі лікування PTISO/PTS порівняно з контрольною групою
- Більше корів з показником нижче 100 тис. у групі лікування PTISO/PTS порівняно з контрольною групою

Спочатку корів розділили на такі групи:

Критерії відбору для випробувань на фермі з використанням PTISO/PTS для підтримки корів із субклінічною високою SCC

- Поточна SCC >200000 (SCC>200)
- Попередня SCC >200000 (PSCC>200)
- Тварини 1-ї та 2-ї лактації (LACT<3)
- Кількість разів лікування маститу (XMAST) <3
- Не корови "не для розведення"
- Не протягом 60 днів сухостою. DCC<145 (це означає кількість днів виношування теляти (поточна тривалість вагітності вагітних тварин). Потрібні були принаймні 2 місяці додаткових днів тестування для даних SCC, щоб корови не були сухостійними, перш ніж ми отримаємо дані.
- Розділені на дві рівні групи.
- Відсортовані за лактацією, у межах лактації сортування за SCC, потім призначення групи AABV, тощо.

- Зрівняні групи для лактації, SCC, PSCC, XMAST, ECM (=Молоко з корекцією енергетичної цінності. Формула, яка стандартизує обсяг виробництва на основі вмісту жиру та білка в молоці. Використовується для порівняння корів/стад з різною продуктивністю та компонентами молока. Наприклад, це дозволяє порівняти корову дуже високої продуктивності з низьким вмістом жиру та протеїну з коровою нижчої продуктивності з високим вмістом жиру та білка), тощо.

Загалом було відібрано 100 корів, 50 корів було відібрано для лікування однією таблеткою PTISO/PTO, а 50 корів не лікували та використовували для порівняння (контроль).

Через 6 тижнів середня SCC у групі лікування PTISO/PTS (323 тис.) була на 38 % нижча, ніж у контрольній групі (523 тис.), і було значно більше корів з SCC менше 200 тис. (24 корови, які отримували лікування, порівняно з 15 контрольними коровами) і з SCC менше 100 тис. (13 корів, які отримували лікування, порівняно з 7 контрольними коровами).

Приклад 5.8

На трьох фермах у Нідерландах вісімнадцять корів із підвищеною кількістю соматичних клітин (>200000 клітин/мл), що вказує на мастит, були відібрані для отримання таблетки, яка містить 3,84 г PTISO плюс 0,96 грам PTS. Кількість соматичних клітин вимірювали тричі з регулярними інтервалами в тридцять днів. Перед лікуванням у вісімнадцяти корів середня кількість соматичних клітин перевищувала 600000 клітин/мл. Під час першого вимірювання середня кількість соматичних клітин була нижчою за 300000 клітин/мл, що є більш ніж п'ятдесятивідсотковим покращенням. У другу дату вимірювання середнє значення для групи було нижчим за порогове значення 200000 клітин/мл, при якому корову вважали інфікованою. Третій цикл вимірювань показав, що середнє значення знизилося

до 100000 клітин/мл. Ці корови, офіційно помічені як такі, що мають високу кількість соматичних клітин, тепер виробляють молоко, яке може мати найвищу ціну.

Приклад 5.9

У другому випробуванні, проведеному на молочній фермі іншого клієнта, результати лікування таблеткою, що містить 3,84 г PTISO плюс 0,96 грам PTS, порівнювали з коровами, які отримували стандартне лікування сухостійних корів антибіотиками (контрольні корови). Подібно до прикладу 5.8, обидві групи складалися з корів, які мали початкову високу кількість соматичних клітин. Дев'ять корів були відібрані для прийому таблеток PTISO/PTS, а 11 корів були відібрані для дослідження як контроль (див. таблицю 19). Кількість соматичних клітин учасників вимірювали через регулярні проміжки часу для загальному 3 зборів даних. На першу дату вимірювання після лікування (MPR 1) 89 відсотків корів, які отримували PTISO/PTS, показали кількість соматичних клітин нижче 150000 клітин/мл порівняно з 36 відсотками корів контрольної групи. Під час четвертого вимірювання всі корови, які отримували PTISO/PTS, знизили кількість соматичних клітин до рівня нижче 150000 клітин/мл, порівняно з лише 29 відсотками корів, які отримували традиційне лікування.

Таблиця 19

	% , які отримували лікування, з SCC нижче 150 тис.	% контролю з SCC нижче 150 тис.	значення Р	Кількість корів, які отримували лікування	Кількість контрольних корів
MPR 0 (перед лікуванням)	0	0		9	11
MPR 1	89	36	0,028	9	11
MPR 2	89	18	0,005	9	11
MPR 3	89	33	0,050	9	9
MPR 4	100	29	0,021	7	7

Приклад 5.10

На чотирьох фермах вимірювали зміну кількості соматичних клітин у корів із підвищеними результатами тестування з часом. Перед лікуванням у вибраних корів на першій фермі (n=11) середня кількість соматичних клітин становила понад 3500000 клітин/мл, у вибраних корів на другій фермі (n=8) середня кількість соматичних клітин становила майже 600000 клітин/мл, у вибраних корів на третій фермі (n=16) середня кількість соматичних клітин становила майже 893000 клітин/мл, а у вибраних корів на четвертій фермі (n=12) середня кількість соматичних клітин становила 2288000 клітин/мл. Кількість клітин вимірювали під час щомісячної реєстрації молочних продуктів. Лікування таблеткою, яка містить 3,84 г PTISO плюс 0,96 грам PTS (1 на корову), відбувалося між MPR 0 і MPR 1. Середня кількість соматичних клітин для відібраних корів значно знизилася на всіх фермах до MPR 1. До MPR 3 78 % усіх відібраних корів мали кількість соматичних клітин нижче 250000 клітин/мл. Середня SCC для всіх корів була нижче 200000 клітин/мл через 4 місяці після лікування та залишалася нижче 200000 клітин/мл протягом усього періоду тестування (тобто, щонайменше до 6 місяців після лікування).

Приклад 5.11

Ефективна альтернатива традиційній терапії сухостійних корів [DCT, англ.: Dry Cow Therapy]

У незалежному дослідженні, проведеному в Уотерфордському технологічному інституті, PTISO/PTS були випробувані як альтернативне сухостійне лікування. 17 корів отримували таблетку PTISO/PTS, тоді як шістнадцять корів отримували традиційне сухостійне лікування. Таблетка PTISO/PTS містить 3,84 г PTISO плюс 0,96 грам PTS і була введена за 3 тижні до сухостою. Контрольна група в той же день отримала традиційне лікування, яке включало звичайний антибіотик, який використовувався для сухостійної терапії. Порівнюючи ці два методи сухостою, заразилися 23,5 % корів, які отримували PTISO/PTS, порівняно з 60 % корів, які отримували традиційне лікування. Коров було розділено на три групи: корови з низькою кількістю соматичних клітин (<200000), корови із середньою кількістю соматичних клітин (200000-400000) і корови з високою кількістю соматичних клітин (>400000). Коли корів класифікували на основі кількості їх соматичних клітин перед сухостоєм, лікування PTISO/PTS було успішним у 92,9 % (13 з 14 корів) корів з низьким рівнем SCC, тоді як загальна DCT була успішною лише для лікування 50 % (6 з 12 корів) цієї популяції. Результати групи із середньою кількістю соматичних клітин були подібними до корів із низькою кількістю соматичних клітин. Для корів із високою кількістю соматичних клітин таблетка PTISO/PTS була ефективною терапією сухостійних корів у 50 % (1/2) корів, а загальна DCT була ефективною у 50 % (1 з 2) корів. Це включало особливу корову, яка отримувала лікування PTISO/PTS, у якої кількість соматичних клітин становила 9993400

клітин/мл. Ця корова показала зменшення на 146 %, отелення з кількістю соматичних клітин 1560000 клітин/мл, і їх кількість продовжувала зменшуватися протягом наступних дванадцяти тижнів без подальшого лікування.

Приклад 5.12

Дослідження було проведено сторонньою клінікою для оцінки таблетки PTSO/PTS. Загалом у 16 тварин на 5 фермах спостерігали за змінами високої кількості клітин після введення таблетки, яка містить 3,84 г PTSO плюс 0,96 грам PTS. 14 тварин завершили дослідження. У середньому на 44 було продемонстровано середнє зменшення кількості клітин на 45 % (з 685000 до 378000).

Крім того, була проведена оцінка виявлення та персистенції патогена в окремих чвертях. Відібрали зразки з 20 чвертей із підвищеною кількістю клітин від 19 корів із 6 ферм та культивували. На 1 добу різні патогени [*Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* та ін.] були виявлені у 12 чвертях, а у 8 чвертях патогенів не виявлено. З 12 чвертей із виявленими патогенами на 42-й день патогени були виявлені лише у 4 чвертях і жодного у 8 чвертях. Це відповідає зменшенню патогенів на 67 %.

Приклад 5.12

У практичному дослідженні субклінічного маститу, проведеному у Верхній Баварії, загалом у 14 корів із маститом були наявні зміни щодо розвитку кількості клітин перед та після введення таблетки, яка містить 3,84 г PTSO плюс 0,96 грам PTS. Крім того, перевіряли наявність і кількість патогенів після лікування через різні проміжки часу у вибраних чвертях вимені.

Схема дослідження

Кількість клітин є важливим показником здоров'я вимені, і його вимірюють для вивчення впливу таблетки, яка містить 3,84 г PTSO плюс 0,96 грам PTS, на здоров'я вимені 14 тварин на 5-ти фермах. Корів відбирали, коли кількість клітин перевищує межу 250000 клітин/мл на останній або передостанній MPR. У кожної корови досліджуваної групи брали зразки молока перед введенням таблетки. Після лікування у корів через відповідні проміжки часу відбирали зразки, і зразки аналізували на кількість соматичних клітин і інфікованих чвертей у вимені. Крім того, було ідентифіковано мікробні патогенні зразки та визначено кількість через відповідні проміжки часу.

Результати і обговорення

У таблиці 20 представлені результати вимірювань щодо кількості соматичних клітин, виявлених патогенів через різні проміжки часу після лікування. Перед лікуванням кількість клітин була вище 250000/мл, що переконливо вказувало на наявність інфекції, і у більшості корів кількість зростала. Лікування проводилося між MPR-0 і MPR+1. Після лікування від інфекцій на t=0 спостерігалось зменшення наявності патогена з 10 чвертей з виявленням патогена на 1-й день до 7 чвертей на 14/15 день. Патогени все ще спостерігалися (зменшення на 3 чверті, що відповідає 30 %), і на 42/43/44 день вихідні патогени все ще були виявлені в 3 чвертях, що відповідало зменшенню на 7 чвертей (70 %) від початково інфікованих чвертей. Однак у проміжок часу експерименту 7 корів були інфіковані іншими патогенними бактеріями, і цих корів довелося повторно лікувати (результати не показані). У всіх корів кількість соматичних клітин знизилася на 7-й день після лікування. Оскільки SCC є загальноновизнаним показником рівня запалення, лікування мало явний пригнічуючий ефект на запалення. Цікаво, що кількість SCC була значно зменшена вже на 7-й день після лікування, а через 36-55 днів було продемонстровано середнє зменшення кількості клітин на 45 % (з 685000 до 378000 клітин/мл).

Однак у більшості випадків патогенів все ж вдалося виявити. Крім того, грудки біоплівки залишали вим'я з 2-го дня з високою швидкістю та були повністю видалені. Це чітко вказувало на те, що за запалення відповідає біоплівка, а не планктонні клітини, які все ще присутні у вимені. Кількість планктонних клітин з часом зменшувалась, поки їх не можна було виявити, і це зменшення може бути викликано лише відповіддю на дію імунної системи. Це продемонструвало, що видалення біоплівки без знищення клітин достатньо для боротьби з запаленням, а імунна система відповідає за боротьбу з інфекцією.

Таблиця 20

Розвиток кількості соматичних клітин на корову та наявність патогенів на чверті вимені після лікування таблетками, які містять 3,84 г PTSO плюс 0,96 грам PTS

Ферма	номер корови	MPR* - 2	MPR - 1	MPR - 0	MPR + 1**
1	1	70	137	456	382
	2	38	238	388	126
	3	195	356	366	264
2	4	25	40	2244	553

Розвиток кількості соматичних клітин на корову та наявність патогенів на чверті вимені після лікування таблетками, які містять 3,84 г PTISO плюс 0,96 грам PTS

Ферма	номер корови	MPR* - 2	MPR - 1	MPR - 0	MPR + 1**
	5	292	1726	1320	1076
	6	31	262	733	491
3	7	173	1303	453	251
	8	233	423	403	342
	9	92	598	445	263
	10	93	123	407	275
	11	56	26	579	317
4	12	2540	749	502	348
	13	н.р.***	577	636	224
5	14	369	466	658	374

*: MPR (реєстрації виробництва молока) x 1000; **, MPR на 7 добу

Крім того, була проведена оцінка виявлення патогена (збудника) або персистенції патогена в окремих чвертях. Досліджували 20 чвертей з підвищеною кількістю клітин від 19 корів із 6 ферм (зразок молока, культуральний підхід). На 1 добу різні патогени [*Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* та ін.] були виявлені у 12 чвертях, а у 8 чвертях патогенів не виявлено. З 12 чвертей із виявленими патогенами у 1-й день, на 42-й день патогени були виявлені лише у 4 чвертях і жодного у 8 чвертях. Це відповідає зменшенню патогенів на 67 %.

З цього експерименту ясно, що PTISO/PTS поглинається кишківником і транспортується до молочних залоз. Після цього PTISO/PTS потрапляє в біоплівку (яку можна вважати своєрідною "фортецею", в якій ховаються бактерії) у концентраціях, які є достатньо високими, щоб відбулося вивільнення біоплівки. Хоча точний механізм, за допомогою якого відбувається процес розчинення та відокремлення біоплівки, неясний, несподівано сполуки викликають такий ефект.

Приклад 6 *Prototheca*

Дуже смертельний варіант маститу викликають мікроводорості *Prototheca* spp., що утворюють біоплівку [Conçalves et al., 2015, Dairy Sci 98 (6): 3613-3621. Valessa et al, Cienc. Rural vol.49 no.2 Santa Maria Feb 28, 2019]. Випадки маститу, спричиненого *Prototheca zopfii*, описані у різних країнах і зростають в усьому світі та є серйозною проблемою через притаманну резистентність цих мікроводоростей до звичайної терапії [Pieper et al., 2012. J. Dairy Sci. 95:5635-5644]. Ця резистентність пов'язана зі здатністю інфікувати та виживати в макрофагах, а також вторгтися в тканини молочної залози, що робить їх відповідальними за персистуючу інфекцію з регулярною появою *P. zopfii* в молоці [Marques et al., 2006, J. Dairy Sci. 89:4202-4204]. Крім того, помічено, що вони можуть утворювати біоплівки у вимені [Shahid et al. 2020, Sci Rep 10, 698].

Передача *Prototheca* spp. відбувається між інфікованими та здоровими коровами під час доїння, регулярного та інтенсивного лікування антибіотиками [Pieper et al., 2012], та відсутності гігієни під час підготовки корів до доїння. Крім того, *P. zopfii* виживає у фекаліях і забруднює кожне середовище.

У молочному середовищі такі поверхні, як нержавіюча сталь, скло, гума та поліпропілен, заражені мікроорганізмами. Згодом мікроорганізми можуть розмножуватися та виробляти біоплівки на цих поверхнях [Davies, 2003. Nat. Rev. Drug Discov. 2:114-122].

Лікування маститу, викликаного *Prototheca* spp., антибіотиками викликає лише тимчасове покращення інфекції *Prototheca* spp. in vivo, а збудник не усувається [Costa et al., 1996. Mycopathologia 133:85-88]. Тому вибракування корів, інфікованих *P. zopfii*, є одним із рекомендованих, якщо не єдиним, заходом контролю для зменшення захворювання.

Обсяг: У практичному дослідженні (суб)клінічного маститу, проведеному у Верхній Баварії, загалом у 14 корів із маститом були наявні зміни щодо розвитку кількості клітин перед та після введення таблетки, яка містить 4,8 г PTISO плюс 1,2 грам PTS. Крім того, перевіряли наявність і кількість *Prototheca* після лікування через різні проміжки часу у вибраних чвертях вимені.

Схема дослідження

Кількість клітин є важливим показником здоров'я вимені, і його вимірюють для вивчення впливу таблеток PTISO/PTS на здоров'я вимені 44 тварин. Корів відбирали, коли кількість клітин перевищувала межу 250000 клітин/мл під час останньої MPR у молоці, і в молоці була виявлена мікроводорість *Prototheca*. Після цього таблетка PTISO/PTS була введена. Після обробки у корів відбирали зразки один раз на місяць, і в кінці експерименту зразок аналізували на кількість клітин і наявність мікроводоростей *Prototheca* у вимені.

Результати і обговорення

У таблиці 21 представлені результати вимірювань щодо кількості підрахунків соматичних клітин за час і присутності Protothesa наприкінці експерименту.

Таблиця 21

Кількість соматичних клітин (SCC) і зміни SCC з часом після лікування таблетками PISO/PTS, і присутність Protothesa наприкінці експерименту

Номер корови	SCC t=0	SCC t=1 місяць	SCC t=2 місяці	SCC t=1 мінус SCC t=2	Виявлення Protothesa
837	1146	3528	3012	516	+
4631	5011	3497	2975	522	+
4827	1877	3190	453	2737	+
4927	4358	671	2177	-1506	+
4941	2190	3401	2151	1250	+
5027	2473	3997	3063	934	-
5083	3784	1162	3804	-2642	+
5116	530	617	280	337	+
5147	542	488	414	-74	-
5470	582	539	132	-407	-
5485	1511	1059	383	-676	-
5505	1109	5404	1491	3913	+
5544	246	197	124	-73	-
5581	436	423	696	-237	-
5586	4052	3994	2847	1147	+
5674	3370	2645	3649	-1004	+
5706	3186	2552	640	1912	+
5807	931	1292	1152	140	+
5841	652	62	220	-158	+
5880	1030	637	431	206	-
5889	1427	2027	352	1675	-
5916	1811	285	442	-157	-
5945	1078	370	162	208	-
5998	2944	951	1433	-482	-
6011	960	691	158	533	-
6026	1699	1386	1284	102	+
6041	4586	5176	7009	-1833	-
6078	650	238	113	125	-
6081	2951	2627	1374	1253	+
6131	708	564	191	373	-
6140	1731	48	466	-418	-
6152	1114	1479	1101	378	-
6181	1462	1366	2918	-1552	+
6182	1901	2423	1821	602	+
6186	1209	1849	625	1224	+
6192	3522	5401	6439	-1038	-
6195	3935	4432	2535	1897	-
6230	1528	895	487	408	-
6241	1892	1456	203	1253	-
6252	3211	3034	2802	232	+
6275	511	404	689	-285	-
6282	522	1562	1312	250	-
6556	2438	3355	1745	1610	-

*: MPR (реєстрації виробництва молока) x 1000; **: MPR на 7 добу; ***:

Перед лікуванням кількість клітин була вище 250000 клітин/мл, що переконливо вказувало на наявність інфекції, і у більшості корів кількість зростала. У всіх корів кількість соматичних клітин знизилася на 7-й день після лікування. Оскільки SCC є мірою рівня запалення як наслідку інфекції, лікування мало явний пригнічуючий ефект на запалення. Цікаво, що кількість SCC була значно

зменшена вже на 7-й день після лікування, а через 36-55 днів було продемонстровано середнє зменшення кількості клітин на 45 % (з 685000 до 378000 клітин/мл).

Крім того, була проведена оцінка виявлення патогена (збудника) або персистенції патогена в окремих чвертях. Досліджували 20 чвертей з підвищеною кількістю клітин від 19 корів із 6 ферм (зразок молока, культуральний підхід). На 1 добу різні патогени [*Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* та ін.] були виявлені у 12 чвертях, а у 8 чвертях патогенів не виявлено. З 12 чвертей із виявленими патогенами у 1-й день, на 42-й день патогени були виявлені лише у 4 чвертях і жодного у 8 чвертях. Це відповідає зменшенню патогенів на 67 %.

Зараження вимені мікрододорістю *Prototheca* зазвичай призводить до вибракування корів, оскільки водорість нечутлива до більшості антибіотиків. Неочікувано виявилось, що PTSO/PTS повністю усуває інфекцію, і вибракування не було необхідним.

Приклад 7 Пальцевий дерматит

Ще однією категорією хронічних інфекцій є рани, інфіковані мікроорганізмами, що утворюють біоплівки. Після інфікування рани мікроорганізми починають утворювати біоплівку, яка залишається прикріпленою до ран. Виробництво мікробного EPS (позаклітинних полімерних речовин, англ.: Extracellular Polymeric Substances) допомагає біоплівці сформувати складну тривимірну структуру протягом кількох годин. Ці складні структури резистентні до захисних механізмів у рані. Коли для боротьби з бактеріями застосовують антибіотики, вони можуть лише частково знищити біоплівку, а рана та підлеглі тканини залишаються інфікованими. Відомо, що ці біоплівки призводять до хронічних інфекцій і незагоєваних ран. У Сполучених Штатах щороку діагностують близько 16 мільйонів нових інфекцій, викликаних біоплівкою. Таким чином, біоплівки є основною перешкодою для загоєння ран. Прикладами таких інфікуючих рани патогенних мікроорганізмів є бактерії (грампозитивні бактерії, наприклад, [*Staphylococcus aureus*; *Streptococci*; грамнегативні бактерії, наприклад, *Treponema* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*; дріжджі/гриби, наприклад, *Candida* spp. (*albicans*), *Cladosporidium herbarum*, *Trichosporum*, *Rhodosporidium*, *Malassezia*].

Одним із прикладів ранової інфекції, яка негативно впливає на молочну продуктивність корів, є пальцевий дерматит [Schlafer et al, 2008 *Veterinary Microbiology* 128, Issues 1-2: 118-125]. Пальцевий дерматит (синоніми: волохаті п'яткові бородавки, полунична копитна гниль, хвороба Мортелларо, італійська копитна гниль, папіломатозний пальцевий дерматит) - це інфекція, яка викликає кульгавість великої рогатої худоби. Ураження пальцевого дерматиту є виразковими або проліферативними утвореннями між цибулинами [Beninger, 2018 et al, *Vet Res* 49:111]. Витрати на лікування пальцевого дерматиту становлять 75 доларів США на корову на рік для ферми з 65 коровами [Bruijn et al., 2010, *J. of Dairy Science* Volume 93, Issue 6, 2419-2432]. Витрати базуються на передчасному вибракуванні, втраті молока та зниженні фертильності.

Пальцевий дерматит викликають аерофільні або анаеробні бактерії [Beninger, 2018 et al, *Vet Res* 49:111], зокрема *Treponema* spp. (Demirkan et al. 2018 *J. of Dairy Science* vol 101 (11) p. 10317 – 10326]. Як правило, інфекція починається з *Treponema* spp. які проникають в шкіру навколо копит. *Treponema* spp. є анаеробними грамнегативними бактеріями і належать до спірохет. Ці мікроорганізми здатні проникати в шкіру корів біля копит, переважно між копитцями у міжпальцевій щілині. Біоплівки, які розвиваються з цих осередків дерматиту, являють собою гетерогенну мікробіологічну спільноту.

Бактерії, такі як *Treponema*, присутні в коров'ячій паті або в посліді жуйних тварин і вважаються джерелом пальцевого дерматиту. Корова з добре функціонуючою імунною системою менш чутлива до пальцевого дерматиту. Житло, гігієна, вентиляція та харчування також важливі.

Формалінові ванночки для ніг мають профілактичний ефект при пальцевих дерматитах і часто застосовуються. Однак з формаліну відомо, що він несприятливий для здоров'я корови і фермера. Якщо на копитах є пальцевий дерматит, після підрізання копита необхідно ретельно висушити та очистити, а потім дезінфікувати копита у ванні для ніг раз на два тижні. Крім того, потім уражену шкіру зазвичай обробляють спреєм, що містить антибіотики, і таким чином можна досягти позитивних результатів. Однак часто в рані утворюється тонкий шар або плями біоплівки, в яких мікробні клітини знаходяться в сплячому стані. Лише частина бактеріальної популяції гине під час лікування (антибіотиками), тоді як інші клітини починають розмножуватися після закінчення лікування. Крім того, зазвичай інфекція проникає глибоко в шкіру коріуму, де утворюються локальні біоплівки, а великі молекули антибіотиків слабко ефективні. Крім того, селективний тиск застосовується до інших форм резистентності до антибіотиків, окрім стану спокою клітин у тканинах і біошарах. З цих причин більшість способів лікування та стратегій мають незначний ефект або зовсім не впливають на полегшення стану при пальцевому дерматиті.

Схема дослідження

Експерименти проводять на трьох окремих фермах, щоб перевірити дію двох спреїв, розроблених для лікування ран і поранень (спрей №1 і спрей №2-PTSO). Обидва спреї мають однаковий склад, за винятком того, що спрей №2-PTSO також містить PTSO (3,2 % PTSO мас./мас.). 0,35 мл розпилюють на рану за одну обробку.

Корів на 13 фермах відібрано за наявністю пальцевого дерматиту. Ці корови з пальцевим дерматитом були відібрані та оцінені за локомоцією та їх М-оцінками. Для класифікації інфекції пальцевого дерматиту було описано 6 класів [Dopfer et al., 1997] [Berry et al., 2012]. Опис М-оцінок такий: М0 - здорові; М1 (рання стадія), невелике почервоніння і чутливість, але активне запалення, мінімальне поранення 0-2 см; М2, полуничне-червоне та дуже чутливе поранення з білим епітеліальним краєм і стирчащим волоссям, тому дуже активне запалення >2 см; М3 (стадія загоєння), виразкове ураження, покриті струпом; М4, перехід у хронічну виразку; М4.1, комбінація М4 і М1, хронічна фаза з розпухлою копитною щілиною. Оцінки локомоції визначають таким чином: 1, немає кульгавості, ходить з прямою спиною; 2, легка кульгавість, ходить з трохи згорбленою спиною; 3, сильна кульгавість і зігнута спина під час стояння та ходьби; 4, сильна кульгавість і зігнута назад під час стояння та ходьби, уражена нога використовується лише для стояння та 5, сильна кульгавість і зігнута назад під час стояння та більше не стоїть на нозі, надає перевагу лежанню.

При лікуванні ураження М2 загоєння відбувається наступним чином: проміжна стадія (М3) призводить до загоєної стадії (М0) або переходить у хронічну фазу з розпухлою міжкопитною щілиною (М4.1). М4.1 загоюється через М4 до М3 після ефективного лікування. Див., наприклад, Фіг. 4.

Після оцінки ран відібрані корови випадковим чином розподіляються на п'ять груп таким чином: Група 1: без лікування (контроль); Група 2: обробка спреєм №1; Група 3: обробка спреєм №2-PTSO; Група 4: лікування спреєм №1 і введення таблетки, яка містить 4,8 г PTSO плюс 1,2 грам PTS; і Група 5: обробка спреєм №2-PTSO та введення таблетки, яка містить 4,8 г PTSO плюс 1,2 грама PTS, і обробка або спреєм №1, або спреєм №2-PTSO. Через два тижні копита оцінювали за М-оцінкою і локомоцією. Кожне копито, якщо це можливо, знову піднімали вгору і знову робили знімок.

Обробка даних

Оцінки корів порівнювали між групами 1 і 3 і групами 2 і 3. Для розрахунку статистичної значущості було застосовано точний критерій Фішера. М1, М2, М4 і М4.1 вважалися "не загоєними". М3 позначається як "загоєння", а М0 - "загоєна". Для дослідження "загоєння" і "загоєна" були об'єднані.

Результати

Оцінки М для групи лікування наведено в таблиці 22. Більшість корів, які отримували лікування, з оцінкою М4 мають оцінку локомоції 1 або 2 до обробки будь-яким спреєм. Усі ці корови отримали оцінку локомоції 1 після лікування, а шкіра після лікування була більш еластичною. Корова з групи 5 отримала оцінку 3 за локомоцію, але відразу після лікування вона отримала оцінку 2 за локомоцію, тому спостерігалася негайне покращення. Результати щодо пальцевого дерматиту визначали за М-оцінками. Усі корови з активними (болісними) ураженнями М1, М2 та М4.1 були переведені до М3.

Корови, які отримували таблетку, яка містить 4,8 г PTSO плюс 1,2 грам PTS, і спрей №1, показали, що 93 % оцінок М4 перейшли до М3, а решта - до М0 після лікування. Коли використовували спрей №2-PTSO, оцінки М2 на t=0 перейшли до М3. Корови з оцінкою М4 після лікування переходили на М0 (23 %), М3 (56 %) або залишалися на М4 (21 %), тому спостерігалися значні покращення при застосуванні спрею №2-PTSO, тоді як додаткове лікування таблеткою PTSO/PTS показало додатковий ефект.

Контрольна група показала вищі М-оцінки, оскільки цю групу не лікували, і ситуація погіршилася, як очікувалося. Більшість корів залишилися в хронічній групі (М4).

Таблиця 22

Оцінка М перед та після відповідного лікування. М3 (жирним шрифтом) позначено як "загоєння", а М0 - "загоєна" (жирним шрифтом)

група	0	1	2	3	4	4,1
1A		2		5	26	9
1B				8	34	
2A		1	1	4	59	3
2B	6			42	20	
3A		3	1	16	52	4
3B	10			44	22	
4A					6	3
4B	1			7	1	
5A			1	1	14	2
5B	4			9	5	

Група 1: Контроль; Група 2: Спрей №1; Група 3: Спрей №2-PTSO; Група 4: Спрей №1 плюс таблетка PTSO/PTS; Група 5: Спрей №2-PTSO плюс таблетка PTSO/PTS. А вказує на кількість корів із певною оцінкою М перед лікуванням, а В вказує на кількість корів із певною оцінкою після лікування.

Був проведений статистичний аналіз, і точний критерій Фішера дав значення $P = 0,037$ при порівнянні груп 2 і 3 (тобто спреї з PTSO та без нього) і P -значення 0,010 при порівнянні групи 1 з групою 3 (тобто контроль проти спрею з PTSO).

Стан здоров'я копит покращився для обох спреїв, але статистичне P -значення демонструє, що спреї, що містять PTSO, продемонстрував кращий ефект порівняно з аналогічним спреєм без PTSO ($p=0,032$). Корови, яких обробляли спреєм №1, показали кращі результати, коли лікування поєднували з таблеткою PTSO/PTS. Приклади демонструють, що місцеве застосування PTSO є корисним для лікування хронічних ран, пов'язаних з біоплівкою, таких як пальцевий дерматит.

Для корів, яких обробляли спреєм №2-PTSO, ми спостерігали більший вплив на інфіковані стадії M1 і M2, ніж на хронічні ураження (M4, M4.1). Цілком імовірно, що подальше покращення досягається продовженням цього лікування. Одна з корів з оцінкою локомоції 4 була пролікована, перед лікуванням ходила на 3 ногах, копито четвертої ноги було сильно уражене пальцевим дерматитом, тому його не можна було використовувати. Після лікування корова пішла на 4 копитах та оцінкою локомоції 2, що чітко демонструє знеболювальний ефект лікування.

Приклад 8 Дерматит ущелини вимені

Іншим прикладом хронічної рани, пов'язаної з біоплівкою, є дерматит ущелини вимені [UCD, англ.: Udder Cleft Dermatitis] [Sorge et al, 2019, J. Dairy Sci. 102:11470-11475; Waller et al, 2014, J. Dairy Sci. 97:310-318]. UCD - це ураження шкіри, розташоване в передній частині з'єднання вимені з черевною стінкою або між передніми чвертями вимені. Ураження відрізняються за зовнішнім виглядом і розміром, але часто зустрічаються потовщена шкіра, скоринки, гній і рани, які легко кровоточать. Дерматит ущелини вимені може бути важко виявити через його анатомічне положення та той факт, що у хворих корів рідко виявляються загальні ознаки захворювання. Було опубліковано декілька досліджень поширеності UCD, і більшість з них охоплювала лише одне чи кілька стад, які в основному класифікувалися як проблемні стада. Поширеність у стаді в цих дослідженнях коливалася від 0 до 22 %. Однак у нещодавньому голландському дослідженні було включено 20 стад, з яких 3 не мали UCD, тоді як поширеність всередині стада в інших стадах коливалася від 2,5 до 13 % [Amersfort et al., 2012]. Етіологія UCD неясна, але припускають, що деякі фактори, такі як конформація вимені та набряк вимені, відіграють певну роль. Фактори корови, такі як паритет і DIM (дні в молоці), також були пов'язані з UCD [Beattie and Taylor, 2000, J. Brit. Cattle Vet. Assoc. 8, 377-380].

Ураження найчастіше виявляються на підшовній стороні міжпальцевої щілини задніх кінцівок. Теропета spp. зазвичай присутні у великій кількості активних уражень. Ураження болючі на дотик і можуть призвести до клінічної кульгавості. Інфекційна природа зазвичай призводить до ендемічного зараження стад великої рогатої худоби [Plummer et al 2017, Vet Clin North Am Food Anim Pract 33(2): 165-181] і відповідає за значні економічні втрати.

Схема дослідження: Були відібрані дві корови з явними характеристиками хронічного UCD і оброблені спреями, описаними в Прикладі 7. Корову 1 (3076) обробляли спреєм №2-PTSO на день 0 і день 7. Корову 2 (2934) обробляли спреєм №1 на $t=0$ та спреєм №2-PTSO на 7 день. У таблицях 23 і 24 наведено результати лікування.

Таблиця 23

Опис рани корови 1 (3076), яку лікували в день 0 і день 7

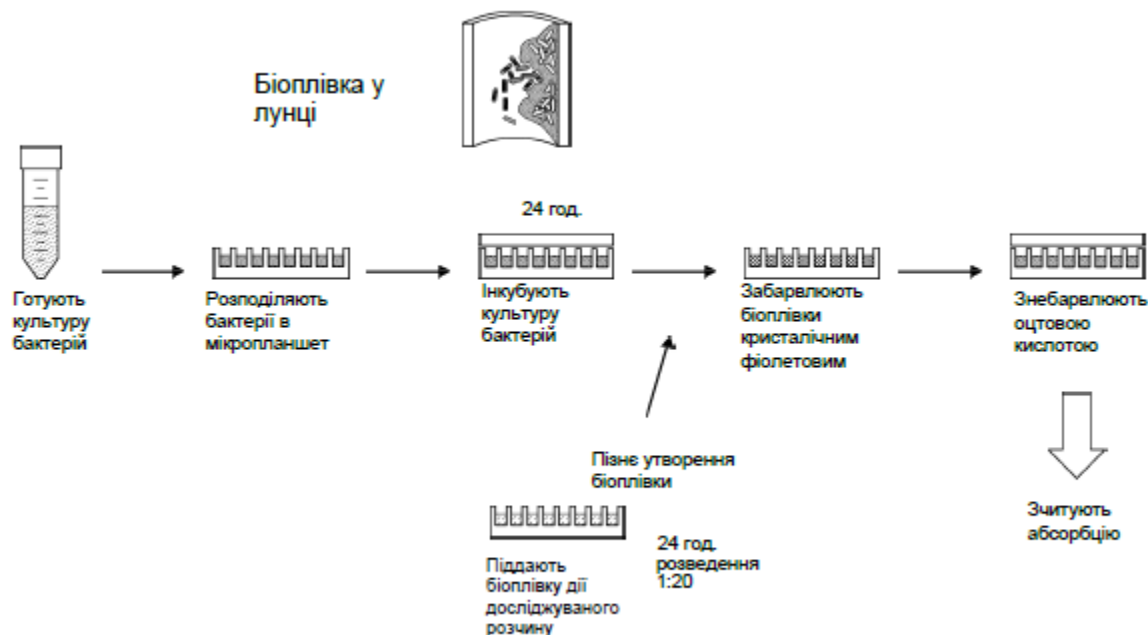
	День 0	День 7	День 14
Оцінка	Запалені, слизові та хронічні рани, чутливі, червоного кольору, запальна волога	Суха рана, не чутлива і не запалена рана	Не запалена рана, що загоюється

Таблиця 24

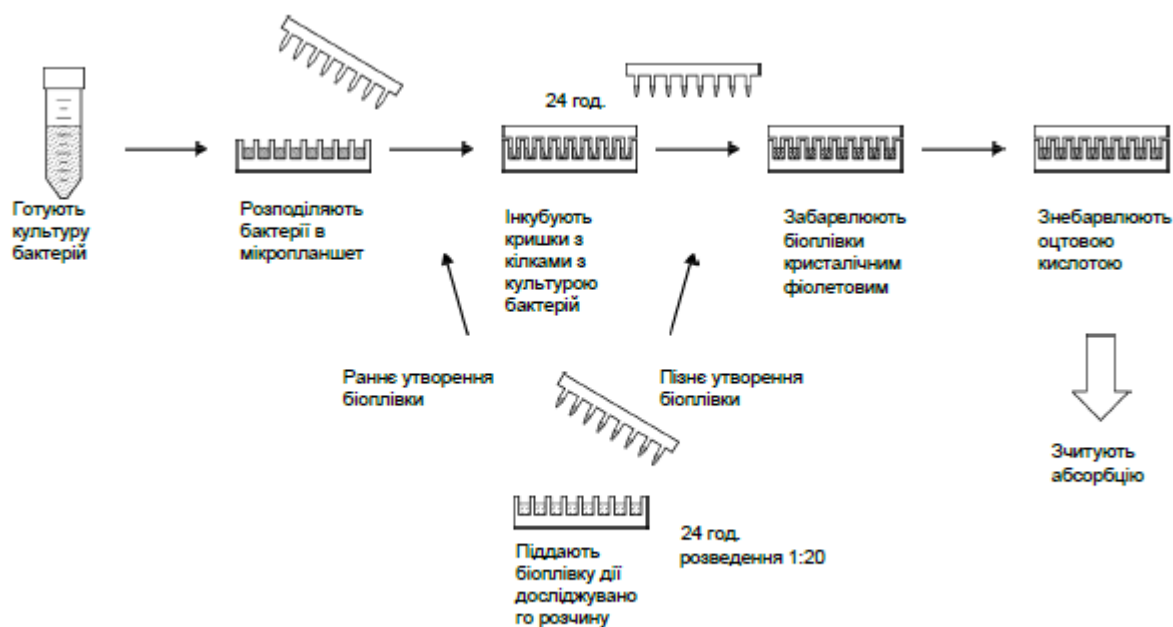
Опис рани корови 2 (2934), яку лікували лише на 7-й день

	День 0	День 7	День 14
Оцінка	Хронічні та слизові рани, товсті ранові скоринки, явно запалені, червоні та чутливі	Товсті ранові скоринки, явно запалені, червоні та чутливі	Тонкі ранові скоринки, запалення немає, рана загоюється

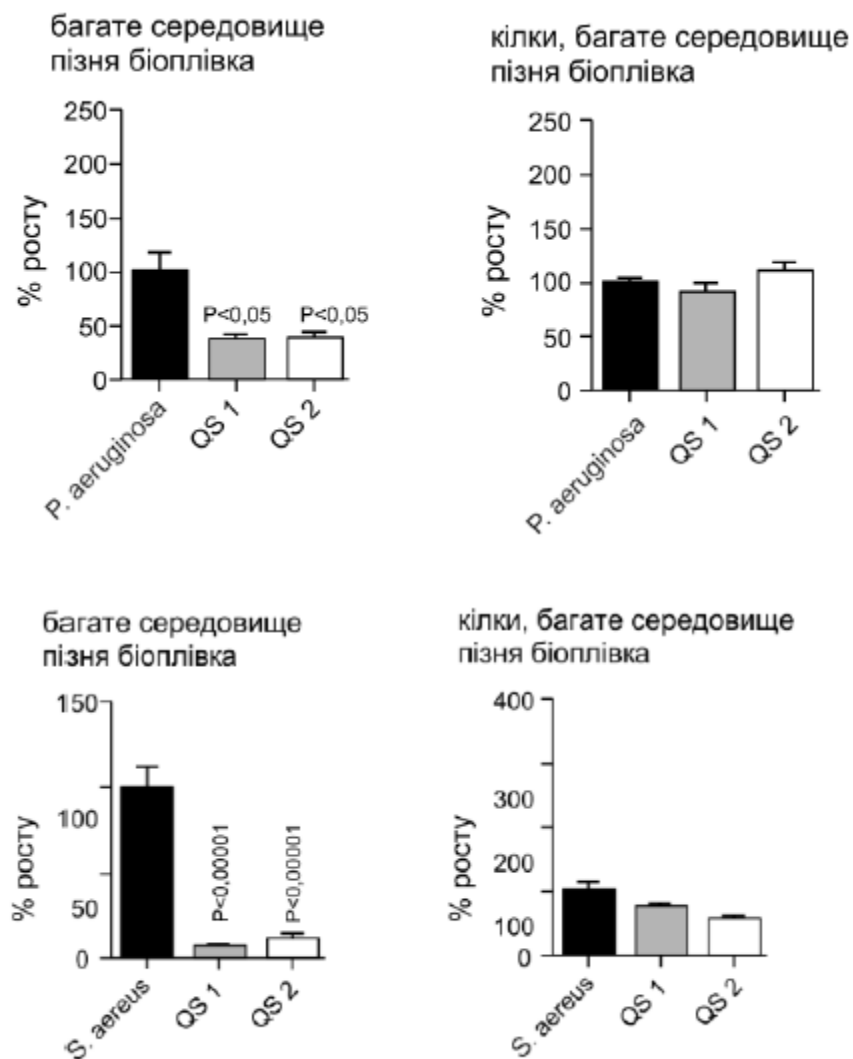
Корову 1 обробляли в день 0 і день 7 спреєм № 2-PTSO, і негайно спостерігалось зменшення запалення. Жодного прогресу не спостерігалось, коли корову 2934 обробляли спреєм №1 у день 0. Після обробки спреєм №2 на 7-й день спостерігалось явне покращення щодо зменшення інфекції з подальшим загоєнням ран. Ці експерименти повторювали на сотнях корів і спостерігали покращення та загоєння хронічних слизових ран UCD за допомогою спрею №2-PTSO.



Фіг. 1А

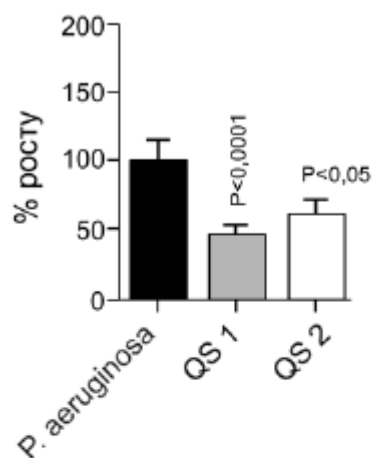


Фіг. 1В

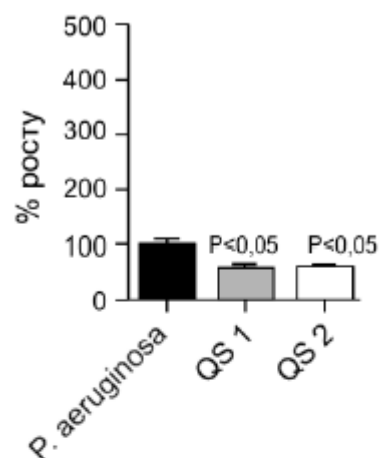


Фиг. 2А

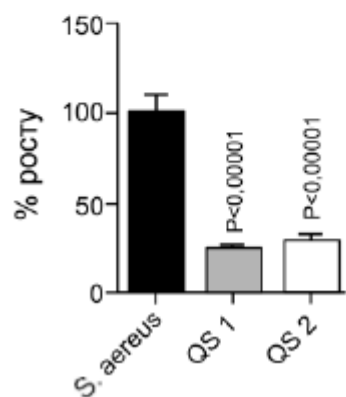
мінімальне середовище
пізня біоплівка



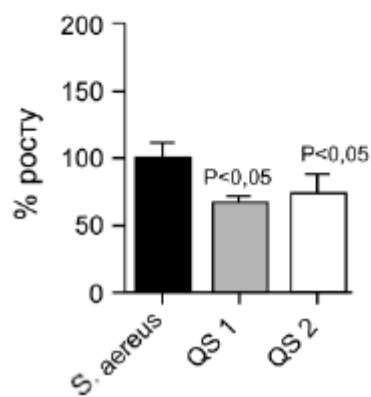
кілки, мінімальне середовище
рання біоплівка



мінімальне середовище
пізня біоплівка



кілки, мінімальне середовище
пізня біоплівка



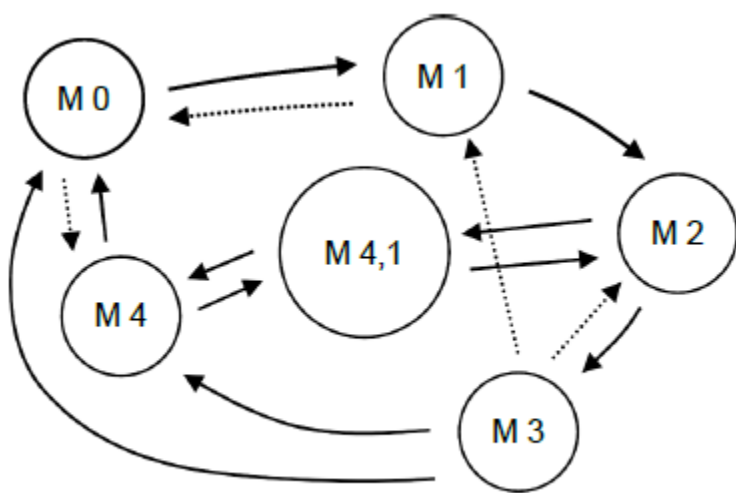
Фіг. 2В



Фіг. 3А



Φir. 3B



Φir. 4