

ÚČINNOSŤ VÝŤAŽKU Z LISTOV STEVIA REBAUDIANA NA RÔZNE MORFOLOGICKÉ FORMY BORRELIA BURGENDORFERI IN VITRO

P. A. S. Theophilus, M. J. Victoria, K. M. Socarras, K. R. Filush, K. Gupta, D. F. Luecke, E. Sapi*
Department of Biology and Environmental Science, University of New Haven, West Haven, CT, USA
Priятé: September 7, 2015; Schválené: October 26, 2015

Do slovenčiny preložil: Slavomír Piar, December 16, 2019

Pôvodný článok v angličtine:

https://pdfs.semanticscholar.org/6708/d07b27df257b6fa91b136ccc495363cef253.pdf?_ga=2.114027527.1069526780.1576515254-9202981.1576515254

Lymfská choroba je multisystémové ochorenie prenášané kliešťami, ktoré spôsobuje *Borrelia burgdorferi*. Primárne liečenie tohto ochorenia je podávanie antibiotík; relaps sa však často vyskytuje po prerušení liečby antibiotikami. Dôvod recidívy zostáva neznámy, ale nedávne štúdie naznačili možnosti prítomnosti borreliových buniek a biofilmov odolných voči antibiotikám.

V tejto štúdií sme hodnotili účinnosť extraktu z listov Stevie proti spirochetám, perzistentným a biofilmovým formám *B. burgdorferi* in vitro. Citlivosť rôznych foriem sa hodnotila pomocou rôznych kvantitatívnych techník okrem rôznych mikroskopických metód. Účinnosť Stevie sa porovnávala s doxycyklínom, cefoperazónom, daptomycínom a ich kombináciami. **Naše výsledky ukázali, že Stevia mala významný vplyv na elimináciu spirochét a perzistencie *B. burgdorferi*.**

Experimenty s subkultúrou s bunkami ošetrovanými Steviou a antibiotikami boli stanovené na 7 a 14 dní, pričom v porovnaní s vyššie uvedenými kombináciami antibiotík a antibiotík boli získané žiadne a 10% životaschopné bunky. Keď boli Stevia a tri antibiotiká testované proti pripojeným biofilmom, Stevia významne redukovala formy *B. burgdorferi*.

Výsledky tejto štúdie naznačujú, že prírodný produkt, ako je extrakt z listov Stevia, by sa mohol považovať za účinné činidlo proti *B. burgdorferi*.

(En)Keywords: *Borrelia burgdorferi*, biofilms, persister cells, *Stevia rebaudiana*, antibiotic resistance
Abbreviations: ATCC – American type culture collection; BSK-H – Barbour–Stoner–Kelly H; CefP – cefoperazone; DapM – daptomycin; DoxC – doxycycline; EPS – extracellular polymeric substances; Log phase – logarithmic phase; PBS – phosphate buffered saline; PI – propidium iodide; PTLDS – post-treatment Lyme disease syndrome; AFM - atomic force microscopy

(SK)Kľúčové slová: *Borrelia burgdorferi*, biofilmy, perzistujúce bunky, *Stevia rebaudiana*, antibiotická rezistencia

Skratky: ATCC - zbierka kultúr amerického typu; BSK-H - Barbour – Stoner – Kelly H; CefP - cefoperazón; DapM - daptomycín; DoxC - doxycyklín; EPS - extracelulárne polymérne látky; Log fáza - logaritmická fáza; PBS - fosfát tlmivý soľný roztok; PI - propidium jodid; PTLDS - syndróm lymfskej choroby po liečbe; AFM - silová mikroskopia atómov s rozlíšením zlomkov nanometrov.

ÚVOD

Lymfská choroba je popredným multisystémovým ochorením prenášaným kliešťami spôsobeným spirochete *Borrelia burgdorferi*. Baktéria je prenášaná kliešťami *Ixodes*, ktoré by sa mohli živiť myšami, hlodavcami, jeleňmi a vtákmi bielych [1, 2]. V Spojených štátoch je každý rok diagnostikovaná lymfská choroba približne 300 000 ľudí [3]. Prvou liečbou lymfskej choroby sú antibiotiká, ako napríklad doxycyklín pre dospelých a amoxicilín pre deti [4–8]. Tieto antibiotiká sa považujú za účinné vo väčšine prípadov pacientov s diagnostikovanou lymfskou chorobou [5–8]. Podľa Centers for Disease Control (CDC) sa však u približne 10–20% pacientov s lymfskou chorobou liečených anti-biotikami počas odporúčaných 2 až 4 týždňov vyskytli príznaky únavy, bolesti alebo bolesti kĺbov a svalov [9]. U niektorých pacientov symptómy pretrvávali aj dlhšie ako 6 mesiacov [9]. Tento stav sa označil ako „syndróm lymfskej choroby po liečbe (PTLDS)“ alebo ochorenie „chronický lymfský syndróm“ [9].

Mechanizmus spojený s týmto stavom u pacientov zostáva nejasný. Aj keď to nebolo dokázané, existuje niekoľko navrhovaných vysvetlení, ako napríklad neschopnosť imunitného systému úplne vyčistiť perzistujúce *B. burgdorferi* [10] alebo v dôsledku prítomnosti antigénnych zvyškov, ktoré by mohli spôsobiť imunologické odpovede [11]. Iné schopnosti, ako *Borrelia* sa vie vyhnúť antibiotickému klírensu hostiteľa po liečbe antibiotikami, nie je dobre známa [12, 13].

Predchádzajúce štúdie *in vivo* na myšiach, psoch a primátoch (okrem človeka) ukázali, že *B. burgdorferi* nebolo možné úplne eliminovať rôznymi antibiotikami, ako je doxycyklín, ceftriaxón a tigecyklín. Nedávna štúdia tiež preukázala prítomnosť DNA *Borrelia* u myši po 12 mesiacoch liečby antibiotikami [14]. V týchto štúdiách však nebolo možné dosiahnuť kultiváciu

životaschopných organizmov v rastovom médiu *Borrelia* [14–17]. Nedávna štúdia uvádzala prítomnosť borreliovej DNA od pacienta s PTLDS po liečbu antibiotikami [18]. Prospektívne klinické štúdie nepreukázali významnú účinnosť antibiotickej liečby a nepreukázali dôkaz pretrvávajúcej prítomnosti *B. burgdorferi* u pacientov s dlhodobými príznakmi [19, 20]. Iné štúdie využívajúce predĺženú intravenóznú liečbu ceftriaxónom iba zvýšili príznaky únavy [21]. Stručne povedané, zistenia naznačujú, že konvenčné liečby nemusia úplne odstrániť perzistentné *Borrelie*.

Životný štýl *B. burgdorferi* je komplexný, pretože existuje v rôznych morfológických formách, ako sú spirochéty, sféropasty (alebo L-forma), guľaté telá a biofily [7, 13, 22–25]. Niekoľko štúdií ukazuje, že *Borrelia* sa môže zmeniť na okrúhle telá, keď sa podmienky stanú nepriaznivými, ako sú zmeny teploty, vysoké alebo nízke pH, hladovanie, expozícia antibiotikám a / alebo dokonca útok imunitného systému [7, 23–25].

Borrelia sa v týchto obranných formách stáva nečinnou, nehybnou a zostáva v tomto morfológickom stave, až kým nedosiahne priaznivé podmienky na návrat do svojej spirochetovej formy [7, 22, 24, 26]. Najúčinnjším úkrytom *B. burgdorferi* je nedávno zistená forma biofilmu [24]. Bakteriálne biofilmy sú organizované spoločenstvami buniek uzavretých v samoprodukovanej hydratovanej polymérnej matici alebo extracelulárnych polymérnych látkach (EPS), čo je komplexná zmes polysacharidov, lipidových proteínov, nukleových kyselín a ďalších makromolekúl [24, 27]. Táto jedinečná matica chráni základné bunky pred antimikrobiálnymi látkami [24, 27]. Eliminácia patogénnych baktérií v ich biofilmovej forme je veľmi náročná, pretože tieto priehľadné bakteriálne bunky môžu vydržať imunitné reakcie hostiteľa a sú oveľa menej citlivé na antibiotiká alebo akékoľvek iné biocídy, ako ich jednotlivé

planktónové náprotivky [24, 27]. Rezistencia voči biofilmom je založená na viacerých mechanizmoch, ako sú fenotypové zmeny buniek, ktoré sa tvoria v biofilme, expresia výtokových púmp a prítomnosť perzistujúcich buniek, ktoré pri vystavení antimikrobiálnym látkam odolávajú usmrcovaniu [28, 29].

Nedávno sme poskytli dôkaz, že *B. burgdorferi* je schopná vytvárať biofilmy *in vitro* [24]. Agregácia spirochetových a okrúhlych tvarov tela s niekoľkými rôznymi ochrannými vrstvami, ktoré tvoria biofilm a extracelulárne polymérne látky (EPS), sa považuje za významný faktor rezistencie na antibiotiká [24].

Uvádza sa tiež, že biofilmy majú vyššiu populáciu perzistentných buniek, čo by mohlo viesť k antimikrobiálnej rezistencii stvárnenej týmito formami [24, 29].

Naše predtým publikované výsledky o účinkoch doxycyklínu *in vitro* na *B. burgdorferi* ukázali, že rôzne morfológické formy majú unikátnu citlivosť na antimikrobiálne látky [7]. Nedávna štúdia J. Feng a kol. ukázali, že doxycyklín bol účinný pri znižovaní spirochét, ale nie na perzistencie *B. burgdorferi* [30, 31]. Štúdie tiež ukázali, že doxycyklín a amoxicilín môžu eliminovať spirochetálnu formu *B. burgdorferi*, ale spiace perzistentné / biofilmálne podobné agregáty / mikrokolonie neboli citlivé na tieto antibiotiká [7, 31]. Preto existuje naliehavá potreba nájsť účinné látky, ktoré môžu zacielať / eliminovať všetky morfológické formy *Borrelia*.

Prírodné antimikrobiálne látky, ktoré sa používajú už roky, sa ukázali ako účinné opäť vynikajúce patogény [32]. Mnoho *in vitro* a klinických štúdií preukázalo svoju účinnosť nielen proti *B. burgdorferi*, ale aj proti mnohým iným patogénom [33–38]. *Stevia rebaudiana*, ktorá patrí do čeľade Asteraceae, sa zvyčajne označuje ako medový list alebo sladký list, a kvôli svojej prirodzenej sladkosti sa používa ako prírodná náhrada syntetického sladidla [39–41]. Listový extrakt zo *Stevie* má mnoho fytochemikálií, medzi ktoré patrí austroinullín, β -karotén, dulkozid, nilacín, oxidy rebaudi, riboflavin, steviol, steviozid a tiamín so známymi antimikrobiálnymi

vlastnosťami proti mnohým patogénom [40, 42, 43]. Úlohou týchto zlúčenín je predovšetkým chrániť rastlinu pred mikrobiálnou infekciou a nepriaznivými podmienkami prostredia [38–43]. *Stevia* je tiež dobre známa v tradičnej medicíne pre jej použitie pri liečbe mnohých chorôb, ako je cukrovka, vysoký krvný tlak a chudnutie [44, 45]. V niekoľkých klinických štúdiách sa uvádza, že fytochemický steviozid znižuje krvný tlak u pacientov s miernou hypertenziou a znižuje hladinu glukózy v krvi u pacientov s diabetom 2. typu [44, 45]. Ukázalo sa tiež, že pacienti sa pri používaní steviozidu nezaznamenali žiadnym nepriaznivým účinkom [44, 45].

Vzhľadom na účinnosť extraktu z listov *Stevie* v laboratórnych a klinických štúdiách sme hodnotili antimikrobiálny potenciál *Stevie* (extrakty z celých listov) proti patogénu spôsobenému Lymeho chorobou, *B. burgdorferi*, s cieľom eliminovať všetky rôzne morfológické formy *in vitro*.

Na efektívne vyhodnotenie celého extraktu z listov *Stevie* sme porovnali antimikrobiálny účinok *Stevie* s antibiotikami (doxycyklín, cefoperazón, daptomycín) a ich kombináciou, o ktorých sa nedávno zistilo, že sú účinné proti perzistentným boreliám.

Materiály a metódy

Podmienky bakteriálnej kultúry a požiadavky na médiá

Isoláty s nízkym priechodom (≤ 8) kmeňa *B. burgdorferi* kmeňa B31 sa získali zo zbierky American Type Culture Collection (ATCC 35210) a kultivovali sa v médiu Barbour-Stoner-Kelly H (BSK-H) (Sigma, St. Louis, MO), ktoré bolo doplnené so 6% králičím sérom (Pel-Freez®, Rogers, AR). Kultúry bez antibiotík sa udržiavali v sterilných 15 ml sklenených skúmavkách a inkubovali sa pri 33 °C s 5% CO₂.

Pre logaritmickú (log) fázu sa 1 x 10⁵ buniek / ml naočkovalo do sklenených skúmaviek a nechalo sa rásť počas 5 dní. Účinnosť antimikrobiálnych

činiel na logaritmickú fázu sa testovala naočkovaním 1 x 10⁵ spirochét / ml z kultúry kultivovanej vo dne (obsahujúcej iba spirochety) do 90 µl média BSK-H do 96-jamkových platní pre tkanivové kultúry (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ), ktoré sa inkubovali 5 dní pri 33 ° C s 5% CO₂. Bunky boli ošetrené antimikrobiálnymi činidlami počas 3 dní po inkubačnej perióde dnes. Podobne sa v stacionárnej fáze naočkovalo 1 x 10⁵ buniek / ml do sklenených skúmaviek a nechalo sa rásť 7 dní. Účinnosť antimikrobiálnych látok sa testovala naočkovaním 1 x 10⁶ spirochét / ml do 90 µl média BSK-H na doštičke pre tkanivové kultúry s 96 jamkami, ktorá sa inkubovala 8 dní pri 33 ° C s 5% CO₂.

Perzistujúce bunky v stacionárnej fáze boli ošetrené antimikrobiálnymi činidlami počas 3 dní po 5 dňoch inkubácie.

Biofilmy sa vytvorili naočkovaním 5 x 10⁶ buniek / ml *Borrelia spirochetes* do 1 ml média BSK-H v štvorjamkových komorových podložných sklíčkach (Thermo Scientific, Waltham, MA) alebo plastových / kolagénom potiahnutých 48-jamkových platní pre tkanivové kultúry (BD Falcon), ktoré boli inkubované 7 dní pri 33 ° C s 5% CO₂. Režim ošetrenia biofémov bol rovnaký ako v stacionárnej fáze.

Zlúčeniny a antibiotické prípravky

Rôzne extrakty *Stevia* vyrobené firmami Nutramedix®, Now®, Sweet leaf® a Truvia® boli zakúpené v obchodoch so zdravou výživou v USA a boli náhodne označené ako *Stevia A*, *B*, *C* a *D*. Extrakty *A*, *B* a *C* boli pripravené štandardnou alkoholovou extrakčnou metódou, zatiaľ čo extrakt *D* bol zakúpený v práškovej forme rozpustenej v destilovanej vode. **Steviozid (Sigma) sa pripravil v 0,001% DMSO** a ďalej sa riedil v 1 x fosfátom pufovanom soľnom roztoku (PBS, 0,1 M, pH 7,4 od Sigma). Antibiotiká doxycyklín, cefoperazón a daptomycín (Sigma) v koncentrácii 10 µg / ml sa pripravili v PBS. Všetky antimikrobiálne činidlá sa sterilizovali s použitím 0,2 µm filtračnej jednotky (EMD Millipore, Billerica, MA). Antibiotické roztoky sa rozdelili na alikvóty a skladovali sa pri -20 ° C.

Stanovenie koncentrácie proteínov antimikrobiálnych látok (the antimicrobial agents)

Pretože koncentrácia antimikrobiálnych zložiek v extraktoch *Stevia A*, *B*, *C* a *D* nebola známa, použité koncentračné jednotky spočiatku zahŕňali použitie časti rozpustenej látky na 50 dielov roztoku (riedenie 1:50). Obsah proteínov v antimikrobiálnych látkach sa stanovil Bradfordovým testom (Sigma) s použitím sériových riedení 2 mg / ml zásoby hovädzieho sérového albumínu (Sigma) v PBS pH 7,4 ako štandard. Bradfordovo činidlo sa pridalo k antimikrobiálnym činidlám podľa pokynov výrobcu a inkubovalo sa 10 minút pri teplote miestnosti za mierneho trepania. Absorbancia sa merala pri 595 nm pomocou spektrofotometra BioTek.

Testovanie antimikrobiálnej citlivosti in vitro *B. burgdorferi*

Účinné antibiotiká a identifikované kombinácie antibiotík [30] boli testované na porovnanie a vyhodnotenie účinnosti *Stevie* na *B. burgdorferi*. Ako pozitívna kontrola sa použil doxycyklín (10 µg / ml). Ako negatívna kontrola sa na rozpustenie antibiotík použil 1 x PBS pri pH 7,4 a použil sa 25% alkohol (Fisher Scientific, Pittsburg, PA), pretože všetky extrakty *Stevia* obsahovali rovnaké alkoholové riedidlo.

SYBR Zelená I / PI skúška

Na vyhodnotenie živých a mŕtvych buniek sa uskutočnil štandardný test SYBR Green I / propidiumjodid (SYBR Green I / PI), ako sa už opísalo [30, 31, 46, 47]. K 1 ml sterilizovanej destilovanej vody sa krátko zmiešalo 10 µl SYBR Green I (10 000 x zásoba, Invitrogen, Grand Island, NY) a 30 µl propidiumjodidu (Thermo Scientific). Farbiaca zmes (10 µl) bola pridaná do všetkých jamiek obsahujúcich *B. burgdorferi* a bola inkubovaná v tme počas 15 minút. Doštičky boli merané pomocou fluorescenčného snímača (BioTek FLx800) nastavením excitačnej vlnovej

dĺžky na 485 nm a absorbančnej vlnovej dĺžky na 535 nm (zelená emisía) a 635 nm (červená emisía).

Štandardná rovnica sa stanovila z 1 x 10⁶ buniek (logaritmičná fáza), 5 x 10⁶ buniek (stacionárna fáza) a 1 x 10⁷ buniek (subkultúra 7 dní a 14 dní). Bola pripravená živá a mŕtvych obyvateľov. V prípade populácie mŕtvych buniek boli bunky usmrtené pridaním 300 µl 70% izopropylalkoholu (Fisher Scientific). Suspenzie *B. burgdorferi* v rôznych pomeroch živých / mŕtvych buniek (0:10, 2: 8, 5: 5, 8: 2, 10: 0) sa pridali do jamiek 96-jamkovej platne zodpovedajúcim spôsobom. Farbiaca zmes sa pridala do každej z piatich vzoriek a doštička sa odčítala, ako je uvedené vyššie. Použitím analýzy najmenších štvorcov bola regresná rovnica vypočítaná medzi percentom živých baktérií a pomerom zelenej/červenej fluorescencie. Regresná rovnica sa použila na výpočet percenta živých buniek v každej vzorke skríningovej doštičky. Obrázky ošetrenej vzorky sa tiež odobrali s použitím fluorescenčnej mikroskopie (Leica DM2500).

Celkový počet životaschopných baktérií *B. burgdorferi*

Ako potvrdzovací test sa u SYBR Green / PI zafarbených kultúr hodnotil rast buniek priamym počítaním živých a mŕtvych baktérií s použitím komory na počítanie baktérií (Hausser Scientific, Horsham, PA) a fluorescenčnej mikroskopie (Leica DM2500). Ako je uvedené vyššie, pomocou analýzy najmenšieho štvorca bola regresná rovnica vypočítaná medzi percentom živých baktérií a zelenou / červenou fluorescenciou. pomery. Regresná rovnica sa použila na výpočet percenta živých buniek v každej vzorke.

Dlhodobé subkultúrne experimenty na hodnotenie životaschopnosti ošetrenej stacionárnej fázy kultúry *B. burgdorferi*

Aby sa vyhodnotilo, či sa ošetrenej kultúry stacionárnej fázy môžu znova pestovať v čerstvom médiu, doštičky s 96 jamkami sa

naplnia 100 µl čerstvého média BSK-H. Z ošetrenej stacionárnej fázy kultúr sa do sterilnej 96-jamkovej doštičky (BD Falcon), ktorá obsahovala 100 µl čerstvého média BSK-H, pridalo riedenie 1:75 upravenej kultúry stacionárnej fázy a inkubovalo sa 7 dní a 14 dní bez antimikrobiálneho ošetrovania.

Po inkubácii bola životaschopnosť hodnotená pomocou testu SYBR Green I / PI a metódy priameho počítania.

Účinnosť antimikrobiálnych látok na biofily bola stanovená kvantifikáciou celkovej biomasy pomocou kryštálového fialového sfarbenia. Po inkubácii bolo médium pomaly vyradené a zanechalo za ním pripojené biofily na povrchu platne. Pripojené biofily boli pridaním 500 µl PBS (0,1 M, pH 7,4) do vzoriek. Všetky kroky odstreďovania sa uskutočňovali pri 12 000 x g pri teplote miestnosti. Biofily sa peletovali 5 minút a supernatant sa odhodil. K pelete sa pridal objem 50 µl (0,01%) kryštálovej violeti (Sigma) a zmes sa inkubovala počas 15 minút pri laboratórnej teplote. Nenaviazané zafarbenie sa odstránilo peletizáciou biofilmov počas 5 minút a odstránením supernatantu. Peleta bola premytá 200 µl PBS a opäť peletovaná počas 5 minút. Supernatant sa zlikvidoval navyše k pridaní 200 µl 10% kyseliny octovej (Sigma) do pelety, aby sa uvoľnilo a rozpustilo farbenie.

Vzorky sa potom inkubovali pri teplote miestnosti počas 15 minút. Biofily sa peletovali 5 minút pred extrakciou farbenia kryštálovou violetou z biofilmov, ktoré sa preniesli na 96-jamkovú doštičku a absorbancia sa merala pri 595 nm pomocou spektrofotometra BioTek.

Technika farbenia živých / mŕtvych baktérií

Na vizualizáciu antimikrobiálnej citlivosti biofilmov sa ošetrenej biofilmy zafarbili s použitím SYBR Green (Invitrogen) a propidiumjodidu (Thermo Scientific). Farbenie sa pripravilo podľa protokolu SYBR Green I / PI. Do každej jamky komorového sklíčka sa pridalo 5 µl farbiacej zmesi a zmes sa nechala inkubovať v tme počas 15 minút. Média boli opatrne

odstránené, aby nedošlo k narušeniu pripojeného biofilmu. Doštičky boli zakryté krycím sklíčkom a snímky boli nadobudnuté za použitia fluorescenčnej mikroskopie (Leica DM2500).

Mikroskopia atomárnych síl

Na vizualizáciu morfológie antimikrobiálnych biofilmov pestovaných na podložných sklíčkach (Thermo Scientific) bolo médium opatrne odstránené bez narušenia biofilmu. Kontaktný režim AFM zobrazovanie na vzduchu sa uskutočňovalo na Nanosurf Easyscan 2 AFM (Nanosurf) pomocou sond SHOCONG (APPNANO). Obrázky boli spracované pomocou softvéru Gwyddion (Nečas a Klapetek).

Štatistická analýza

Štatistická analýza sa uskutočnila pomocou dvojstranného Studentovho t-testu (Microsoft Excel, Redmond, WA) a graficky sa použil GraphPad Prism® 6.0 (La Jolla, CA). Všetky experimenty sa uskutočňovali najmenej trikrát oddelene s najmenej tromi vzorkami na experiment. Dáta boli normalizované na kontrolu a prezentované ako priemer ± SD.

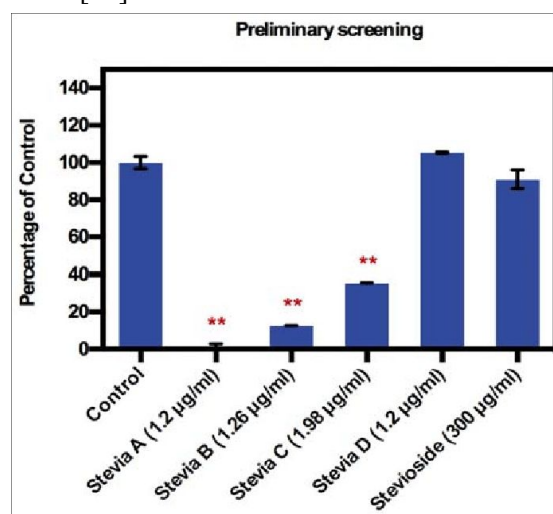
Výsledky

V tejto štúdií sme porovnali a vyhodnotili antimikrobiálny účinok extraktu z celého listu *S. rebaudiana* spolu s antibiotikami doxycyklín, cefoperazón a daptomycín na rôzne morfologické formy (spirochéty, guľaté telieska a biofilmy) *B. burgdorferi*. Použili sme nedávno vyvinutú vysoko výkonnú skriningovú metódu [30, 31, 46] na vyhodnotenie životaschopnosti log fázy a stacionárnej fázy *B. burgdorferi* po rôznych antimikrobiálnych ošetreniach (kvantitatívne a kvalitatívne) v spojení s metódami priameho počítania opísanými v našej predchádzajúca Pre predbežné skriningové experimenty sme vopred testovali všetky činidlá na logaritmickej a stacionárnej fáze *Borrelia* kultúr v rôznych koncentráciách pomocou testu SYBR Green / PI. Naše

publikácia [7]. Podobne ako v nedávnych štúdiách sme hodnotili logaritmickej kultúry *B. burgdorferi*, ktoré pozostávajú z jednotlivých spirochéty, stacionárne fázové kultúry, ktoré pozostávajú z perzistujúcich buniek, a najodolnejšiu formu *B. burgdorferi*, pripojené povrchové biofilmy. Nakoniec sa v spojení s vyššie uvedenými metódami použila mikroskopia atómovej sily na vizualizáciu zmien morfológie v pripojených biofilmoch pred a po liečbe antibiotikami.

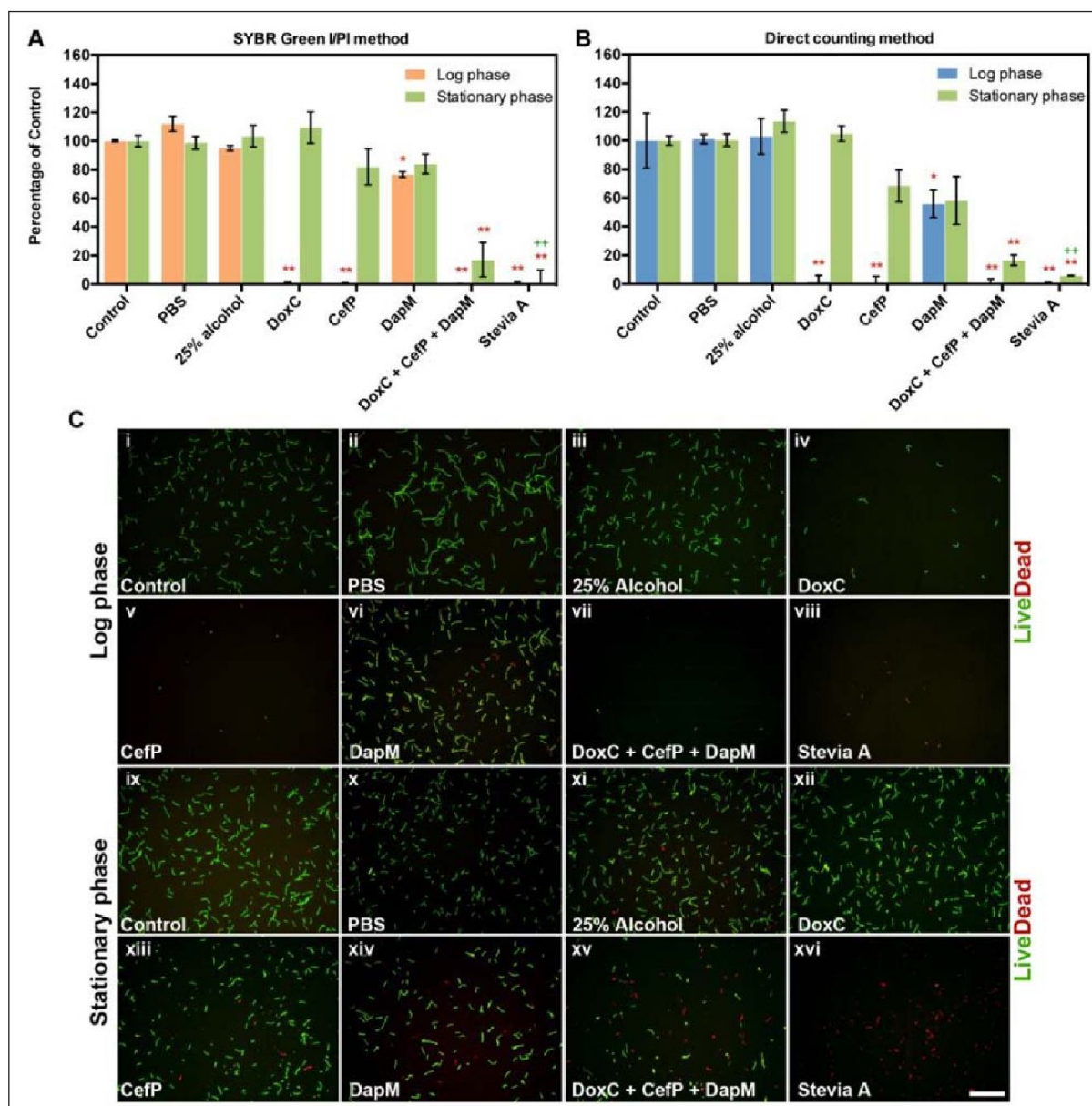
Predbežný skrining rôznych extraktov Stevia

Tu sme najskôr vyhodnotili štyri rôzne komerčne získané extrakty Stevia (3 alkoholové extrakty a jeden extrakt v práškovej forme) a purifikovaný Stevioside na *B. burgdorferi*, aby sme našli najúčinnějšíe činidlo pre ďalšie štúdie pomocou testu SYBR Green / PI. Koncentrácia proteínov štyroch extraktov z listov Stevia sa stanovila štandardným Bradfordovým testom a pohybovala sa od 1,2 µg / ml do 1,9 µg / ml. Steviozid sa testoval pri koncentrácii od 100 do 1 000 µg / ml, čo je koncentrácia navrhnutá v predchádzajúcej štúdií [42].



Obr. 1. Predbežný skrining štyroch rôznych extraktov Stevia a Stevioside na stacionárnej fáze *B. burgdorferi* po trojdňovom ošetrení pomocou testu SYBR Green / PI. n = 3 ± SD, *p < 0,05, **p < 0,01 v porovnaní s kontrolou.

výsledky ukázali, že látky extrahované liehom Stevia A, Stevia B a Stevia C mali významné účinky na životaschopnosť buniek *Borrelia*, ale Stevia D, prášková forma a Stevioside nevykazovali žiadny významný účinok na logaritmickú fázu aj stacionárne fázové bunky. Obrázok 1 predstavuje reprezentatívny experiment, ktorý demonštruje, že Stevia činidlá na báze alkoholu extrahované na báze alkoholu (A, B, C) boli najúčinnnejšie proti borrelským persistentom, zatiaľ čo prášková forma extraktu z listov Stevia (D) a Stevioside nemala žiadny účinok na tieto rezistentné bunky. , Okrem toho Stevia A vykázala najsľubnejší účinok vo všetkých experimentoch, a preto sa Stevia A použila v nasledujúcich experimentoch na rôzne morfológické formy *B. burgdorferi*.



Obr. 2. Citlivosť log fázy (5 dní) a stacionárnej fázy (8 dní) *Borrelia burgdorferi* na antimikrobiálne látky po trojdňovom ošetrení stanovenom (A) analýzou SYBR Green I / PI, (B) priamym počítaním živých a mŕtve bunky zafarbené použitím zmesi SYBR Green I a propidiumjodidu pomocou fluorescenčnej mikroskopie. (C) Reprezentatívne živé / mŕtve obrazy denníka a stacionárnej fázy *B. burgdorferi* na antimikrobiálne látky získané pri 200-násobnom zväčšení (stupnica - 100 μ m). Ako pozitívna kontrola sa použil doxycyklín (DoxC). Ako negatívna kontrola sa použil 1 x PBS a 25% alkohol. Všetky antibiotiká jednotlivito alebo v kombinácii boli použité v koncentrácii 10 μ g / ml. Stevia A sa použila v koncentrácii 1,2 μ g / ml. n = 3 \pm SD, * p <0,05, ** p <0,01 v porovnaní s kontrolou. n = 3 \pm SD, + p <0,05, ++ p <0,01 (doxycyklín v porovnaní so Steviou A). n = 3 \pm SD, * p <0,05, ** p <0,01 (doxycyklín v porovnaní so Steviou A). Skratky: doxycyklín - DoxC, cefoperazón - CefP, daptomycín - DapM

Stevia ako potenciálny agent pri odstraňovaní rôznych foriem B. burgdorferi.

Na porovnanie a vyhodnotenie účinnosti Stevie na *B. burgdorferi* sa nedávno identifikovali potenciálne antibiotiká a ich kombinácie spolu s extraktom Stevia A pomocou testu SYBR Green I / PI na logaritmickú aj stacionárnu fázu kultúr. Ako negatívne kontroly sa použili príslušné množstvá 1 x PBS s pH 7,4 a 25% alkoholu.

Podľa testu SYBR Green I / PI a živých / mŕtvych snímok ošetrenie s 1 x PBS alebo 25% alkoholom významne neznižilo životaschopnosť kultúry logaritmickú fázu bohatej na spirochete a pretrvávalo bohaté stacionárne kultúry v porovnaní s kontrolou (obr. 2A a 2C: panely i – iii a ix – xi). Obrázok 2C: panely i – iii a ix – xi preukázali, že kontrolná kultúra B31, 1 x sterilný PBS a 25% alkoholom ošetrených kultúr obsahovali iba živé bunky (zelené).

V ďalšom súbore experimentov sme testovali niekoľko predtým publikovaných účinných antibiotík na *B. burgdorferi*, ako je doxycyklín, cefoperazón a daptomycín, jednotlivo a v kombináciách [30, 31].

Doxycyklín, ako bolo uvedené skôr [30, 31], bol v porovnaní s kontrolou významne schopný znížiť životaschopnosť log fázy *B. burgdorferi* o ~ 99% (obr. 2A a

2C: panel iv). Ošetrenie doxycyklínom však nemalo významný účinok na bunky v kultúrach stacionárnej fázy, ako bolo pozorované zvýšením podielu životaschopných buniek po vystavení antibiotiku v porovnaní s kontrolou (obr. 2A a 2C: panel xii).

Cefoperazón v koncentrácii 10 µg / ml, ktorý bol predtým identifikovaný ako jedno z liekov s vysokou aktivitou proti perzistentným boreliám [30, 31], významne znížil životaschopnosť *Borrelia* v log fáze o ~ 99% (obr. 2A a 2C: panel v), na rozdiel od toho iba znížila životaschopnosť stacionárnej fázy o ~ 18% v porovnaní s kontrolou (obr. 2A). V stacionárnej fáze kultúry bola pozorovaná veľká populácia živých okrúhlych tvarov tela a zmes živých a mŕtvych spirochetálnych buniek (obr. 2C: panel xiii).

Daptomycín, jeden z ďalších liekov, ktoré boli predtým identifikované so silnou aktivitou proti borreliovým perzistátom [30, 31], tiež významne znížil živú kultúru obohatenú spirochetálne o 23%, ale bol menej citlivý pri znižovaní životaschopných buniek v stacionárnej fáze (~ 16% zníženie živých buniek) v porovnaní s kontrolou (obr. 2A). Obrázky demonštrovali, že bunky ošetrené daptomycínom, ako log, tak stacionárna fáza vykazujú viac živých buniek ako odumreté bunky (obr. 2C: panely vi a xiv) v porovnaní s kontrolou.

Nedávna štúdia uvádza, že kombinácia doxycyklínu, cefoperazónu a daptomycínu úspešne eliminovala spirochety aj perzistory [30]. Naše údaje z

táto štúdia tiež potvrdila účinnosť týchto treeantibiotických kombinácií na *B. burgdorferi* výrazným vylúčením živých spirochetov v živej log fáze (100% efekt) a tiež významne znížila životaschopnosť kultúry stacionárnej fázy o ~ 86% (obr. 2A, a 2C: panely vii a xv).

V týchto experimentoch sme tiež testovali potenciálne antimikrobiálne činidlo Stevia A ako individuálne činidlo a porovnali sme jeho účinnosť s jednotlivými antibiotikami a kombináciou troch antibiotík. Na obrázkoch 2A a 2C: panely viii a xvi, Stevia A významne eliminovala spirochety log fázy a stacionárne fázy perzistentné v porovnaní s kontrolou (100% účinok pre obidva). Log fáza a kultúra stacionárnej fázy ošetrené Steviou A mali iba mŕtve bunky (Obr. 2C: panely viii a xvi).

Na obrázku 2A bola účinnosť doxycyklínu a kombinácie troch antibiotík porovnaná so Steviou A.

Významná eliminácia (hodnota $p < 0,01$) u perzistujúcich osôb bola zistená u Stevie A v porovnaní s doxycyklínom.

Priame počítanie potvrdzuje účinnosť Stevie A na spirochetách v logaritmickú fázu a na perzistentoch bohatých na stacionárnu fázu

Na ďalšiu validáciu účinnosti antimikrobiálnych látok hodnotených pomocou testu SYBR Green I

/ PI sa priame počítanie uskutočnilo tak, ako bolo opísané skôr [7, 31].

Podľa metódy priameho počítania negatívne kontroly, 1 x sterilný PBS a 25% alkohol, významne neznížili počet životaschopných buniek v logaritmickú aj stacionárnu fázu v porovnaní s kontrolou (obr. 2B). Zatiaľ čo doxycyklín významne znížil životaschopnosť *Borrelia* v logaritmickú fázu o ~ 98%, neznížil životaschopnosť stacionárnej fázy v porovnaní s kontrolou (obr. 2B). Cefoperazón bol tiež významne schopný znížiť životaschopnosť logaritmickú borrelie o ~ 99% (obr. 2B), zatiaľ čo cefoperazón v kultúrach stacionárnej fázy bol menej účinný (~ 32% zníženie) pri eliminácii perzistov, ako bolo pozorované zvýšením podielu zostávajúce životaschopné bunky po expozícii antibiotikám v porovnaní s kontrolou (obr. 2B a 2C: panel xiii). Daptomycín významne znížil živú kultúru log fázy obohatenú o spirochetál o ~ 44% a tiež významne znížil stacionárnu fázu o ~ 42% v porovnaní s kontrolou (obr. 2B). Troj-antibiotická kombinácia doxycyklínu, cefoperazónu a daptomycínu významne eliminovala kultúru log fázy a tiež kultúru stacionárnej fázy o približne 84% v porovnaní s kontrolou (obr. 2B). Silné antimikrobiálne činidlo, Stevia A, významne eliminovalo spirochety log fázy a významne znížilo perzistencie o ~ 94% (obr. 2B).

Na obrázku 2B bola účinnosť doxycyklínu a kombinácií troch antibiotík porovnaná so Steviou A. Významná redukcia (hodnota $p < 0,01$) u perzistorov bola zistená so Steviou A v porovnaní s doxycyklínom.

Účinnosť Stevie A po 7-dňovej a 14-dňovej subkultúre antimikrobiálnej liečby B. burgdorferi

Vo vyššie uvedených experimentoch sme demonštrovali účinnosť Stevie A na spirochety a perzistory *Borrelia* a poskytli sme údaje, že jej významný účinok je veľmi porovnateľný s kombináciou troch antibiotík, ktorá bola uvedená predtým [31]. Aby sme potvrdili účinnosť Stevie na perzistentoch, uskutočnili sme 7-denný a

14-dňový subkulturálny experiment v čerstvom médiu BSK-H, aby sme zistili, či by perzistory, ak vôbec nejaké zostali v kultúre, mohli znova rásť v testovanom čerstvom médiu. pomocou zelenej I / PI SYBR a metódami priameho počítania.

Ako sa očakávalo, ošetrovanie negatívnymi kontrolami, 1 x PBS a 25% alkoholu, bolo schopné úspešne znova osídliť médium prevažujúcimi zelenými živými bunkami podobnými neošetrovanej kontrole B31 po 7 a 14 dňovej subkultúre (Obr. 3A a 3C: panely i – iii a ix – xi). Troj-antibiotická kombinácia a cefoperazón viedli po 7-dňovej subkultúre k 5–7% životaschopných buniek, ale došlo k významnému zvýšeniu počtu životaschopných buniek ošetrovaných cefoperazónom o 14% a zvýšeniu životaschopných buniek ošetrovaných cefoperazónom o 11%. 3-antibiotická kombinácia po 14-dňovej subkultúre (obr. 3A a 3C: panely v, vii, xiii a xv). Po 7-dňovej subkultúre a 14-dňovej subkultúre došlo k významnému zvýšeniu životaschopných buniek zo vzorky ošetrovanej doxycyklínom po 14 dňoch (obr. 3A a 3C: panely iv a xii).

Ošetrovanie daptomycínom však produkovalo prevažujúce živé bunky po 7-dňovej a 14-dňovej subkultúre (obr. 3A a 3C: panely vi a xiv). Je zaujímavé, že nedošlo k opätovnému rastu vo vzorke ošetrovanej Steviou A, pretože po 7-dňovej subkultúre boli iba mŕtve bunky (100% eliminácia) a po subkultúre počas 14 dní bolo pozorované iba 10% zvýšenie životaschopných buniek (obr. 3A a 3C: panely viii a xvi).

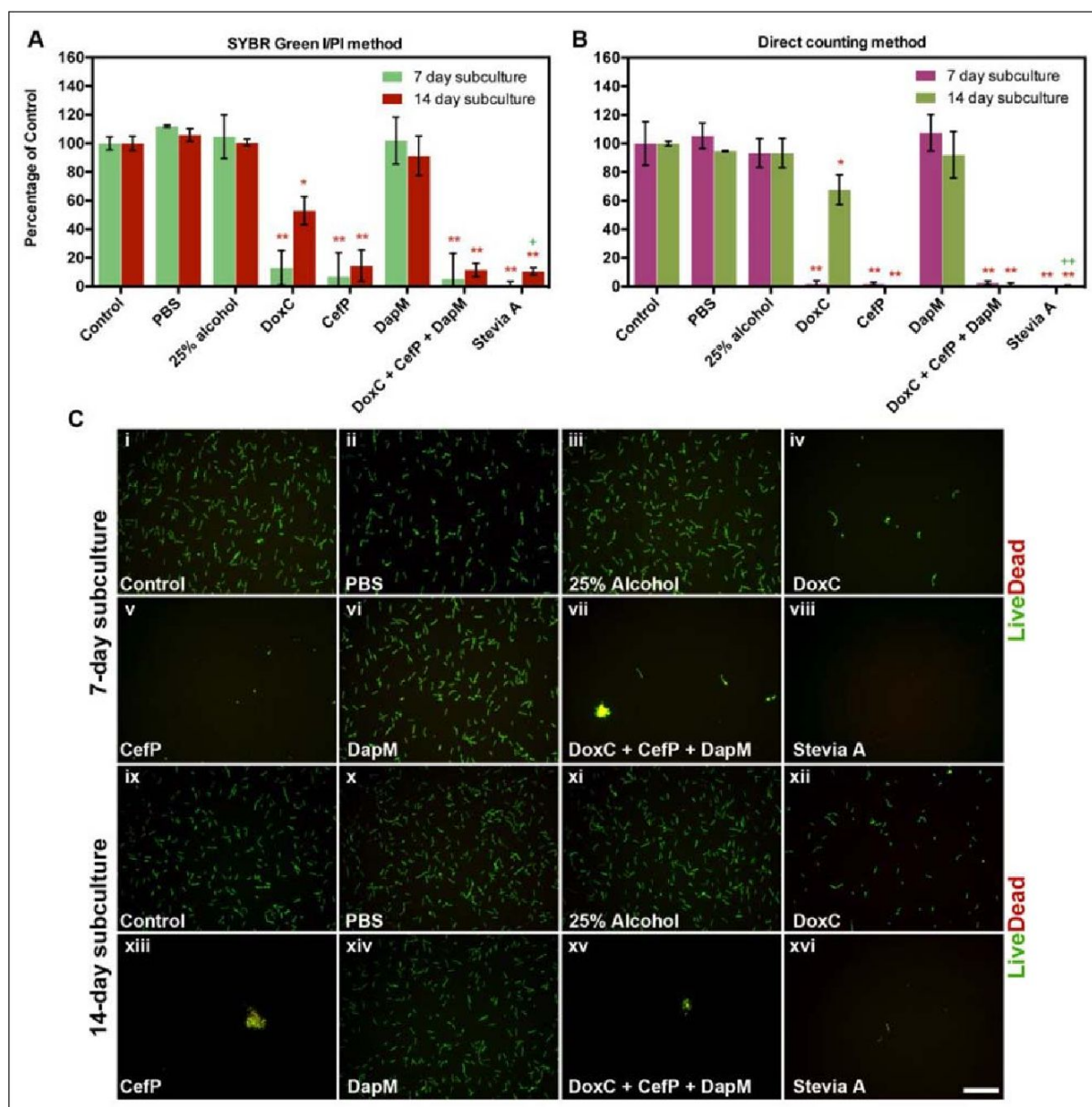
Na obrázku 3A sa porovnávala účinnosť doxycyklínu a kombinácie troch antibiotík po 7-dňovej a 14-dňovej subkultúre so Steviou A. Významná redukcia (hodnota $p < 0,05$) sa zistila pri opätovnom raste *Borrelia* Stevia A v porovnaní s doxycyklínom po 14-dňovej subkultúre.

Priame mikroskopické počítanie potvrdilo test SYBR Green I / PI a ukázalo, že kontroly bez liečiva a negatívne kontroly (1 x PBS a 25% alkohol) rástli dobre v 7-dňových a 14-dňových subkultúrach (Obr. 3B). Vzorky ošetrované

doxycyklínom, cefoperazónom a kombináciou troch antibiotík vytvorili po 7 dňoch ~ 2% životaschopných buniek.

(Obr. 3B). Cefoperazón a kombinácia troch antibiotík produkovali ~ 1% životaschopných buniek po 14-dňovej subkultúre (Obr. 3B). Po 14-dňovej subkultúre však došlo k zvýšeniu životaschopných buniek o 68% ošetrovaných doxycyklínom (obr. 3B). Bunky ošetrované daptomycínom sa dokázali lepšie zotaviť ako iné antibiotické náprotivky s opätovným rastom podobným kontrole bez liečiva v 7 a 14 dňových subkultúrach (obrázok 3B). Vzorky ošetrované Steviou A po 7-dňovej subkultúre nevykazovali žiadne známky opätovného rastu a po 14-dňovej subkultúre sa pozorovalo iba 1% životaschopných buniek (obrázok 3B).

Na obrázku 3B bola účinnosť doxycyklínu a kombinácie troch antibiotík v metóde priameho počítania po 7-dňovej a 14-dňovej subkultúre porovnaná so Steviou A. Signifikantná redukcia (hodnota $p < 0,01$) v po 14-dňovej subkultúre sa zistil opätovný rast *Borrelie* so Steviou A v porovnaní s doxycyklínom.



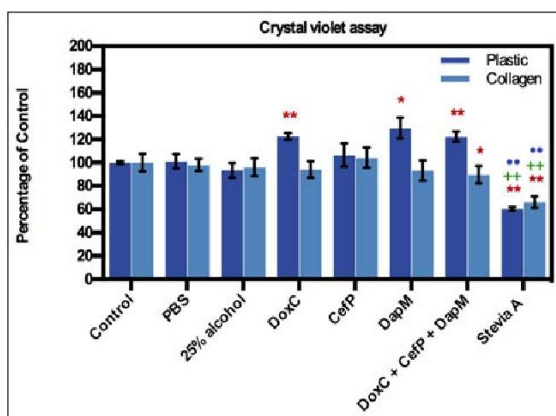
Obr. 3. Sedemdňová a štrnásťdňová subkultúra 8-dňovej kultúry stacionárnej fázy *Borrelia burgdorferi* ošetrenej antimikrobiálnymi činidlami, ktorá bola stanovená pomocou (A) testu SYBR Green I / PI a priameho počítania živých a mŕtvych buniek zafarbených pomocou zmes SYBR Green I a propídiujodidu pomocou fluorescenčnej mikroskopie. (B) Reprezentatívne živé / mŕtve obrazy 7-dňovej subkultúry v stacionárnej fáze *B. burgdorferi* ošetrenej antimikrobiálnymi látkami, urobené pri 200-násobnom zväčšení (stupnica - 100 μ m). Ako pozitívna kontrola sa použil doxycyklín (DoxC). Ako negatívna kontrola sa použil 1 x PBS a 25% alkohol. $n = 3 \pm SD$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ v porovnaní s kontrolou. $n = 3 \pm SD$, + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ (doxycyklín v porovnaní so Steviou A). $n = 3 \pm SD$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (doxycyklín v porovnaní so Steviou A). Skratky: doxycyklín - DoxC, cefoperazón - CefP, daptomycín - DapM

Stevia A významne znížila biofilmy Borrelia pestované na plastových a kolagénových povrchoch

Bolo pozorované, že rôzne morfológické formy *B. burgdorferi*, t. J. Spirochetálna forma, guľaté telieska a biofilmy, majú rôznu antimikrobiálnu vnímavosť [7].

V našej predchádzajúcej publikácii sme charakterizovali citlivosť biofilmu na *B. burgdorferi* na antibiotiká a zistili sme, že ide o najodolnejšiu formu [7]. V tejto štúdií sme vyhodnotili účinok antimikrobiálnych látok na biofilmy *Borrelia* pestované na plastových a kolagénových povrchoch, zafarbili sme antimikrobiálne ošetrené biofilmy kryštálovou violeťou, aby sme kvantifikovali účinnosť rôznych antimikrobiálnych látok.

Biofilmy pestované na plastovom povrchu a ošetrené negatívnymi kontrolami, 1 x PBS alebo 25% alkoholu, nevykazovali zníženie hmotnosti biofilmov v porovnaní s neošetrenými biofilmovými kontrolami (obrázok 4). Biofilmy ošetrené doxycyklínom, cefoperazónom, daptomycínom a kombináciou troch antibiotík vykázali v porovnaní s kontrolou bez drogy významné zvýšenie hmotnosti biofilmu *Borrelia* (obr. 4). Ošetrenie Steviou A však v porovnaní s kontrolou významne znížilo biofilmy *Borrelia* na plaste asi o 40% (obr. 4).



Obr. 4. Citlivosť biofilmov *Borrelia burgdorferi* pestovaných na plastovom a kolagénom potiahnutom povrchu na antimikrobiálne látky po

trojdňovom ošetrení stanovenom kryštálovou fialovou analýzou.

Ako pozitívna kontrola sa použil doxycyklín (DoxC). Ako negatívna kontrola sa použil 1 x PBS a 25% alkohol. Všetky antibiotiká jednotlivito alebo v kombinácii boli použité v koncentrácii 10 µg / ml. Stevia A sa použila v koncentrácii 1,2 µg / ml. $n = 3 \pm SD$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ v porovnaní s kontrolou. $n = 3 \pm SD$, + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ (doxycyklín v porovnaní so Steviou A). $n = 3 \pm SD$, • $p < 0,05$, •• $p < 0,01$ (doxycyklín porovnaný so Steviou A). Skratky: doxycyklín - DoxC, cefoperazón - CefP, daptomycín - DapM

Biofilmy pestované na kolagénom potiahnutom povrchu ukazujú, že ošetrenie negatívnou kontrolou, 1 x PBS alebo 25% alkoholu, nepreukázalo zníženie hmotnosti biofilmu v porovnaní s kontrolou (obr. 4). Ošetrenie doxycyklínom a daptomycínom nemalo významný vplyv na biofilmovú hmotnosť *Borrelia* (obr. 4). Pri liečbe cefoperazónom došlo k nárastu biofilmov *Borrelia* pestovaných na kolagéne, a naopak, v týchto biofilmoch sa pozorovalo 10% zníženie pri porovnaní s treeantibiotickou kombináciou v porovnaní s kontrolou (obr. 4).

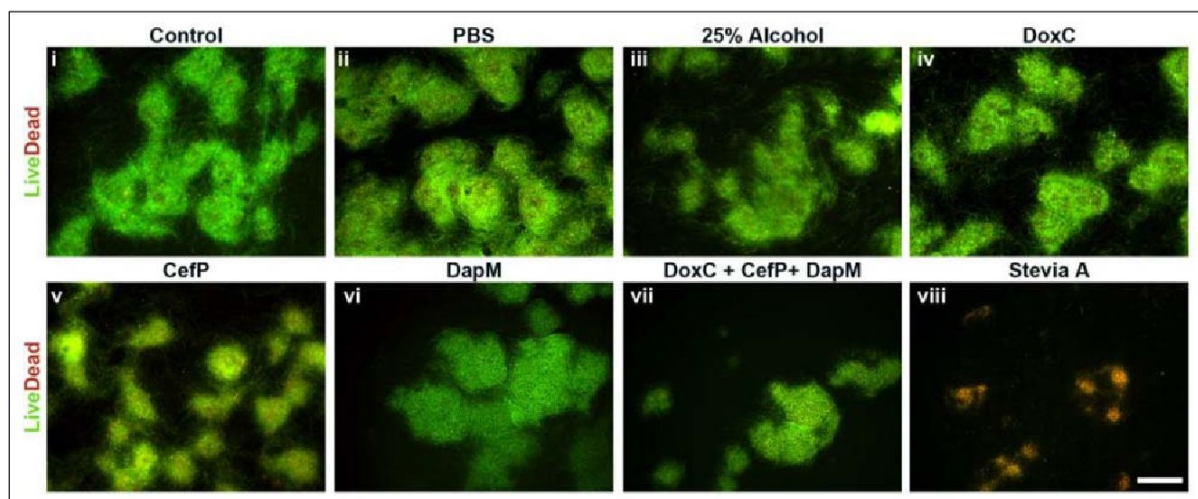
Okrem toho biofilmy ošetrené Steviou A tiež vykazovali významné zníženie kolagénu o ~ 34% v porovnaní s kontrolou (obr. 4). Aby sa vyhodnotila účinnosť doxycyklínu a kombinácie troch antibiotík voči Stevii A, výsledky na obrázku 4 ukázali, že došlo k významnému zníženiu celkovej biomasy *Borrelia* pestovanej na plastových a kolagénových povrchoch Steviou A v porovnaní s doxycyklínom a kombinácia troch antibiotík (hodnota $p < 0,01$).

Stevia A znižuje životaschopnosť pripojených biofilmov Borrelia

Aby bolo možné priamo sledovať životaschopnosť pripojených biofilmov po antimikrobiálnom ošetrení, zafarbili sme ošetrené biofilmy pomocou zmesi SYBR Green I a

propidium jodidu (živé / mŕtve škvrny). Biofilmy *Borrelia* ošetrené 1 x PBS a 25% alkoholu boli veľké a kompaktné, väčšinou zafarbené na zeleno, čo ukazuje, že biofilm bol živý. Obr.

-denná liečba stanovená pomocou testu s kryštálovou violetou.

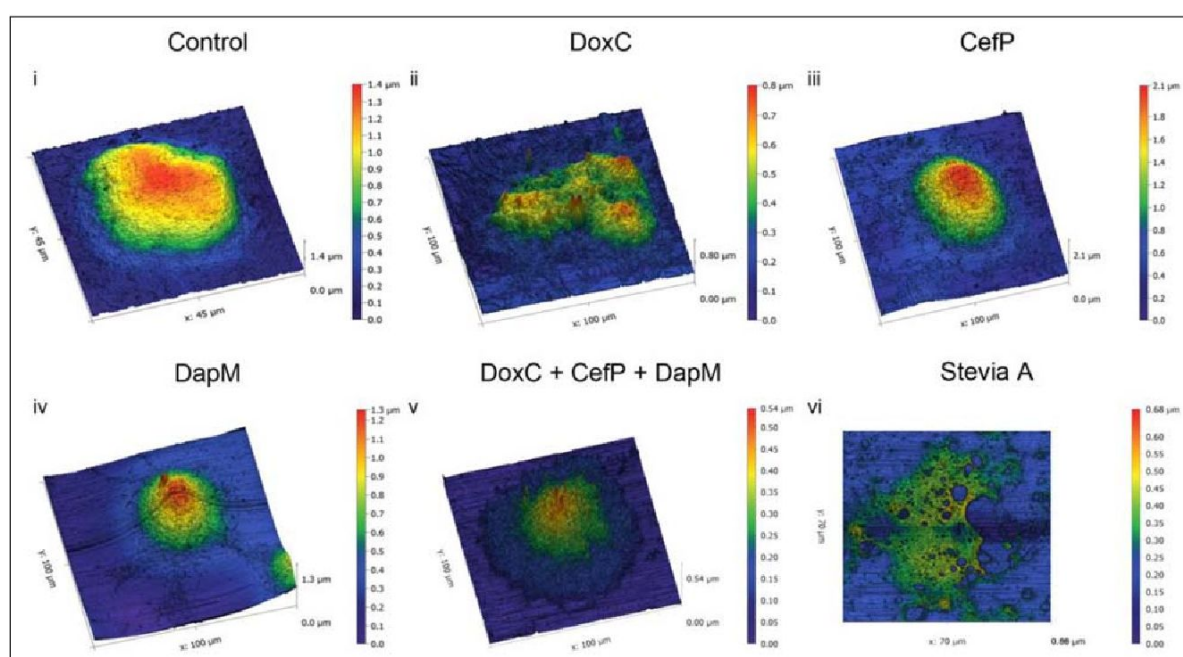


Obr. 5. Reprezentatívne živé / mŕtve obrázky biofilmov *Borrelia* ošetrených rôznymi antimikrobiálnymi činidlami, po ktorých nasledovalo vyfarbenie zmesou farbív SYBR Green I a PI pri 200-násobnom zväčšení. Ako pozitívna kontrola sa použil doxycyklín (DoxC). Ako negatívna kontrola sa použil 1 x sterilný PBS a 25% alkoholu. Všetky antibiotiká jednotlivo alebo v kombinácii boli použité v koncentrácii 10 µg / ml. Stevia A sa použila v koncentrácii 1,2 µg / ml. Mierka stupnice - 100 µm. Skratky: doxycyklín - DoxC, cefoperazón - CefP, daptomycín - DapM

Ako pozitívna kontrola sa použil doxycyklín (DoxC). Ako negatívna kontrola sa použil 1 x PBS a 25% alkoholu. Všetky antibiotiká jednotlivo alebo v kombinácii boli použité v koncentrácii 10 µg / ml. Stevia A sa použila v koncentrácii 1,2 µg / ml. $n = 3 \pm SD$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ v porovnaní s kontrolou. $n = 3 \pm SD$, + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ (doxycyklín v porovnaní so Steviou A). $n = 3 \pm SD$, • $p \leq 0,05$, •• $p \leq 0,01$ (doxycyklín v porovnaní so Steviou A). Skratky: doxycyklín - DoxC, cefoperazón - CefP, daptomycín - DapM (obr. 5: panely ii a iii). Biofilmy ošetrené cefoperazónom boli významne menšie v porovnaní s biofilmami ošetrenými doxycyklínom a obidve boli zelené s malými červenými škvrnami, čo naznačuje, že boli nažive (obr. 5: panely iv a v). Biofilmy ošetrené daptomycínom boli veľké a kompaktné a zafarbené prevažne zelenými živými bunkami (obr. 5: panel vi), zatiaľ čo biofilmy ošetrené kombináciou antibiotík boli tvorené zmesou živých a mŕtvych buniek s prevládajúcimi živými bunkami (obr. 5: panel vii). Ošetrenie

biofilmu *Borrelia* Stevia A sa zafarbilo prevažne červeno, čo ukazuje, že biofilm mal hlavne mŕtve spirochéty a guľaté telieska (obrázok 5: panel viii).

Morfológia biofilmu ošetreného Stevia A bola malá a voľne zabalená v porovnaní s biofilmami ošetrenými antibiotikami (obr. 5: panel viii).



Obr. 6. Reprezentatívne snímky z mikroskopu atómovej sily (AFM), ukazujúce ultraštruktúrne detaily biofilmu *Borrelia burgdorferi* pred a po liečbe antimikrobiálnymi látkami. Prípravky biofilmov kmeňa B31 *B. burgdorferi* na podložných sklíčkach sú opísané v časti Materiály a metódy. Všetky biofilmy boli skenované pri 0,4 Hz použitím kontaktného režimu a jednotlivé rozsahy Z (výška) sú vyznačené vedľa každého panelu pomocou stupnice. Obrázky boli skenované pomocou softvéru Nanosurf Easyscan 2 a obrázky boli spracované pomocou softvéru Gwyddion. Všetky antibiotiká jednotlivo alebo v kombinácii boli použité v koncentrácii 10 µg / ml. Stevia A sa použila v koncentrácii 1,2 µg / ml. Skratky: doxycyklín - DoxC, cefoperazón - CefP, daptomycín - DapM

AFM analýza ukazuje voľnú morfológiu s biofilmami ošetrovanými Steviou A

Mikroskopické snímky atómovej sily, ktoré sú vykreslené v 3D a digitálne zafarbené, aby sa zlepšila vizualizácia, ukazujú ultraštruktúrne vlastnosti v biofilmoch pred a po liečbe antimikrobiálnymi látkami. Červená farba ukazuje najvyšší vrchol v biofilme, čo znamená predovšetkým potenciálnu prítomnosť biofilmu EPS matrice. Kontrola bez liečiva mala veľmi kompaktnú a tuhú štruktúru s výrazným hromadením EPS (obr. 6: panel i). Biofilmy ošetrované doxycyklínom, cefoperazónom, daptomycínom a kombináciou troch antibiotík boli podobné ako pri kontrole s kompaktnou štruktúrou s viac potenciálnymi vrstvami EPS (obr. 6: panely ii – v). Zaujímavé je, že biofilmy ošetrované Steviou majú veľmi voľnú štruktúru, pričom vrstva EPS je takmer nevytvorená (obr. 6: panel vi).

Diskusia

V tejto štúdií sme hodnotili antimikrobiálny potenciál extraktov Stevia z celého listu proti patogénu spôsobenému lymfskou chorobou, *B. burgdorferi*. Porovnali sme antimikrobiálny účinok Stevie s antibiotikami (doxycyklín, cefoperazón, daptomycín) a ich kombináciu, o ktorých sa nedávno zistilo, že sú účinné proti perzistentným boreliám [31]. Pre túto štúdiu sme sa rozhodli použiť novú kvantitatívnu metódu vyvinutú J. Fengom a kol. v kombinácii s našou predtým zaznamenanou metódou priameho počítania [7, 30, 31, 46]. Zistenia z tejto štúdie ukazujú, že extrakt z celého listu Stevia ako samostatný prostriedok bol účinný proti všetkým známym morfológickým formám *B. burgdorferi*. V predbežnom skríningovom experimente s použitím rôznych extraktov Stevie sme demonštrovali významnú zmenu v účinnosti alkoholových extraktov Stevia (Stevia A, Stevia

B a Stevia C) na perzistentných boreliách v porovnaní s práškovou formou Stevia (Stevia D.) a purifikovaný Stevioside, ktorý nevykazoval žiadny účinok (obr. 1).

Zistili sme tiež, že jedna zo zlúčenín Stevia, Stevia A, významne eliminovala perzistencie *Borrelia* v porovnaní s inými extraktmi Stevia (obr. 1). Toto by sa mohlo vysvetliť nahlásenými zmenami pozorovanými v rôznych fytochemických koncentráciách rôznych extraktov Stevia, ktoré boli dôsledkom pestovateľských podmienok a používaných poľnohospodárskych postupov [47, 48]. Pretože Stevia A bola účinná pri eliminácii borreliových perzistov, bola Stevia A vybraná na ďalšie skúmanie účinnosti rôznych morfológických foriem *B. burgdorferi*.

V nasledujúcom súbore experimentov sme porovnávali účinnosť Stevie A s antibiotikami a kombináciami treeantibiotík, ktoré boli v posledných správach J. Fenga a kol., [31] najprv účinné, u *Borrelia spirochetes* a potom u perzistujúcich osôb pomocou kvantitatívnej metódy vyvinutý J. Fengom a kol. a E. Sapi a kol. Zistili sme, že Stevia, dokonca aj pri nižšej koncentrácii (1,2 µg / ml), by mohla významne eliminovať životaschopnosť skorej log fázy a stacionárnych kultúr *B. burgdorferi* pomocou metódy SYBR Green I / PI (obr. 2A a 2C: panely viii a xvi), ktorý bol tiež nakonfigurovaný pomocou metódy priameho počítania (obr. 2B a 2C: panely viii a xvi). Podľa správy J. Feng a kol. (2015), daptomycín a cefoperazón, hoci sú účinné proti perzistentným boreliám, nedokázali úplne odstrániť mikrokolonovú formu *B. burgdorferi* [30]. Z predchádzajúcich in vivo a in vitro štúdií sa tiež zistilo, že doxycyklín bol účinný pri eliminácii spirochét, ale nie perzistov *Borrelia* [7, 16, 17, 30, 31]. J. Feng a kol. tiež ukázali, že kombinácia troch antibiotík (doxycyklín, cefoperazón a daptomycín) bola veľmi potencionom, ktorá eliminovala perzistov *Borrelia* bohaté na stacionárne fázy [30]. V tejto štúdii sme poskytli dôkaz, že Stevia A ako samostatná látka bola schopná eliminovať spirochéty a perzistencie z *Borrelia* podobne ako

v prípade opísanej trojdrogovej kombinovanej liečby. Naše údaje tiež ukázali, že antibiotiká v kombinácii s perzistenciami v *Borrelia* boli skutočne v súlade s predchádzajúcou štúdiou [30]; tento výsledok ďalej potvrdzuje účinnosť Stevie A.

V našich predchádzajúcich štúdiách sme charakterizovali biofilmovú formu *B. burgdorferi* in vitro a preukázali sme, že predstavuje formu, ktorá je najviac rezistentná na antibiotiká [24]. Uvádza sa tiež, že biofilmy pripojené na povrch sú chránené pred antibiotikami alebo inými antimikrobiálnymi látkami [28, 29]. V tejto štúdii sme tiež hodnotili účinok všetkých antimikrobiálnych látok na pripojené biovrstvy *Borrelia*. Naše výsledky ukázali, že Stevia A je veľmi účinná pri znižovaní pripojenej biofilmovej hmoty *Borrelia* na povrchoch potiahnutých plastom aj kolagénom o ~ 40% (obr. 4), zatiaľ čo jednotlivé antibiotiká skutočne indukovali veľkosť biofilmovej hmoty (obr. 4).

Už predtým sa uvádzalo, že určité antibiotiká môžu skutočne podporovať tvorbu bakteriálnych biofilmov [49]. Jedným z možných vysvetlení je, že bunky v biofilmoch sa dokážu chrániť pred nepriaznivým prostredím antibiotík [24, 28] tým, že vyvinuli niekoľko obranných mechanizmov, ako sú zlá penetrácia antibiotík, fenotypové zmeny buniek tvoriacich sa v biofilme, expresia výtokových púmp a prítomnosť perzistujúcich buniek, ktoré odolávajú umieraniu, keď sú vystavené antimikrobiálnym látkam [28, 29]. Perzistéri sú subpopuláciou vysoko rezistentných buniek, ktoré sa nachádzajú medzi normálnymi bunkovými populáciami, a sú spiace a vysoko chránené [28]. Štúdie ukazujú, že malá frakcia buniek v biofilmoch nebola po dlhodobej liečbe antibiotikami ovplyvnená [29, 53].

Zrejماً otázka, ako by Stevia mohla ovplyvniť vysoko odolný biofilm *Borrelia*, si vyžaduje ďalšie vyšetrenie. V štúdii používajúcej cukorný alkohol sa uvádza, že xylitol pôsobí ako antiplaque agent tým, že narúša tvorbu biofilmov v ústnej dutine [54]. V inej štúdii preukázali, že xylitol ovplyvňuje produkciu adhezívnych polysacharidov *Streptococcus mutans* [55].

Už predtým sa preukázalo, že cukry primárne prijímajú antibiotiká

Staphylococcus aureus a *Escherichia coli* [56]. Na základe týchto predchádzajúcich zistení predpokladáme, že *Stevia* by mohla pôsobiť ako derivát cukru, ktorý by mohol primárne vychytávať fytochemikálie zodpovedné za antimikrobiálny účinok, a tým narušiť štruktúru biofilmu. Na podporu našej hypotézy sme tiež ukázali, že ultraštruktúra biofilmu ošetrovaného *Stevia* A má veľmi voľnú morfológiu s veľkými plytkými jamami v porovnaní s kompaktnou štruktúrou biofilmov ošetrovaných doxycyklinom, cefoperazónom, daptomycínom a antibiotickou kombináciou (Obr. 6: panely ii – vi).

Aby sa ďalej potvrdila účinnosť *Stevie*, uskutočnili sme dlhodobé subkulturálne experimenty s použitím antimikrobiálnej, stacionárnej fázy prevládajúcej s *Borrelia persister*, prevedením populácie ošetrovaných buniek do čerstvého kultivačného média, aby sme zistili, či životaschopné bunky môžu znova dorásť po 7- deň a 14 dní bez prítomnosti antimikrobiálneho činidla. Ukázalo sa, že prírodné antimikrobiálne činidlo (*Stevia* A) je účinné bez opätovného rastu životaschopných buniek po 7-dňovej subkultúre a iba 10% nárast životaschopných buniek po 14-dňovej subkultúre. Účinky kombinácie troch antibiotík v porovnaní so *Steviou* A narástli s 5% a 11% životaschopných buniek, ako boli zistené pomocou metódy SYBR Green I / PI a potvrdené fluorescenčnou mikroskopiou (obr. 3A a 3B: panely vii) , viii, xv a xvi). Tiež sme pozorovali, že *Borrelia* liečená doxycyklinom a cefoperazónom, ktorá nevykazovala žiadny významný účinok proti perzistujúcim organizmom (obr. 2A, 2B a 2C: panely xii a xiii), zotavovala sa len s 13% a 6% životaschopných buniek po 7 denná subkultúra (obr. 3A a 3C: panely iv a v). Jedným z možných vysvetlení tohto javu by mohlo byť to, že citlivosť na antibiotiká sa mohla obnoviť, keď sa baktérie dispergujú z biofilmu za priaznivých podmienok [28].

Extrakt z listov *Stevia* je široko používanou náhradou cukru [39–41, 57]; posledné štúdie však ukazujú, že jeden z hlavných glykozidov, steviosid, by mohol mať antimikrobiálny účinok proti *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa* [42]. Tieto antimikrobiálne štúdie používali vysokú koncentráciu purifikovaného steviozidu a v našej štúdiu sme dosiahli podobný antimikrobiálny účinok proti *Borrelia* použitím nižšej koncentrácie celého extraktu z listov. Naše údaje s očisteným Steviozidom nepreukázali žiadny významný antimikrobiálny účinok na *Borrelia spirochetes* a perzistentné látky v porovnaní s extraktmi z celého listu *Stevia* (obr. 1).

Toto zistenie naznačuje, že ďalšie zložky v extrakte z celého listu *Stevia* by mohli mať antimikrobiálnu aktivitu proti *B. burgdorferi*, ktoré sa v budúcich štúdiách ešte musia identifikovať. V dobrej zhode s našimi zisteniami extrakt z listov *Stevia* tiež preukázal antimikrobiálnu aktivitu proti patogénom, ako sú *E. coli*, *S. aureus*, *Vibrio mimicus*, *Salmonella typhimurium*, *S. mutans*, *Bacillus subtilis*, *Shigella dysenteriae* a *Vibrio cholera* [38]. -42]. Ďalšou otázkou je, či by sa *Stevia* mohla bezpečne používať ako terapeutické činidlo. Toxikologické štúdie ukázali, že *Stevia* nemá mutagénne, teratogénne alebo karcinogénne účinky [57], a nedávne štúdie preukázali jej bezpečnosť pri vysokých úrovniach príjmu potravy [57–59]. V štúdiu skúmajúcej mutagenitu Stevioside a Steviolu sa zistilo, že Stevioside v dávke 10 mg / ml nevyvolával žiadnu mutáciu v *S. typhimurium* [60]. Okrem týchto štúdií existujú dve dôležité klinické štúdie založené na glykoproteínoch prítomných v *Stevii*. V randomizovanej, dvojito zaslepenej štúdiu¹ s čínskymi mužmi a ženami, ktoré zažili mierne nadmerné napätie, sa uvádza, že steviozid glykoproteínu znížil systolický a diastolický

¹ Pozn. prekladu: *Dvojito zaslepená štúdia je štúdia, v ktorej ani účastníci, ani experti nevedia, kto je liečený. Tento postup sa používa na zabránenie zaujatosti vo výsledkoch výskumu. Dvojito zaslepené štúdie sú obzvlášť užitočné na prevenciu zaujatosti v dôsledku charakteristík dopytu alebo účinku placeba.*

krvný tlak a tiež zlepšil kvalitu života bez toho, aby spôsobil akékoľvek nepriaznivé účinky v porovnaní s placebom [44]. V inej štúdií sa analyzovali akútne účinky steviosidu u pacientov s diabetom 2. typu [45]. V porovnaní s kontrolnou skupinou steviozid znižuje postprandiálne hladiny glukózy v krvi u pacientov s diabetom 2. typu [45]. Zistilo sa, že obe tieto štúdie používali zapuzdrenú práškovú formu steviozidu a extrakt z celých listov, ktoré sa užívali perorálne [44, 45]. Zistilo sa tiež, že jedna z klinických štúdií používala celý listový prípravok, ktorý obsahoval 91% steviozidu, 4% rebaudiozidu A a 5% ďalších derivátov steviozidu [45]. Výsledok z týchto klinických štúdií ukazuje, že pacienti nezaznamenali žiadne nepriaznivé účinky pri používaní steviozidu [44, 45]. Aj keď je bezpečnosť Stevie široko študovaná, je nevyhnutných viac štúdií in vivo, aby sa Stevia mohla použiť ako antimikrobiálna látka pri akýchkoľvek infekčných chorobách. Naším budúcim cieľom je ďalej skúmať jednotlivé zložky extraktu z celého listu Stevia proti *B. burgdorferi* a identifikovať najúčinnjšiu zložku zodpovednú za jeho významný antimikrobiálny účinok.

Záverom možno povedať, že celková antimikrobiálna účinnosť extraktu Stevia A na rôzne morfológické formy *B. burgdorferi* bola porovnateľná s kombináciou určitých antibiotík. Aj keď výsledky tejto predbežnej štúdie nemožno priamo extrapolovať na klinickú prax, sú potrebné ďalšie nadväzujúce štúdie, ktoré môžu riešiť bezpečnosť Stevie a ďalej identifikovať najúčinnšie zložky proti *Borrelii*.

Pod'akovanie

Autori ďakujú Arun Timmaraju MS za jeho cenné príspevky a prehodnotenie rukopisu. Táto práca bola podporená grantmi z University of New Haven, Joshua Research Foundation, Nadácie Toma Crawforda pre vedenie detí, Národnej filantropickej dôvery, Alyssa Wartmanových fondov pre E.S. a postgraduálnych štipendií z NH Charitable Foundation na P.A.S.T. a K.M.S. Ďakujeme tiež Lymedisease.org,

Schwartz Research Foundation for the donation of the Atomic Force and the Leica DM2500 microscopes,

ako aj Hamamatsu ORCA Digital Camera a Global Lyme Alliance for the AFM supporting computer.

Referencie

References

1. Radolf JD, Caimano MJ, Stevenson B, Hu LT: Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol* 10, 87–99 (2012)
2. Stricker RB, Johnson L: Lyme disease: The next decade. *Infect Drug Resist* 4, 1–9 (2011)
3. CDC [Internet]. Lyme Dis website 2014 [cited 2015 Jun 9]; Available from: <http://www.cdc.gov/lyme/ststs/index.html>
4. Donta ST: Tetracycline therapy for chronic Lyme disease. *Clin Infect Dis* 25 (Suppl 1), S52–S56 (1997)
5. Massarotti EM, Luger SW, Rahn DW, Messner RP, Wong JB, Johnson RC, et al.: Treatment of early Lyme disease. *Am J Med* 92, 396–403 (1992)
6. Dattwyler RJ, Volkman DJ, Conaty SM, Platkin SP, Luft BJ: Amoxicillin plus probenecid versus doxycycline for treatment of erythema migrans borreliosis. *Lancet* 336, 1404–1406 (1990)
7. Sapi E, Kaur N, Anyanwu S, Luecke DF, Datar A, Patel S, et al.: Evaluation of in-vitro antibiotic susceptibility of different morphological forms of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Drug Resist* 4, 97–113 (2011)
8. Eppes SC, Childs JA: Comparative study of cefuroxime axetil versus amoxicillin in children with early Lyme disease. *Pediatrics* 109, 1173–1177 (2002)
9. Centers for Disease Control and Prevention (PTLDS) [Internet]. Lyme Dis website 2014 [cited 2015 Jun 8]; Available from: <http://www.cdc.gov/lyme/postlds/index.html>
10. Berndtson K: Review of evidence for immune evasion and persistent infection in Lyme disease. *Int J Gen Med* 6, 291–306 (2013)
11. Bockenstedt LK, Gonzalez DG, Haberman AM, Belperron AA: Spirochete antigens persist near cartilage after murine Lyme borreliosis therapy. *J Clin Invest* 122, 2652–2660 (2012)
12. Hodzic E, Feng S, Holden K, Freet KJ, Barthold SW: Persistence of *Borrelia burgdorferi* following antibiotic treatment in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 1728–1736 (2008)
13. Diterich I, Rauter C, Kirschning CJ, Hartung T: *Borrelia burgdorferi*-induced tolerance as a model of persistence via immunosuppression. *Infect Immun* 71, 3979–3987 (2003)
14. Hodzic E, Imai D, Feng S, Barthold SW: Resurgence of Persisting non-cultivable *Borrelia burgdorferi* following antibiotic treatment in mice. *PLoS One* 23, 1–11 (2014)
15. Barthold SW, Hodzic E, Imai DM, Feng S, Yang X, Luft BJ: Ineffectiveness of tigecycline against persistent *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 643–651 (2010)
16. Straubinger RK, Summers BA, Chang YF, Appel MJG: Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *J Clin Microbiol* 35, 111–116 (1997)
17. Embers ME, Bartholdk SW, Borda JT, Bowers L, Doyle L, Hodzic E, et al.: Persistence of *borrelia burgdorferi* in rhesus macaques following antibiotic treatment of disseminated infection. *PLoS One* 7, 1–12 (2012)
18. Marques A, Telford SR, Turk S-P, Chung E, Williams C, Dardick K, et al.: Xenodiagnosis to detect *Borrelia burgdorferi* infection: a first-in-human study. *Clin Infect Dis* 58, 937–945 (2014)
19. Klempner MS, Baker PJ, Shapiro ED, Marques A, Dattwyler RJ, Halperin JJ, et al.: Treatment trials for post-lyme disease symptoms revisited. *Am J Med* 126, 665–669 (2013)
20. Fallon BA, Keilp JG, Corbera KM, Petkova E, Britton CB, Dwyer E, et al.: A randomized, placebo-controlled trial of repeated IV antibiotic therapy for Lyme encephalopathy. *Neurology* 70, 992–1003 (2008)

21. Krupp LB, Hyman LG, Grimson R, Coyle PK, Melville P, Ahn S, et al.: Study and treatment of post Lyme disease (STOP-LD): a randomized double masked clinical trial. *Neurology* 60, 1923–1930 (2003)
22. Brorson Ø, Brorson S-H, Scythes J, MacAllister J, Wier A, Margulis L: Destruction of spirochete *Borrelia burgdorferi* round-body propagules (RBs) by the antibiotic tigecycline. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18656–18661 (2009)
23. Miklossy J, Kasas S, Zurn AD, McCall S, Yu S, McGeer PL: Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. *J Neuroinflammation* 5, 1–18 (2008)
24. Sapi E, Bastian SL, Mpoy CM, Scott S, Rattelle A, Pabbati N, et al.: Characterization of biofilm formation by *Borrelia burgdorferi* in vitro. *PLoS One* 7, 1–11 (2012)
25. Alban PS, Johnson PW, Nelson DR: Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Microbiology* 146, 119–127 (2000)
26. Brorson O, Brorson SH: In vitro conversion of *Borrelia burgdorferi* to cystic forms in spinal fluid, and transformation to mobile spirochetes by incubation in BSK-H medium. *Infection* 26, 144–150 (1998)
27. Vlamakis H, Chai Y, Beaugard P, Losick R, Kolter R: Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol* 11, 157–168 (2013)
28. Stewart PS: Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 292, 107–113 (2002)
29. Mah TF: Regulating antibiotic tolerance within biofilm microcolonies. *J Bacteriol* 194, 4791–4792 (2012)
30. Feng J, Auwaerter PG, Zhang Y: Drug combinations against *Borrelia burgdorferi* persists in vitro: eradication achieved by using daptomycin, cefoperazone and doxycycline. *PLoS One* 10, 1–15 (2015)
31. Feng J, Wang T, Shi W, Zhang S, Sullivan D, Auwaerter PG, et al.: Identification of novel activity against *Borrelia burgdorferi* persists using an FDA approved drug library. *Emerg Microbes Infect* 3, 1–8 (2014)
32. Cowan MM: Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12, 564–582 (1999)
33. Datar A, Kaur N, Patel S, Luecke DF, Sapi E: In vitro effectiveness of samento and banderol herbal extracts on the different morphological forms of *Borrelia burgdorferi*. *Townsend Lett* (2010)
34. Osman K, Evangelopoulos D, Basavannacharya C, Gupta A, McHugh TD, Bhakta S, et al.: An antibacterial from *Hypericum acmosepalum* inhibits ATP-dependent MurE ligase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents* 39, 124–129 (2012)
35. Zuo GY, An J, Han J, Zhang YL, Wang GC, Hao XY, et al.: Isojacareubin from the Chinese herb *Hypericum japonicum*: potent antibacterial and synergistic effects on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Mol Sci* 13, 8210–8218 (2012)
36. Wangchuk P, Keller PA, Pyne SG, Taweechotipatr M, Tonsomboon A, Rattanajak R, et al.: Evaluation of an ethnopharmacologically selected Bhutanese medicinal plants for their major classes of phytochemicals and biological activities. *J Ethnopharmacol* 137, 730–742 (2011)
37. Clinical studies using natural antimicrobial agents on patients with Lyme disease [Internet] 2007 [cited 2015 Jun 9]; Available from: <http://www.nutramedix.ec/ns/lyme-protocol>
38. Ghosh S, Subudhi E, Nayak S: Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogens plant materials and microorganisms determination of minimum inhibitory concentration (MIC). *Int J Integrative Biology* 2, 27–31 (2008)
39. Mohammadi-Sichani, M: Effect of different extracts of *Stevia rebaudiana* leaves on *Streptococcus mutans* growth. *J Med Plants Res* 6, 4731–4734 (2012)

40. Jayaraman S, Manoharan MS: In-vitro antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) Leaf Extracts 7, 1143–1149 (2008)
41. Siddique AB, Rahman SMM, Hossain MA, Rashid MA: Phytochemical screening and comparative antimicrobial potential of different extracts of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Asian Pacific J Trop Dis* 4, 275–280 (2014)
42. Puri M, Sharma D: Antibacterial activity of stevioside towards food-borne pathogenic bacteria. *Eng Life Sci* 11, 326–329 (2011)
43. Khaybullin RN, Strobykina IY, Dobrynin AB, Gubaydullin AT, Chestnova R V., Babaev VM, et al.: Synthesis and antituberculosis activity of novel unfolded and macrocyclic derivatives of ent-kaurane steviol. *Bioorganic Med Chem Lett* 22, 6909–6913 (2012)
44. Hsieh MH, Chan P, Sue YM, Liu JC, Liang TH, Huang TY, et al.: Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with mild essential hypertension: a two-year, randomized, placebo-controlled study. *Clin Ther* 25, 2797–2808 (2003)
45. Gregersen S, Jeppesen PB, Holst JJ, Hermansen K: Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism* 53, 73–76 (2004)
46. Feng J, Wang T, Zhang S, Shi W, Zhang Y: An Optimized SYBR Green I/PI assay for rapid viability assessment and antibiotic susceptibility testing for *Borrelia burgdorferi*. *PLoS One* 9, 1–8 (2014)
47. Serfaty M, Ibdah M, Fischer R, Chaimovitch D, Saranga Y, Dudai N: Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and harvest regime. *Ind Crops Prod* 50, 731–736 (2013)
48. Das K, Dang R, Gupta N: Comparative antimicrobial potential of different extracts of leaves of *Stevia*. *Int J Nat Eng Sci* 3, 65–68 (2009)
49. Kaplan JB: Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs* 34, 737–751 (2011)
50. Oglesby-Sherrouse AG, Djapgne L, Nguyen AT, Vasil AI, Vasil ML: The complex interplay of iron, biofilm formation, and mucoidy affecting antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathog Dis* 70, 307–320 (2014)
51. Ciofu O, Tolker-Nielsen T, Jensen PØ, Wang H, Høiby N: Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Adv Drug Deliv Rev* 85, 7–23 (2014)
52. Iorio NLP, Caboclo RF, Azevedo MB, Barcellos AG, Neves FPG, Domingues RMCP, et al.: Characteristics related to antimicrobial resistance and biofilm formation of widespread methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* ST2 and ST23 lineages in Rio de Janeiro hospitals, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 72, 32–40 (2012)
53. Brooun A, Liu S, Lewis K: A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 640–646 (2000)
54. Nisticò R, Piccirilli S, Cucchiaroni ML, Armogida M, Guatteo E, Giampà C, et al.: Neuroprotective effect of hydrogen peroxide on an in vitro model of brain ischaemia. *Br J Pharmacol* 153, 1022–1029 (2008)
55. Söderling E, Alaräisänen L, Scheinin A, Mäkinen KK: Effect of xylitol and sorbitol on polysaccharide production by and adhesive properties of *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 21, 109–116 (1987)
56. Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ: Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature* 473, 216–220 (2011)
57. Thomas JE, Glade MJ: *Stevia*: it's not just about calories. *Open Obes J* 2, 101–109 (2010)
58. Anton SD, Martin CK, Han H, Coulon S, Cefalu WT, Geiselman P, et al.: Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite* 55, 37–43 (2010)
59. Carakostas MC, Curry LL, Boileau a. C, Brusick DJ: Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally

occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food Chem Toxicol* 46, 1–10 (2008)

60. Matsui M, Matsui K, Kawasaki Y, Oda Y, Noguchi T, Kitagawa Y, et al.: Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. *Mutagenesis* 11, 573–579 (1996)