

УДК 582.282.23.043

О. Ю. Зінченко, асист., Т. О. Філіпова, д-р біол. наук, проф.,
Б. М. Галкін, д-р біол. наук, проф., В. О. Іваниця, д-р біол. наук,
проф., З. І. Жиліна, д-р хім. наук, проф., С. В. Водзинський, канд.
хім. наук, пров. наук. співроб, Н. С. Водзинська, студ.
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ АСИМЕТРИЧНО МЕЗО-ЗАМІЩЕНИХ ПОРФІРИНІВ

Досліджено антимікробну активність асиметрично мезо-заміщеного синтетичного порфірину та його комплексу з цинком по відношенню до клітин *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli*. Показано, що досліджені сполуки здатні вбивати клітини мікроорганізмів, причому більш виражений ефект спостерігали у присутності вільної основи порфірину. Крім того, досліджені сполуки підвищують чутливість бактерій до антибіотиків.

Ключові слова: асиметрично заміщені порфірини, антимікробна активність, чутливість до антибіотиків.

У останні роки швидке поширення антибіотикорезистентних штамів патогенних мікроорганізмів, викликане безконтрольним застосуванням антибіотиків, робить особливо актуальною проблему пошуку принципово нових протимікробних агентів. Перспективною групою сполук вважають синтетичні порфірини, що вже протягом тривалого часу застосовуються як фотосенсибілізатори для лікування онкологічних захворювань [1]. Останнім часом з'явилося багато повідомлень про використання цих речовин для фотодинамічного знищення збудників поверхневих інфекцій [2-4]. Однак більшість дослідників не приділяє достатньої уваги вивченню здатності синтетичних порфіринів пригнічувати ріст мікроорганізмів без опромінення світлом, так званої темної активності.

Ураховуючи зазначене вище, метою даної роботи було вивчення антимікробних властивостей асиметрично мезо-заміщеного синтетичного порфірину та його комплексу з цинком та з'ясування деяких механізмів їх дії. Асиметрична будова молекули, на думку сучасних дослідників, є передумовою для успішного проникнення порфіринів усередину бактеріальних клітин [5].

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження слугували 5,10,15-три(N-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфірин тритозилат (I) та його комплекс з цинком (II), синтезовані у ПНДЛ № 5 Одеського національного університету ім. І. І. Мечникова [6]. Усі сполуки для приготування робочих розведень розчиняли у дистильованій воді. Антимікробні властивості даних сполук досліджували на поліре-

зистентних до антибіотиків штаммах *Staphylococcus aureus* ОГУ 223 та *Escherichia coli* ОГУ 206, отриманих з музею мікроорганізмів кафедри мікробіології і вірусології ОНУ. Вибір тест-мікроорганізмів був обумовлений необхідністю порівняння впливу синтетичних порфіринів на грамнегативні та грампозитивні бактерії. Зберігання тест-штамів здійснювали на скошеному м'ясо-пептонному агарі (МПА) в пробірках при 4 °С.

Для виявлення наявності у досліджуваних сполук антимікробної активності готували середовище Гісса з глюкозою без індикатора Андреде. Середовище розливали в пробірки по 1 мл. Для кожної речовини ставили ряд пробірок з середовищем, яке містило 40 мкМ досліджуваної сполуки. Кількість паралелей для кожного варіанту дорівнювала 5. Пробірки з середовищем стерилізували в автоклаві при 0,5 атм [7].

Культури тест-мікроорганізмів, вирощені на скошеному МПА в пробірках, змивали стерильним фізіологічним розчином. Густоту отриманої суспензії визначали за стандартом мутності ДКІ № 9.

Суспензію розводили до концентрації $2 \cdot 10^4$ кл/мл і вносили по 0,05 мл в пробірки зі стерильним середовищем Гісса.

Культури з порфіринами інкубували в термостаті при температурі 37 °С. За контроль правили культури мікроорганізмів, паралельно вирощені в середовищі Гісса без додавання досліджуваних речовин. Через 24 та 48 годин від культуральної рідини відбирали 0,05 мл та провадили висів на поверхню МПА у чашках Петрі шпателем Дрігальського [7]. За необхідності культуру розводили фізіологічним розчином. Чашки Петрі інкубували в термостаті при температурі 37 °С протягом доби і підраховували кількість колоній, що вирости на чашках Петрі. Кількість КУО в 1 мл обчислювали за формулою:

$$\text{КУО} = A \cdot 10^n / V,$$

де КУО — кількість колонієутворюючих одиниць, А — кількість колоній, що вирости на поверхні МПА у чашках Петрі, 10^n — розведення посівного матеріалу, V — об'єм посівного матеріалу.

Другим етапом роботи було визначення впливу досліджуваних сполук на чутливість тест-штамів до антибіотиків, оскільки зміна цього показника може сприяти розумінню механізмів дії синтетичних тетрапіролів на бактеріальні клітини. Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків визначали за стандартною методикою дворазових розведень [8]. У досліджах використовували еритроміцин та тетрациклін, до яких тест-штами були резистентними. Вибір антибіотиків був обумовлений різною природою даних препаратів: тетрациклін, як відомо, належить до гідрофільних антибіотиків тоді, як еритроміцин — гідрофобний агент.

Результати та їх обговорення

У результаті досліджень було встановлено, що вільна основа дослідженого порфірину характеризується високим рівнем бактерицидної активності як по відношенню до клітин *S. aureus* ОГУ 223, так і *E. coli* ОГУ 206:

протягом першої доби з 1000 клітин стафілокока, внесених до середовища, не виживало жодної (табл. 1). Така ж картина спостерігалася і у випадку *E. coli* ОГУ 206.

Таблиця 1
Вживаність клітин *S. aureus* ОГУ 223 і *E. coli* ОГУ 206 у присутності синтетичних порфіринів

Мікроорганізм	Варіант	КУО мл	
		24 години	48 годин
<i>S. aureus</i> ОГУ 223	Контроль	$2 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$
	I	0	0
	II	60	0
<i>E. coli</i> ОГУ 206	Контроль	$9 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$
	I	0	0
	II	$1,6 \cdot 10^2$	$3,1 \cdot 10^2$

Цинковий комплекс був дещо менш активним по відношенню до *S. aureus* ОГУ 223, оскільки протягом першої доби кількість живих клітин зменшувалася на два порядки, проте, наступної доби у культурі не виявлялося клітин, здатних утворювати колонії. Тобто, у даному випадку спостерігали уповільнення дії. Що ж стосується *E. coli* ОГУ 206, то протягом першої доби кількість живих клітин зменшувалася на порядок, а наступної доби — подвоювалася. Таким чином, деяка частина клітин *E. coli* ОГУ 206 виявилася нечутливою до дії даної сполуки і була здатна навіть розмножуватися у її присутності (табл. 1).

Проте, було неясно, чи настає загибель клітин у присутності сполуки I унаслідок прямого лізису, чи це відбувається унаслідок інгібування порфіринами якихось ключових метаболічних процесів. Для відповіді на це питання було проведено ряд дослідів з метою визначення характеру дії даних сполук на періодичні культури тест-штамів. Спочатку було побудовано криві росту тест-мікроорганізмів та визначено початок логарифмічної фази. Для *S. aureus* ОГУ 223 та *E. coli* ОГУ 206 час початку експоненційного росту культури було прийнято за 120 хв. Суспензії клітин даних мікроорганізмів вносили у рідке середовище Гісса та підрожували протягом цього часу, після чого додавали розчин сполуки I, приготований таким чином, щоб кінцевий вміст порфірину в середовищі дорівнював 40 мкМ.

Як видно з рис., після додавання сполуки I до культури *S. aureus* ОГУ 223 у логарифмічній фазі росту поділ клітин відразу припинявся. Проте, зменшення оптичної густини культури протягом 3 годин не спостерігалось, тобто, лізису клітин не відбувалось. Таким чином, можна припустити, що загибель клітин стафілокока наставала не внаслідок руйнування клітинних структур, а завдяки блокуванню порфіринами важливих процесів життєдіяльності. У культурі *E. coli* ОГУ 206 поділ клітин продовжувався ще протягом години після додавання до середовища досліджуваних сполук, після чого значення оптичної густини культури залишалось приблиз-

но на одному рівні з невеликими відхиленнями (рис.). Таким чином, в даному випадку також не спостерігали лізису клітин, що дає підставу вважати причиною загибелі бактерій участь порфіринів у певних метаболічних процесах та подальше їх інгібування.

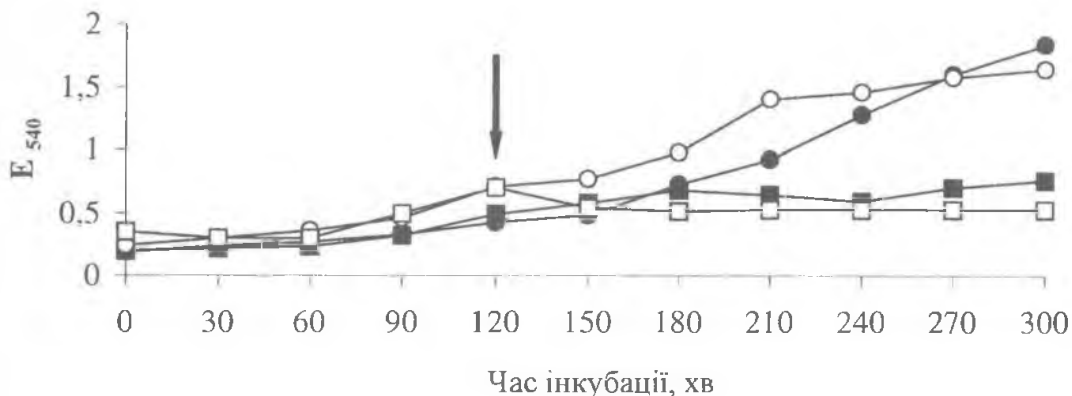


Рис. Вплив 5,10,15-три(N-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфірин тритозилату на ріст періодичних культур *S. aureus* ОГУ 223 та *E. coli* ОГУ 206.

Примітка: колами позначено контроль, квадратами — оптичну густину культури, до якої додавали сполуку I, заштриховані фігури — значення для *E. coli* ОГУ 206, пусті фігури — значення для *S. aureus* ОГУ 223, стрілкою позначено момент додавання порфірину.

На наступному етапі вивчали здатність порфіринів впливати на чутливість бактерій до еритроміцину та тетрацикліну. Спочатку було визначено МІК даних антибіотиків для тест-мікроорганізмів. Для стафілокока МІК еритроміцину та тетрацикліну складала 60 та 240 мкг/мл відповідно, для кишкової палички — 120 та 240 мкг/мл відповідно. У досліджах використовували концентрації 5 та 1 мкМ кожної речовини, оскільки у таких кількостях досліджувані сполуки самі по собі не пригнічували росту бактерій. Дані, наведені у табл. 2, свідчать про те, що 5 мкМ обох досліджених сполук зменшували МІК еритроміцину для стафілокока у 16 разів. При сумісній дії 1 мкМ вільної основи та еритроміцину спостерігали таке ж саме підвищення чутливості мікроорганізма, у присутності 1 мкМ цинкового комплексу МІК еритроміцину зменшувалася увосьмеро.

Чутливість *S. aureus* ОГУ 223 до тетрацикліну також суттєво змінювалася при додаванні синтетичних порфіринів: МІК антибіотика зменшувалася у 16 разів.

У випадку *E. coli* ОГУ 206 МІК еритроміцину при додаванні як 5, так і 1 мкМ досліджуваних сполук зменшувалася у 16 разів (табл. 2).

На чутливість кишкової палички до тетрацикліну вільна основа досліджуваного порфірину не впливала. Цинковий комплекс три(N-метил)-20-(N-ноніл)порфіринату тритозилату у обох використаних концентраціях зменшував МІК тетрацикліну у 16 разів.

Таким чином, досліджені сполуки не тільки мають високий рівень бактерицидної активності, але й здатні підвищувати чутливість резистентних

штамів бактерій до антибіотиків. Грамнегативні бактерії є менш чутливи-ми до впливу досліджених сполук.

Таблиця 2
Вплив порфіринів на чутливість *S. aureus* ОГУ 223 і *E. coli* ОГУ 206 до антибіотиків

Мікро-організм	Варіант	МІК еритроміцину, мкг/мл		МІК тетрацикліну, мкг/мл	
		Концентрація порфіринів			
		1 мкМ	5 мкМ	1 мкМ	5 мкМ
<i>S. aureus</i> ОГУ 223	Контроль*	60		240	
	I	3,75	3,75	15	15
	II	7,50	3,75	15	15
<i>E. coli</i> ОГУ 206	Контроль*	120		240	
	I	7,50	7,50	240	240
	II	7,50	7,50	15	15

Примітка: * – МІК антибіотика без додавання порфіринів.

У літературі є дані про здатність порфіринів потрапляти усередину клітин грамнегативних бактерій самоіндукованим шляхом [8]. Таке явище можливе завдяки здатності катіонних порфіринів заміщувати двовалентні катіони Mg^{2+} , які зв'язують сусідні молекули ліпополісахаридів зовнішньої мембрани, сприяючи підвищенню інтегрованості даної структури. За умов такого заміщення відбувається дезінтеграція мембрани і порушення її бар'єрних функцій [9]. Таким чином полегшується надходження антибіотиків усередину бактеріальних клітин, що є можливим поясненням підвищення чутливості до них грамнегативних мікроорганізмів. Вважають, що асиметрична будова молекули полегшує заміщення катіонів Mg^{2+} та руйнування зовнішньої мембрани.

У випадку грамположитивних бактерій механізм подолання резистентності неясний. Можливо, досліджені сполуки здатні порушувати механізми захисту клітин від антибактеріальних агентів.

Таким чином, отримані результати дозволяють зробити наступні висновки:

1. Асиметрично заміщені порфірини мають потужну бактерицидну активність.
2. Вільна основа асиметрично заміщеного порфірину виявляє більш значну активність, ніж металокомплекс.
3. Загибель бактерій настає не внаслідок безпосереднього лізису клітин за участю порфіринів, а, очевидно, завдяки участі порфіринів у певних метаболічних процесах та подальшому їх інгібуванню.
4. Досліджені сполуки здатні значно підвищувати чутливість тест-штамів до антибіотиків. Механізм цього явища не з'ясований.

Отримані дані свідчать про доцільність подальшого вивчення властивостей асиметричних порфіринів та можливість створення на основі порфіринів та антибіотиків комбінованих препаратів для підвищення ефективності антибактеріальної терапії.

Дослідження проведено у рамках проекту 4.05.1, що виконується за держзамовленням МОН України.

Література

1. Верле Д., Гирт А., Богдан-Рай Т. Фотодинамическая терапия рака: второе и третье поколения фотосенсибилизаторов // Известия РАН. Серия химическая. — 1999. — Т. 137, № 5. — С. 836-845.
2. Bertoloni G., Sacchetto R., Jory G. Protoporphyrin photosensitization of *Enterococcus hirae* and *Candida albicans* cells // Las. Life Sci. — 1993. — V. 5, № 3. — P.267-275.
3. Філіпова Т. О., Зінченко О. Ю., Галкін Б. М., Жилина З. І. Темнова та фотоіндукована дія синтетичних порфіринів на клітини *Pseudomonas aeruginosa* // Одеський медичний журнал. — 2004. — Т. 81, № 1. — С. 29 — 32.
4. Зінченко О. Ю. Вплив порфіринів на ріст грамположитивних і грамнегативних бактерій // Вісник ОНУ. Біологія. — 2003. — Т. 8, вип. 2. — С. 157 — 160.
5. Hamblin M. R., O'Donnell D. A., Murthy N. Policationic photosensitizer conjugates: effect of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria // J. Antimicrob. Chemother. — 2002. — V. 49, № 8. — P. 941-951.
6. Жилина З. І., Бардай Л. П., Мельник В. І. Водорозчинні азакраун-порфірини // Вісник ОНУ. Хімія. — 2001. — Т. 6, вип. 5. — С. 40-43.
7. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М. О. Биргера. — М.: Медицина, 1972. — С. 175 — 177.
8. Minnik A., Vernon D. I., Schofield J. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli* // Antimicrob. Agents Chemother. — 2000. — V. 5, № 5. — P. 522-527.
9. Nakae T. Outer-membrane permeability of bacteria // Crit. Rev. Microbiol. — 1986. — V. 13, № 1. — P. 1-62.

О. Ю. Зинченко, Т. О. Филиппова, Б. Н. Галкин, В. А. Иваница,
З. И. Жилина, С. В. Водзинский, Н. С. Водзинская
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА АСИММЕТРИЧНО МЕЗО-ЗАМЕЩЕННЫХ ПОРФИРИНОВ

Резюме

Изучена антимикробная активность асимметрично мезо-замещенного синтетического порфирина и его комплекса с цинком по отношению к клеткам *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Показано, что исследованные соединения способны вызывать гибель бактериальных клеток, причем свободное основание порфирина характеризовалось более высоким уровнем активности, чем его комплекс с цинком. Кроме того, изученные порфирины значительно увеличивают чувствительность бактерий к антибиотикам. Эта особенность свидетельствует о возможности повышения эффективности антибиотикотерапии за счет создания комбинированных препаратов, содержащих порфирины.

Ключевые слова: асимметрично замещенные порфирины, антимикробная активность, чувствительность к антибиотикам.

**O. Yu. Zinchenko, T. O. Philippova, B. N. Galkin, V. A. Ivanitsa,
Z. I. Zhilina, S. V. Vodzinskii, N. S. Vodzinskaya**

Odessa Mechnikov National University,
Dvoryanskaya st., 2, Odessa, 65026, Ukraine

ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF ASYMMETRIC MESO-SUBSTITUTED PORPHYRINS

Summary

The antimicrobial activity of asymmetric *meso*-substituted porphyrin and its Zn-complex towards *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* cells was studied. It was shown that studied compounds can cause the bacterial cell death and the free base of porphyrin is more active than its Zn-complex. Moreover, studied porphyrins enlarge significantly the bacterial antibiotic sensitivity. This particularity is a premises for making of combined drugs on the base of antibiotics and porphyrins to increasing of antibacterial therapy effectiveness.

Key words: asymmetric *meso*-substituted porphyrins, antimicrobial activity, antibiotic sensitivity.