

Joanna ŻUR, Danuta WOJCIESZYŃSKA, Urszula GUZIK*

WPLYW WYBRANYCH NIESTEROIDOWYCH LEKÓW PRZECIWZAPALNYCH NA FORMOWANIE I STRUKTURĘ BIOFILMU

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) to zróżnicowana grupa aktywnych biologicznie substancji o charakterze przeciwbólowym, przeciwzapalnym oraz przeciwgorączkowym. Do najczęściej stosowanych NLPZ należą ibuprofen, naproksen, diklofenak, paracetamol i kwas acetylosalicylowy. Wzrastająca konsumpcja, niewłaściwe procedury utylizacji leków oraz brak nowoczesnych metod oczyszczania ukierunkowanych na tę grupę zanieczyszczeń to główne przyczyny obecności NLPZ w środowisku. W artykule przedstawiono wpływ niesteroidowych leków przeciwzapalnych na formowanie i architekturę biofilmu, z uwzględnieniem ważnych klinicznie gatunków. Powstawanie biofilmu to główna przyczyna zwiększenia oporności mikroorganizmów na czynniki antybakteryjne oraz źródło strat ekonomicznych, np. w przemyśle spożywczym i budowlanym. Z drugiej strony gatunki o zwiększonym potencjale degradacyjnym zdolne do tworzenia biofilmu wykorzystywane są m.in. w oczyszczalniach ścieków. Stąd zasadnym wydaje się określenie wpływu NLPZ na komórki bakteryjne. Do najważniejszych zmian indukowanych NLPZ należy zmniejszenie biomasy bakterii, zmiana składu gatunkowego biofilmu, uszkodzenie syntezy DNA oraz zahamowanie produkcji flageliny, dzięki czemu NLPZ zaliczane są do grupy nie-antybiotyków o szerokich właściwościach antybakteryjnych.

1. NIESTEROIDOWE LEKI PRZECIWZAPALNE

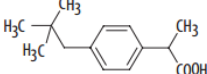
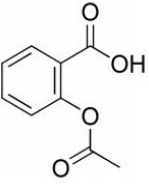
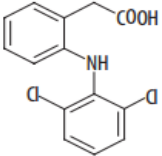
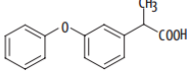
1.1. CHARAKTERYSTYKA NLPZ

Niesteroidowe leki przeciwzapalne to szeroka grupa farmaceutyków, zróżnicowana pod względem budowy chemicznej i zastosowania. Klasyfikacja NLPZ obejmuje pochodne m.in. kwasu *para*-aminofenolowego (paracetamol), salicylowego (kwas acetylosalicylowy), arylopropionowego (ibuprofen, naproksen, ketoprofen), arylooctowego (diklofenak)

* Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii, ul. Jagiellońska 28, 40-032, Katowice, jozur@us.edu.pl.

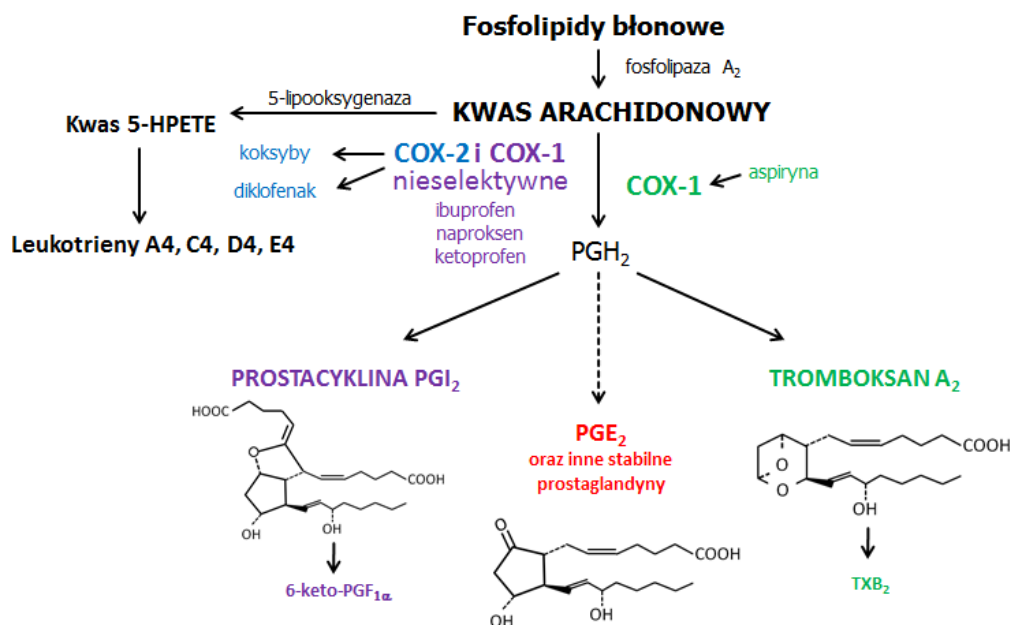
oraz pirazonu (fenazon). NLPZ wykazują właściwości przeciwbólowe, przeciwgorączkowe oraz przeciwzapalne, a kwas acetylosalicylowy dodatkowo, działanie antyagregacyjne [14, 18]. Charakterystykę wybranych NLPZ przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Charakterystyka wybranych NLPZ [10, 14, 17, 29]

NLPZ	Ibuprofen	Kwas acetylosalicylowy	Diklofenak	Ketoprofen
Wzór strukturalny				
Pochodna	kwas arylopropionowy	kwas salicylowy	kwas arylooctowy	kwas arylopropionowy
Aktywność	COX-nieselektywna	COX-1 selektywna	COX-2 selektywna	COX-nieselektywna
Okres półtrwania	2–4h	2-4h	2h	2h
Toksyeczność	LD ₅₀ = 1 255 mg/kg [doustnie, mysz]	LD ₅₀ = 1 124 mg/kg [doustnie, szczur]	LD ₅₀ = 390 mg/kg [doustnie, mysz]	LD ₅₀ = 100 mg/kg [doustnie, szczur]
	EC ₅₀ = 18 000 mg/l [<i>D. magna</i>]	EC ₅₀ = 1 800 mg/l [<i>D. magna</i> , <i>D. longispina</i>]	EC ₅₀ = 14 500 mg/l [<i>D. magna</i>]; 22 430 mg/l [zooplankton]	EC ₅₀ = 5 102 mg/l [<i>D. magna</i>]
Metabolity	glukuronid ibuprofenu, 2-hydroksy-ibuprofen, 3-hydroksy-ibuprofen, 1-hydroksy-ibuprofen	kwas salicylowy	acylowy glukuronid diklofenaku, 4'-hydroksydidlofenak, 3'-hydroksydidlofenak, 5-hydroksydidlofenak	kwas 2-([3-hydroksy(fenyl)-metylo]fenyl)-propanowy, 3-hydroksybenzoilo ketoprofen, 3-hydroksyketoprofen

Niesteroidowe leki przeciwzapalne, pomimo zbliżonej struktury i właściwości farmakologicznych, w istotny sposób różnią się siłą działania, co skutkuje zróżnicowanym zastosowaniem klinicznym. Przykładowo, paracetamol charakteryzuje się silnym działaniem przeciwgorączkowym i przeciwbólowym, ale w niewielkim stopniu hamuje procesy zapalne. Diklofenak – wykazuje silne działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne, ale umiarkowane działanie przeciwgorączkowe. Wszystkie NLPZ charakteryzują się podobnym podstawo-

wym mechanizmem działania, opartym na hamowaniu aktywności izoenzymów cyklooksygenazy (COX-1, COX-2), zaangażowanych w przemianę kwasu arachidonowego, uwalnianego z błonowych fosfolipidów za pomocą fosfolipazy A₂. Kwas arachidonowy to najważniejszy, choć nie jedyny, substrat COX wykorzystywany w procesie syntezy prostaglandyn (PG), prostacykliny (PGI₂) i tromboksanu (TX). Hamujące działanie NLPZ, choć w mniejszym stopniu niż w przypadku izoform COX, wykazano również w stosunku do lipooksygenazy. Badania wykazały również, że niesteroidowe leki przeciwzapalne hamują działanie reaktywnych form tlenu, angiogenezę oraz apoptozę [11, 14]. Działanie niektórych klasycznych i selektywnych NLPZ na kaskadę przemian kwasu arachidonowego przedstawia rys. 1.



Rys. 1. Działanie wybranych NLPZ na kaskadę kwasu arachidonowego [11]

Ze względu na cytoprotekcyjną rolę prostaglandyn, głównie w stosunku do układu pokarmowego, stosowanie NLPZ hamujących izoformę COX-1 skutkuje często uszkodzeniami błony śluzowej żołądka i objawami dyspeptycznymi. Zmniejszenie gastrotoksyczności NLPZ możliwe jest dzięki zastosowaniu koksybów, czyli NLPZ hamujących selektywnie indukowaną formę COX-2. Stosowanie proleków, czystych enancjomerów NLPZ, NO-NLPZ zawierających grupę chemiczną uwalniającą tlenek azotu (II) lub leków łączących hamujące właściwości w stosunku do cyklooksygenazy i lipooksygenazy również w znacznym stopniu ograniczają toksyczność NLPZ.

1.2. WYSTĘPOWANIE NLPZ W ŚRODOWISKU

Główną przyczyną obecności NLPZ i ich metabolitów w środowisku, m.in. w wodach powierzchniowych, gruntowych, wodzie pitnej, osadach dennych i ściekach, jest wzrastająca konsumpcja oraz niewłaściwa utylizacja przeterminowanych lub niezużytych farmaceutyków.

W organizmach żywych niesteroidowe leki przeciwzapalne nie ulegają degradacji, a jedynie niewielkim przemianom I i II fazy detoksykacji ksenobiotyków zachodzących w wątrobie. Faza I obejmuje głównie reakcje hydroksylacji, utlenienia lub redukcji katalizowane przez monoooksygenazy oraz układ cytochromu P-450, najliczniej zlokalizowane w obrębie siateczki śródplazmatycznej gładkiej. W fazie II metabolity oraz związki macierzyste ulegają reakcji sprzęgania ze związkami endogennymi np. kwasem glukuronowym, octowym, glutationem, siarczanami lub aminokwasami. W zależności od fazy metabolizmu i charakteru modyfikacji leki mogą ulegać dezaktywacji (faza II), jednak nierzadko obserwowany jest wzrost toksyczności i aktywności biologicznej metabolitów powstałych w I fazie detoksykacji [3].

Niesteroidowe leki przeciwzapalne i ich metabolity jako związki słabo rozpuszczalne w wodzie, zatrzymane w szlamie ściekowym używanym jako nawóz, mogą spowodować skażenie gleby i wód gruntowych. W oczyszczalniach ścieków ksenobiotyki mogą ulec mineralizacji, biotransformacji lub pozostać w formie pierwotnej. Jednocześnie wykazano, że procesy ozonowania oraz fotokatalizy, czyli techniki oczyszczania najczęściej stosowane w usuwaniu NLPZ, pomimo dobrej wydajności, prowadzą do powstawania toksycznych intermedatów i często zaburzane są poprzez niespecyficzne reakcje z materią organiczną. Zróżnicowaną efektywnością w usuwaniu NLPZ ze ścieków charakteryzują się również biologiczne metody oczyszczania [7, 10]. Badania Quintana i in. [28] wykazały, że dla układów kometabolicznych rozkład ketoprofenu oraz naproksenu przez osad czynny w ciągu dwudziestu kilku dni wynosił odpowiednio 13 i 49%. W przypadku ibuprofenu efektywność rozkładu była wyższa i wynosiła 96% [28].

NLPZ obecne w wodach powierzchniowych i oczyszczonych ściekach w stężeniach rzędu ng/l i µg/l nie powodują toksyczności ostrej, jednak chroniczna ekspozycja, w połączeniu z działaniem innych farmaceutyków obecnych w wodzie skutkuje bioakumulacją i licznymi zaburzeniami obserwowanymi u organizmów wodnych [5, 10, 17, 22, 28]. Stężenie NLPZ w wybranych krajach Unii Europejskiej przedstawia tabela 2.

Jednocześnie, mikrobiologiczne szlaki degradacji NLPZ w środowisku wodnym pozostają słabo opisane. Wyjątek stanowi kwas acetylosalicylowy, którego degradacja przebiega z rozszczepieniem pierścienia aromatycznego. Reakcja ta katalizowana jest przez dioksygenazy katecholowe oraz dioksygenazę gentyzynową i prowadzi do powstawania intermedatów włączanych w centralne szlaki metabolizmu [12, 35].

Tabela 2. Stężenie NLPZ w wybranych krajach Unii Europejskiej [10, 16, 17, 31]

NLPZ	Występowanie	Stężenie [µg/l]	Kraj
Ibuprofen	wody powierzchniowe	0,05–0,1	Polska
	wody powierzchniowe	< 0,0045	Francja
	woda pitna	< 0,0006	
Paracetamol	woda pitna	< 0,21	Wlk. Brytania
	wody powierzchniowe	0,22–1,0	
Kwas acetylosalicylowy	wody powierzchniowe	0,1	Niemcy
	ścieki surowe	3,2	
	ścieki oczyszczone	0,6	
Kwas salicylowy	wody powierzchniowe	0,007–0,2	Włochy
Diklofenak	wody powierzchniowe	0,3–0,5	Polska
	wody powierzchniowe	0,15	Niemcy
	woda pitna	< 0,0025	Francja
	wody powierzchniowe	0,025–0,170	Szwecja
wody powierzchniowe	0,01–0,163		
Ketoprofen	rzeki	0,04	Polska
	rzeki	0,006–0,026	Finlandia

W mikrobiologicznym rozkładzie ibuprofenu przez szczep *Sphingomonas* Ibu-2 udział bierze m.in. dioksygenaza, syntetaza acylo-CoA oraz ligaza-CoA [21]. Rozkład ketoprofenu najprawdopodobniej przebiega przez wspólny szlak dla bifenyli, eterów bifenyli i związków pokrewnych [15]. Na wydajność mikrobiologicznego rozkładu NLPZ korzystnie wpłynąć może zastosowanie technik immobilizacji. Zwiększona efektywność rozkładu wynika głównie z ochrony jaką nośnik zapewnia komórkom, zmniejszając ich podatność na działanie ksenobiotyków i zmiennych warunków środowiskowych. Wiadomo również, że immobilizacja stymuluje metabolizm bakterii i zwiększa możliwości degradacyjne szczepów. Najczęściej stosowaną techniką immobilizacji jest adsorpcja, uzależniona od zdolności danego szczepu do wytwarzania biofilmu. Dlatego m.in. istotne jest określenie wpływu NLPZ na tworzenie biofilmu.

2. BIOFILM

2.1. STRUKTURA I ROLA BIOFILMU

Mikroorganizmy charakteryzują się naturalną tendencją do adsorpcji na granicy faz, np. ciecz-ciecz czy ciecz-ciało stałe. Zdolność do kolonizacji różnych powierzchni determinowana jest przez właściwości adhezyjne drobnoustrojów i skutkuje powstaniem złożonej wielokomórkowej struktury zwanej biofilmem (błoną biologiczną). Powstały biofilm stabilizowany jest przez substancje polimeryczne wydzielane pozakomórkowo,

tw. EPS (ang. EPS – *extracellular polymeric substances*). W skład EPS wchodzi m.in. białka, zewnątrzkomórkowe DNA (eDNA – ang. *extracellular DNA*), surfaktanty, lipidy oraz woda. Najważniejszym składnikiem EPS są polisacharydy (liniowe, rozgałęzione, neutralne lub obdarzone ładunkiem). Poszczególne składniki matrycy budującej biofilm odpowiedzialne są m.in. za agregację komórek bakteryjnych i zdolność do adhezji do powierzchni biotycznych i abiotycznych, utrzymanie mechanicznej stabilności, formy i struktury biofilmu, sorpcję związków organicznych, ksenobiotyków i akumulację metali ciężkich. Architektura biofilmu determinowana jest m.in. zawartością i dostępnością substancji odżywczych, warunkami hydrodynamicznymi środowiska, komunikacją chemiczną (ang. *quorum sensing*) oraz mobilnością bakterii [1, 13, 25].

Zdolność mikroorganizmów do tworzenia biofilmu niesie ze sobą zarówno skutki pozytywne jak i negatywne. Zdolność ta została wykorzystana m.in. w oczyszczalniach ścieków, gdzie stosuje się błony biologiczne lub złoża filtracyjne, węgla aktywnego i złoża fluidalne zasiedlane przez mikroorganizmy. Negatywnym skutkiem tworzenia biofilmu są straty gospodarcze związane z korozją mikrobiologiczną sieci hydraulicznych, spadek jakości sanitarnej wody, degradacja mikrobiologiczna materiałów budowlanych i straty w przemyśle spożywczym [13].

Ponadto, gatunki zdolne do tworzenia błon biologicznych charakteryzują się wzrostem inwazyjności i zwiększoną zdolnością do wywoływania lekoopornych zakażeń. Mechanizmy determinujące zwiększoną oporność na czynniki antybakteryjne, antybiotyki, środki dezynfekujące czy surfaktanty to: obecność polimerowej matrycy EPS, limitującej dyfuzję i zabezpieczającej komórki przed wysychaniem i fagocytozą; reaktywne grupy funkcyjne polisacharydów ograniczające wnikanie środków antybakteryjnych do cytoplazmy; przechodzenie komórek w głębszych warstwach biofilmu w stan anabiozy, co skutkuje znacznym ograniczeniem ich wrażliwości; produkcja białek szoku termicznego HSP (ang. HSP – *heat shock proteins*); produkcja biosurfaktantów (ramnolipidów); horyzontalny transfer genów (głównie plazmidów) czy indukcja mutacji punktowych w genach, których produkty zwiększają poziom oporności mikroorganizmów w biofilmie [1, 2, 5, 7, 13, 25].

3. WPŁYW NLPZ NA BIOFILM

Mechanizm działania i skutki uboczne stosowania niesteroidowych leków przeciwzapalnych zostały bardzo dobrze poznane i scharakteryzowane. Z drugiej strony jednak efekty środowiskowe i ekologiczne związane z zanieczyszczeniem środowiska pozostałościami tych leków pozostają słabo opisane. Konsekwencją narastającego zjawiska lekooporności mikroorganizmów i strat ekonomicznych spowodowanych tworzeniem biofilmu jest poszukiwanie leków (substancji czynnych) o aktywności antybakteryjnej, wśród innych niż antybiotyki grup farmaceutyków, np. leków diuretycznych (furose-

mid) czy przeciwpadaczkowych (karbamazepina) [4]. Potencjalne działanie antymikrobiologiczne wykazują również alkaloidy roślinne (kofeina) i związki organiczne (*N*-acetylo-*L*-cysteina, ksylitol, sorbitol) [8, 9, 19, 27]. Liczne doniesienia literaturowe wskazują również na wysoką skuteczność antybakteryjną niesteroidowych leków przeciwzapalnych. NLPZ wykazują właściwości ograniczające adhezję bakterii i formowanie biofilmu, zarówno w stosunku do szczepów izolowanych ze środowiska, jak i gatunków o znaczeniu klinicznym. Efektywność rozkładu niesteroidowych leków przeciwzapalnych przez szczepy o zwiększonym potencjale degradacyjnym również w dużym stopniu uzależniona jest od ich reakcji na poszczególne stężenia leków. Dla szczepów posiadających zdolność rozkładu niesteroidowych leków przeciwzapalnych leki te stanowią zazwyczaj dodatkowe źródło węgla i energii, co stymuluje przyrost biomasy. Badania nad rozkładem paracetamolu, jako jedyne źródła węgla, azotu i energii przez pojedyncze szczepy oraz konsorcjum bakteryjne złożone ze szczepów z rodzajów *Stenotrophomonas* i *Pseudomonas* prowadzili Zhang i in. [34]. W przypadku pojedynczych szczepów przy wyższych dawkach paracetamolu obserwowano wyraźne zahamowanie wzrostu bakterii. Konsorcjum tych szczepów było zdolne do 100% rozkładu paracetamolu w czasie 37 h.

Do oceny wpływu NLPZ na formowanie i architekturę biofilmu wykorzystywane są m.in. standardowe techniki polegające na liczeniu kolonii bakterii, technika mikroskopii *in situ*, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, techniki izotopowe czy oznaczenia wykorzystania różnych źródeł węgla i azotu.

Szerokie spektrum właściwości antybakteryjnych diklofenaku i ibuprofenu zarówno w stosunku do bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych zostały wielokrotnie potwierdzone [19, 22, 30, 32, 33]. W badaniach nad wpływem ibuprofenu w stężeniu 10 µg/l na biofilm rzeczny stwierdzono zmniejszenie biomasy bakteryjnej, grubości tworzonej błony i zmiany w składzie produkowanego egzopolisacharydu. Istotne zmiany zaobserwowano również w składzie biofilmu. Populacja klasy gamma-proteobakterii uległa zmniejszeniu na rzecz klas alfa i beta. Zmianie uległy preferencje metaboliczne szczepów, m.in. wykorzystanie kwasów *L*-keto-masłowego i hydroksymasłowego, *N*-acetylo-*D*-glukozaminy, fosforanu glicerolu i glukozofosforanu [22].

Corcoll i in. [7] za pomocą systemu PICT (ang. PICT – *pollution-induced community tolerance*) ocenili tolerancję biofilmu na środowiskowe stężenia ibuprofenu i diklofenaku w rzekach otrzymujących ładunek z oczyszczalni ścieków. Najwyższe stężenie NLPZ odnotowane w badanych wypływach wynosiło 1200 ng/l. Otrzymane wyniki potwierdziły nabywanie tolerancji mikroorganizmów budujących biofilm zarówno na ibuprofen, diklofenak, jak i synergiczne działanie leków oraz wrażliwość bakterii na diklofenak, co znajduje odzwierciedlenie w jego wyższej toksyczności. Zarówno ibuprofen jak i diklofenak na skutek akumulacji powodują zmiany w błonach komórkowych bakterii. Akumulacja determinowana jest przede wszystkim wartością pH, od którego uzależniona jest dostępność niepolarnych komponentów błony i hydrofobowość komórki. Wyniki potwierdziły również, że chroniczna ekspozycja na niewielkie stężenia NLPZ

prowadzi do zmian metabolicznych i strukturalnych komórek w biofilmie. Wyższe stężenia NLPZ były tolerowane tylko przez gatunki o zwiększonym potencjale degradacyjnym. Wpływ na zmniejszenie biomasy i zmiany gatunkowe w biofilmie rzeczonym (wzrost udziału gatunków z rodzaju *Cytophaga*) indukowane obecnością diklofenaku obserwowali także Paje i in. [26].

Zmiany zachodzące w strukturze biofilmu rzeczynego badali również Lawrence i in. [23]. Jako system modelowy zastosowano obrotowy reaktor pierścieniowy. Przy wyższych stężeniach diklofenaku (100 µg/l, lato) obserwowano znaczący wzrost biomasy bakterii. Przyrostu nie odnotowano natomiast dla stężenia 10 µg/l testowanego wiosną. Dla obu dawek diklofenaku zaobserwowano również znaczący spadek grubości tworzonej błony i zmianę w wielkości oraz rozmieszczeniu mikrokolonii, które przy stężeniu 100 µg/l były znacznie większe. Wyższe stężenie wpłynęło również na spadek liczby wykorzystywanych źródeł węgla. Ponadto, pod wpływem testowanych stężeń diklofenaku wzrosła populacja gamma-proteobakterii.

Ibuprofen, ze względu na zdolność ograniczania adhezji bakterii, wykorzystywany jest również jako środek opłaszczający w medycynie. Minimalne stężenie ibuprofenu hamujące biofilm MBIC (ang. MBIC – *minimal biofilm inhibitory concentration*) pięciu patogennych szczepów *Escherichia coli* oszacowane na 125 mg/l, w połączeniu z albuminami surowicy w stężeniu 32 000 mg/l ograniczało rozwój biofilmu na płytkach polistyrenowych o 80,6–95,8%. Z dostępnej literatury wiadomo również, że u *E. coli* wartości sub-MIC (ang. MIC – *minimal inhibitory concentration*) ibuprofenu hamują produkcję fimbrii i hemolizyn. Dodatkowo, zmniejszają również hydrofobowość komórki [24].

Spośród klasycznych NLPZ właściwości antybakteryjne wykazuje również kwas acetylosalicylowy (aspiryna), kwas salicylowy oraz jego sole. Muller i in. [20] wykazali, że dodatek 5 mM kwasu salicylowego do pożywki ogranicza adhezję i produkcję biofilmu przez szczep *Staphylococcus epidermidis*. Wbrew przyjętym założeniom, nie było to wynikiem chelatacji kationów, ale zaburzeń w produkcji kwasów tejchojowych i białek otoczki. Negatywny wpływ salicylanów na syntezę biofilmu szczepów *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* i *Proteus mirabilis* wykazali również El-Banna i in. [9]. 10 µg/l salicylanu hamowało syntezę biofilmu wszystkich czterech szczepów w 30–57%, a skuteczność eradykacji biofilmu wyniosła ok. 15–29%. Eliminacja i hamowanie syntezy biofilmu dla dziesięciokrotnie większej dawki salicylanów wyniosła odpowiednio 53–69% i 47–62%. Ponadto, jednoczesne zastosowanie salicylanów i gentamycyny znacząco ograniczało adhezję bakterii do powierzchni abiotycznych. Chow i in. [6] wykazali, że wartość sub-MIC kwasu salicylowego wynosząca 25–50 mM ogranicza rozwój biofilmu *P. aeruginosa* poprzez regulację ekspresji genów kodujących flagelinę i zmniejszenie produkcji biosurfaktantów.

Wartości MIC wybranych NLPZ na niektóre gatunki bakterii przedstawia tabela 3.

Tabela 3. Minimalne stężenie hamujące (MIC) NLPZ dla wybranych gatunków bakterii [2, 19, 24]

NLPZ	MIC [µg/ml]	Gatunek
Ibuprofen	952	<i>S. aureus</i>
	250	<i>K. pneumoniae</i>
	1292,2	<i>P. aeruginosa</i>
	1465,4	<i>P. mirabilis</i>
Salicylany	300	<i>E. coli</i>
	500	<i>K. pneumoniae</i>
	500	<i>P. aeruginosa</i>
	1500	<i>P. mirabilis</i>
Diklofenak	3125	<i>P. aeruginosa</i>
	1465	<i>S. aureus</i>
	173,7	<i>K. pneumoniae</i>
	1675,7	<i>P. aeruginosa</i>
	1769,5	<i>P. mirabilis</i>
Ketoprofen	3125	<i>P. aeruginosa</i>
	1607,5	<i>S. aureus</i>
	1732,5	<i>K. pneumoniae</i>
	1756,7	<i>P. aeruginosa</i>

Antybakteryjne działanie diklofenaku, ibuprofenu i ketoprofenu zostało potwierdzone również w stosunku do uropatogennych szczepów *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Proteus mirabilis*. Najsilniejszym działaniem antymikrobiologicznym charakteryzował się diklofenak i ketoprofen, co prawdopodobnie związane jest z hamowaniem syntezy DNA lub zaburzeniami procesów zachodzących w błonie komórkowej bakterii. Hipotezę o właściwościach antybakteryjnych wynikających z zahamowania syntezy DNA potwierdza również Abbas i in. [2]. Wartości sub-MBIC zarówno ketoprofenu jak i diklofenaku wynosiły 3,125 mg/ml odpowiednio dla wszystkich dwudziestu i dla 10% analizowanych izolatów *Pseudomonas aeruginosa*.

Praca została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2013/09/B/NZ9/00244.

LITERATURA

- [1] ABEE T., KOVACS A. T., KUIPERS O. P., VAN DER VEEN S., *Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria*, Current Opinion in Biotechnology, 2011, Vol. 22, 172–179.
- [2] ABBAS H.-A., SERRY F.-M., EL-MASRY E.-M., *Combating Pseudomonas aeruginosa biofilm by potential biofilm inhibitors*, Asian Journal of Research in Pharmaceutical Science, 2012, Vol. 2, No. 2, 66–72.

- [3] BĄK M., KICIŃSKA-KROGULSKA M., CZERNIAK P., MICHOWICZ A., KRAKOWIAK A., *Toksyczne uszkodzenie wątroby–współczesny pogląd na etiopatogenezę. Część II*, Medycyna Pracy, 2011, Vol. 62, No. 2, 203–210.
- [4] BRYERS J.-D., JARVIS R.-A., LEBO J., PRUDENCIO A., KYRIAKIDES R.-T., UHRICH K., *Biodegradation of poly(anhydride-esters) into non-steroidal anti-inflammatory drugs and their effect on Pseudomonas aeruginosa biofilms in vitro and on foreign-body response in vivo*, Biomaterials, 2006, Vol. 27, 5039–5048.
- [5] CARACIOLLO A.-B., TOPP E., GRENNI P., *Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities: A review*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, Vol. 106, 25–36.
- [6] CHOW S., GU K., JIANG L., NASSOUR A., *Salicylic acid affects swimming, twitching and swarming motility in Pseudomonas aeruginosa, resulting in decreased biofilm formation*, Journal of Experimental Microbiology and Immunology, 2011, Vol. 15, 22–29.
- [7] CORCOLL N., ACUNA V., BARCELO D., CASELLAS M., GUASCH H., HUERTA B., PETROVIC M., PONSATI L., RODRIGEZ-MOZAZ S., SABATER S., *Pollution-induced community tolerance to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in fluvial biofilm communities affected by WWTP effluents*, Chemosphere, 2014, Vol. 112, 185–193.
- [8] DUTTA N.-K., ANNADURAI S., MAZUMDAR K., DASTIDAR S.-G., *Potential management of resistant microbial infections with a novel non-antibiotic: the anti-inflammatory drug diclofenac sodium*, International Journal of Antimicrobial Agents, 2007, Vol. 30, 242–249.
- [9] EL-BANNA T., SONBOL F.-I., EL-AZIZ A.-A.-A., ABO-KAMAR A., SEIF-ELDIN D.-W., *Effect of the combination of salicylate with aminoglycosides on bacterial adhesion to urinary catheters*, International Research Journal of Pharmacy, 2012, Vol. 2, No. 2, 39–45.
- [10] GUZIK U., HUPERT-KOCUREK K., MAZUR A., WOJCIESZYŃSKA D., *Biotransformacja wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych w środowisku*, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, 2013, Vol. 46, 105–112.
- [11] GRYGLEWSKI R.-J., *Prostacyclin among prostanoids*, Pharmaceutical Reports, 2008, Vol. 60, 3–11.
- [12] IVSHINA I.-B., RYCHKOVA M.-I., CHEKRYSHKINA L.-A., MISHENINA I.-I., *Catalysis of the biodegradation of unusable medicines by alkalotrophic Rhodococci*, Applied Biochemistry and Microbiology, 2006, Vol. 42, 392–395.
- [13] KOŁWZAN B., *Analiza zjawiska biofilmu–warunki jego powstawania i funkcjonowania*, Ochrona Środowiska, 2011, Vol. 33, No. 4, 1–14.
- [14] KORZENIOWSKA K., JANKOWSKI J., JABŁECKA A., *Niesteroidowe leki przeciwzapalne*, Farmacja Współczesna, 2010, Vol. 3, 192–197.
- [15] MARCO-URREA E., PEREZ-TRUJILLO M., CRUZ-MORATO C., VINCENT T., CAMINAL G., *White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identify cation of intermediates by HPLC-DAD-MS and NMR*, Chemosphere, 2010, Vol. 78, 474–481.
- [16] MARCHESE S., PERRET D., GENTILI A., CURINI R., PASTORI F., *Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in surface water and wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, Chromatographia, 2003, Vol. 58, No. 5, 263–269.
- [17] MARCHLEWICZ A., GUZIK U., WOJCIESZYŃSKA D., *Właściwości, występowanie i biodegradacja ibuprofenu w środowisku wodnym*, Ochrona Środowiska, 2015, Vol. 37, No. 1, 65–70.
- [18] MIĘDZYBRODZKI R., *Kierunki poszukiwań i zastosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2004, Vol. 58, 438–448.
- [19] MOHSEN A., GOMAA A., MOHAMED F., RAGAB R., EID M., AHMED A., KHALAF A., KAMAL A., MOKHTAR S., MOHAMED H., SALAH I., ABBAS R., ALI S., EL-BAKY R.-M.-A., *Antibacterial, anti-biofilm activity of some non-steroidal anti-inflammatory drugs and*

- N-acetylcysteine against some biofilm producing uropathogens*, American Journal of Epidemiology and Infectious Disease, Vol. 3, No. 1, 1–9.
- [20] MULLER E., AL-ATTAR J., WOLFF A.-G., *Mechanism of salicylate-mediated inhibition of biofilm in Staphylococcus epidermidis*, The Journal of Infectious Diseases, 1998, Vol. 177, 501–503.
- [21] MURDOCH R.-W., HAY A.-G., *Formation of catechols via removal of acid side chains from ibuprofen and related aromatic acid*, Applied of Environmental Microbiology, 2005, Vol. 7110, 6121–6125.
- [22] LAWRENCE J.-R., SWERHON G.-D.-W., WASSENAAR L.-I., NEU T.-R., *Effects of selected pharmaceuticals on riverine biofilm communities*, Canadian Journal of Microbiology, 2005, Vol. 51, No. 8, 665–669.
- [23] LAWRENCE J.-R., SWERHON G.-D., TOPP E., KORBER D.-R., NEU T.-R., WASSENAAR L.I., *Structural and functional response of river biofilm communities to the non-steroidal anti-inflammatory diclofenac*, Environmental Chemistry, 2007, Vol. 26, No. 4, 573–582.
- [24] NAVES P., DEL PRADO G., HUELVES L., RODRIGEZ-CERRATO V., RUIZ V., PONTE M.-C., SORIANO F., *Effects of human serum albumin, ibuprofen, and N-acetyl-L-cysteine against biofilm formation by pathogenic Escherichia coli strains*, Journal of Hospital Infection, 2010, Vol. 76, 165–170.
- [25] O'TOOLE G., KAPLAN H.-B., KOLTER R., *Biofilm formation as microbial development*, Annual Review of Microbiology, 2000, Vol. 54, 49–79.
- [26] PAJE M.-L.-F., KUHLICKE U., WINKLER M., NEU T.-R., *Inhibition of lotic biofilm by diclofenac*, Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, Vol. 59, 488–492.
- [27] PROIA L., OSORIO V., SOLEY S., KOCK-SCHULMEYER M., PEREZ S., BARCELO D., ROMANI A.-M., SABATER S., *Effect of pesticides and pharmaceuticals on biofilms in a highly impact river*, Environmental Pollution, 2013, Vol. 173, 220–228.
- [28] QUINTANA J.-B., WEISS S., REEMSTMA T., *Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor*, Water Research, 2005, Vol. 39, 2654–2664.
- [29] REZKA P., BALCERZAK W., *The occurrence of non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewater and water environment and methods of their removal-selected issues*, Archiwum Gospodarki Odpadami i Ochrony Środowiska, 2015, Vol. 17, No. 1, 33–38.
- [30] SALEM-MILANI A., GAJAN-BALAEI E., RAHIMI S., MOOSAVI Z., ABDOLLAHI A., MILANI-ZAKERI P., BOLOURIAN M., *Antibacterial effect of diclofenac sodium on Enterococcus faecalis*, Journal of Dentistry, 2013, Vol. 10, Vol. 1, 16–22.
- [31] TERNES T.-A., *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers*, Pergamon, 1998, Vol. 32, No. 11, 3245–3260.
- [32] UMARU T., NWAMBA C.-O., KOLO I., NWODO U.-U., *Antimicrobial activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs with respect to immunological response: Diclofenac sodium as a case study*, African Journal of Biotechnology, 2009, Vol. 8, No. 25, 7332–7339.
- [33] WINKLER M., LAWRENCE J.-W., NEU T.-R., *Selective degradation of ibuprofen and clofibric acid in two model river biofilm systems*, Pergamon, 2001, Vol. 35, No. 13, 3197–3205.
- [34] ZHANG L., HU J., ZHU R., ZHOU Q., CHEN J., *Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium*, Environmental Biotechnology, 2013, Vol. 97, 3687–3698.
- [35] ZHOU N.-Y., FUENMAYOR S.-L., WILLIAMS P.-A., *Genes of Ralstonia (formerly Pseudomonas) sp. strain U2 encoding enzymes of gentisate metabolism*, Journal of Bacteriology, 2001, Vol. 183, 7000–7008.

THE EFFECTS OF SELECTED NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS ON BIOFILM FORMATION AND ARCHITECTURE

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs are a diverse group of biologically active substances with anti-pyretic, anti-inflammatory and analgesic activity. The most popular NSAIDs include: ibuprofen, naproxen, paracetamol, acetylic acid and ketoprofen. Easy access to NSAIDs, improper utilization procedure and lack of modern methods of treatment in wastewater treatment plants (WWTPs) targeted at this group of pollutants are the main reasons for the presence of NSAIDs in the environment. The paper presents effects of NSAIDs on bacterial biofilm formation and architecture. Biofilms are responsible for the increased resistance of biofilm-associated bacteria to antimicrobial agents and severe economic losses. On the other hand, bacterial species able to xenobiotics degradation and formation of biofilm are widely use in WWTPs. Hence, it appears reasonable to determine the effects of NSAIDs on bacterial cells. The most relevant changes induced by NSAIDs are decreased bacterial biomass, changes in species composition, DNA damage and inhibition of flagella production.