

М.Б. Галкін, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (048) 765 33 61,
e-mail: aerugen@onu.edu.ua

СИНТЕЗ ПІОЦІАНІНУ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ЗА ВПЛИВУ ВІСМУТОВИХ МЕТАЛОКОМПЛЕКСІВ ПОРФІРИНІВ ТА АУТОІНДУКТОРІВ СИСТЕМИ *QUORUM SENSING*

Показано, що самі по собі вісмутові комплекси порфіринів знижують синтез піоціаніну *P. aeruginosa* пропорційно до їх концентрації у середовищі. Найбільшу інгібуючу активність виявляє Bi(III) -ТПП, найменшу – Bi(III) -ПП IX. За присутності 0,4 мкМ Bi(III) -ТПП кількість піоціаніну у добовій культурі зменшується у 1,8 разу від контролю. При 40 мкМ Bi(III) -ТПП кількість пігменту була нижчою у 2,3 разу, а при 80 мкМ – у 3,1 разу. 3-оксо- C_{12} -АГЛ удвічі знижує вміст піоціаніну у культурі без порфіринів і потенціює інгібувальний вплив вісмутових комплексів на синтез пігменту. У присутності C_4 -АГЛ спостерігається помірне (на 10–20%) збільшення вмісту піоціаніну у контрольній культурі і за сумісного впливу з порфіринами. PQS повністю відновлює до контрольного рівня синтез пігменту за присутності Bi(III) -ТХП та Bi(III) -ПП IX і підвищує його у 1,3–3,0 рази за дії Bi(III) -ТПП. В культурі без порфіринів вміст піоціаніну за впливу цього аутоіндуктора збільшувався на 20%.

Ключові слова: піоціанін, вісмутові комплекси порфіринів, аутоіндуктори системи *quorum sensing* *Pseudomonas aeruginosa*.

Quorum sensing (QS) є глобальною системою регуляції у бактерій, яка забезпечує експресію численних ознак і внутрішньо- та міжвидову комунікацію [4, 5]. Під контролем цієї системи знаходяться гени, що відповідають за синтез факторів патогенності та деяких вторинних метаболітів бактерій [7]. Активація системи *quorum sensing* відбувається після досягнення бактеріальною культурою певної щільності та початку синтезу сигнальних молекул або аутоіндукторів. Кожна з трьох ланок QS *Pseudomonas aeruginosa*, які ієрархічно зв'язані між собою, використовує специфічний аутоіндуктор: N-(3-оксодеканойл)-гомосерин лактон (*las*-система), N-бутирил-гомосерин лактон (*rhl*-система) та 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолон (*pqs*-система) [12]. Аутоіндуктори зв'язуються в клітинах зі специфічними білками, які завдяки цьому набувають транскрипційної активності та зумовлюють експресію генів-мішеней [11].



Раніше нами було встановлено, що вісмуткові комплекси порфіринів є ефективними інгібіторами синтезу аутоіндукторів і QS-залежних вторинних метаболітів, зокрема, піюціаніну у *P. aeruginosa* [3,9,10]. Інгібувальний вплив порфіринів може бути зумовлений їх здатністю до інтеркаляції у ДНК і блокуванням деяких генів системи міжклітинної комунікації, що кодують синтез сигнальних молекул та/або їх рецепторів.

Метою даної роботи було дослідження синтезу піюціаніну за сумісного впливу вісмуткових комплексів і екзогенних аутоіндукторів QS *P. aeruginosa*.

Матеріали і методи

У роботі як тест-мікроорганізм використовували колекційний штам *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (ONU 300). Досліджені порфірини і 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолон (PQS) були синтезовані у ПНДЛ-5 ОНУ імені І.І. Мечникова [1]. У роботі використано комерційні препарати N-(3-оксо-додеканоїл)-гомосерин лактону, N-бутирил-гомосерин лактону виробництва Sigma Aldrich.

Культивування здійснювали у 48-лункових планшетах «Nuclon». У кожен лунку поміщали 1 мл середовища Гіса з глюкозою без індикатора Андреде і вносили добову культуру *P. aeruginosa* до кінцевої концентрації 10^3 клітин в 1 мл. Вісмуткові комплекси порфіринів додавали до кінцевих концентрацій 0,4; 40 та 80 мкМ.

При визначенні впливу аутоіндукторів системи *quorum sensing* у дослідні проби додавали, крім вісмуткових комплексів, N-(3-оксо-додеканоїл)-гомосерин лактон, N-бутирил-гомосерин лактон або 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолон. Кінцеві концентрації гомосеринлактонів становили 10 мкМ, а PQS — 50 мкМ.

Планшети інкубували в термостаті за температури 37 °C впродовж 24 годин. Для визначення вмісту піюціаніну рідку культуру з лунок переносили у пробірки і осаджували клітини центрифугуванням при 1200 g впродовж 15 хв. Піюціанін екстрагували з надосадової рідини (5 мл) хлороформом (3 мл). Хлороформну фазу реекстрагували 1 мл 0,2 М HCl до виникнення червоного забарвлення [8]. Оптичну густину розчину піюціаніну вимірювали на спектрофотометрі “μQuant” (Угорщина) при довжині хвилі 510 нм.

Всі експерименти проводили тричі з 5 повторами в кожному.

Статистичне опрацювання результатів досліджень провадили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного аналізу. Розраховували середні значення показників ($\bar{X}$) та їх стандартну похибку ($S_{\bar{X}}$). Достовірність відмінностей між середніми визначали за критерієм Стьюдента на рівні значимості не менше 95% ($p \leq 0,05$). Математичні розрахунки здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Excel [2].



Результати та їх обговорення

Дослідження сумісного впливу 3-оксо- C_{12} -АГЛ та вісмутових комплексів порфіринів на синтез піоціаніну виявило не зовсім передбачувані результати (рис. 1).

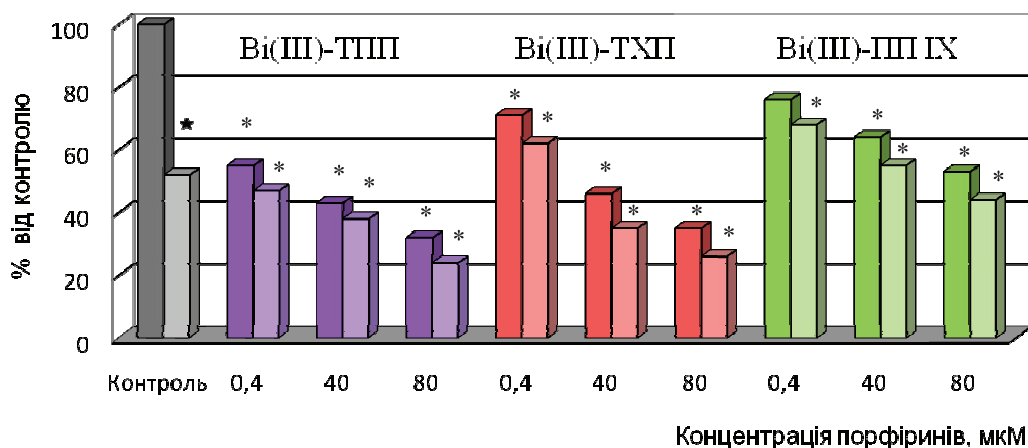


Рис. 1. Вплив вісмутових комплексів порфіринів на синтез піоціаніну *P. aeruginosa* PA01 без та з додаванням N-(3-оксододеканоїл)-гомосерин лактону

■, ■, ■ – порфірин; ■, ■, ■ – порфірин та 10 мкМ 3-оксо- C_{12} -АГЛ
 ■ – контроль; ■ – контроль та 10 мкМ 3-оксо- C_{12} -АГЛ
 * – різниця достовірна порівняно з контролем

Fig. 1. Porphyrins bismuth complexes action on pyocyanin biosynthesis with or without N-(3-oxo-dodecanoil)-homoserin lacton adding

До таких даних, перш за все, слід віднести дворазове зниження синтезу досліджуваного пігменту в культурі без порфіринів. Щодо сумісного впливу даного аутоіндуктора і вісмутових комплексів порфіринів виявилось, що 3-оксо- C_{12} -АГЛ потенціює інгібувальну дію цих сполук на синтез піоціаніну. Причому, незалежно від концентрації порфіринів вміст пігменту був нижчим на 5–10% відносно рівня, що досягався при застосуванні тільки вісмутового комплексу. Тому виявилось, що ефект аутоіндуктора на тлі меншої з використаних концентрацій порфіринів був нижчим у разі Bi(III)-ТХП та Bi(III)-ПП IX і практично однаковим у разі Bi(III)-ТПП, ніж за його окремого застосування.

Дослідження сумісного впливу C_4 -АГЛ та вісмутових комплексів порфіринів на інтенсивність синтезу піоціаніну показало, що аутоіндуктор *rhl*-ланки QS помірно (на 10–20%) збільшує синтез пігменту (рис. 2).

Продукція піоціаніну за присутності тільки C_4 -АГЛ була вищою за контроль на 15,5%.

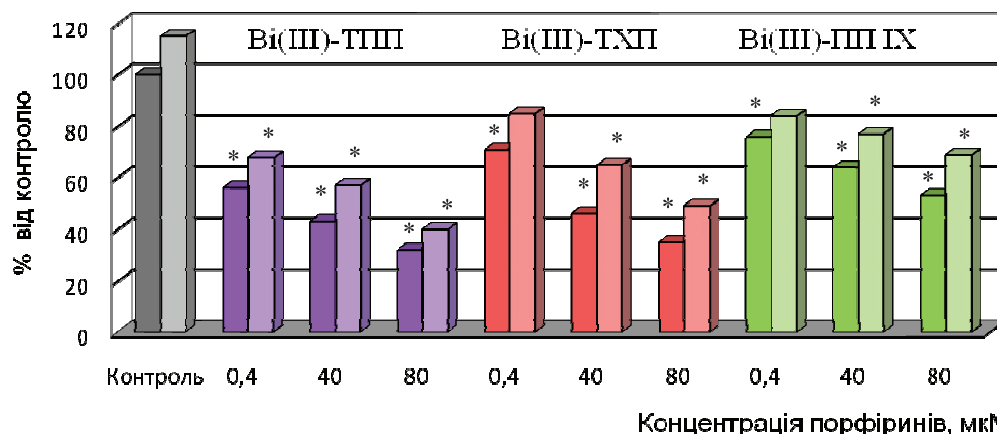


Рис. 2. Вплив вісмутівих комплексів порфіринів на синтез піоціаніну *P. aeruginosa* PA01 без та з додаванням N-бутирил-гомосерин лактону

■, ■, ■ – порфірин; ■, ■, ■ – порфірин та 10 мкМ C₄-АГЛ
 ■ – контроль; ■ – контроль та 10 мкМ C₄-АГЛ
 * – різниця достовірна порівняно з контролем

Fig. 2. Porphyrins bismuth complexes action on pyocyanin biosynthesis with or without N-butiryl-homoserin lacton adding

На відміну від ацильованих гомосерин лактонів, сигнальний хінолон суттєво відновлює синтез піоціаніну (рис. 3).

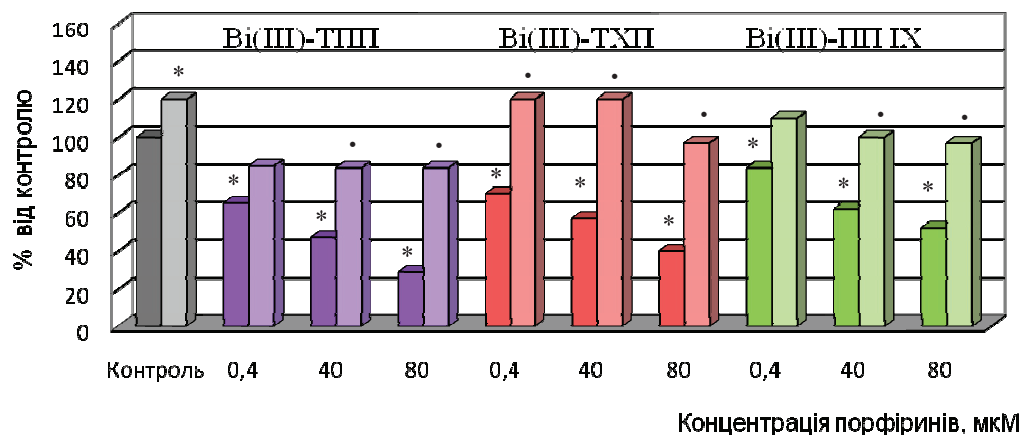


Рис. 3. Вплив вісмутівих комплексів порфіринів на синтез піоціаніну *P. aeruginosa* PA01 без та з додаванням 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону (PQS)

■, ■, ■ – порфірин; ■, ■, ■ – порфірин + 50 мкМ PQS
 ■ – контроль; ■ – контроль + 50 мкМ PQS
 • – різниця достовірна порівняно з контролем
 * – різниця достовірна порівняно з дією тільки порфірину

Fig. 3. Porphyrins bismuth complexes action on pyocyanin biosynthesis with or without 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon (PQS) adding



За відсутності порфіринів у середовищі PQS підвищує вміст пігменту в 1,2 рази. На тлі інгібувальної дії вісмутових комплексів його вплив на синтез піоціаніну є більш значним: рівень пігменту збільшується у 1,5–3 рази. Причому найбільше зростання вмісту піоціаніну спостерігається у разі використання порфіринів в концентрації 80 мкМ.

Аналіз отриманих результатів свідчить, що інгібувальний вплив вісмутових комплексів порфіринів на систему *quorum sensing* обумовлюється не тільки блокуванням синтезу сигнальних молекул. Можна припустити, що вісмутові комплекси пригнічують також синтез відповідних рецепторів досліджуваних аутоіндукторів, зокрема, 3-оксо- C_{12} -АГЛ та C_4 -АГЛ. Зменшення вмісту піоціаніну за присутності екзогенного 3-оксо- C_{12} -АГЛ пов'язано, скоріше за все, зі здатністю даного гомосерин лактону негативно впливати на *rhl*-ланку QS, яка відповідає за синтез пігменту [13]. Відомо, що екзогенний PQS активує експресію *rhl*-системи [6], що призводить до зростання синтезу численних вторинних метаболітів, зокрема, піоціаніну. Однак за умов дефіциту аутоіндуктора цієї ланки QS (C_4 -АГЛ), викликаного вісмутовими комплексами порфіринів, імовірнішим є механізм прямого впливу сигнального хінолону на синтез піоціаніну [8].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ишков Ю.В., Жилина З.И., Водзинский С.В. Порфирины и их производные. XXI // Журн. орг. химии. — 2000. — Т. 36, вып. 4. — С. 609–612.
2. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабиц П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 260 с.
3. Пахомова Є.Ю., Галкін М.Б., Галкін Б.М., Філіпова Т.О. Вплив вісмутових комплексів порфіринів і бактеріофага на формування біоплівки та синтез піоціаніну *Pseudomonas aeruginosa* // Мікробіологія і біотехнологія. — 2012. — № 3(19). — С. 55–64.
4. Bassler B.L. Small talk: cell-cell communication in bacteria // Cell. — 2002. — V. 109. — P. 421–424.
5. Camilli A, Bassler B.L. Bacterial small-molecule signaling pathways // Science. — 2006. — V. 311. — P. 1113–1116.
6. Diggle, S.P., Cornelis P., Williams P., Camara M. 4-Quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives // Int. J. Med. Microbiol. — 2006. — V. 296. — P. 83–91.
7. Diggle S.P., Winzer K., Lazdunski A., Williams P., Camara M. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression // J. Bacteriol. — 2002. — V. 184, № 10. — P. 2576–2586.
8. Jensen V., Löns D., Zaoui C., Bredenbruch F., Meissner A., Dieterich G., Münch R., Häussler S. RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent



and -independent pathways // J. Bacteriol. — 2006. — V. 188, № 24. — P. 8601–8606.

9. Galkin M.B., Ivanytsia V.O. Antibiofilm activity of porphyrines bismuth complexes in presence of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing autoinducers // Sepsis. — 2011. — V. 4, № 1. — P. 106–107.

10. Galkin M.B., Filipova T.O., Ivanytsia V.O. Characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* intercellular signaling pathway (quorum sensing) functioning in presence porphyrins bismuth complexes // Збірник тез 3-го з'їзду Українського товариства клітинної біології, Ялта 16–20 травня 2012 р. — С. 14.

11. Galloway W.R.J.D., Hodgkinson J.T., Bowden S.D., Welch M., Spring D.R. Quorum sensing in gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways // Chem. Rev. — 2011. — V. 111, № 1. — P. 28–67.

12. McGrath S., Wade D.S., Pesci E.C. Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) // FEMS Microbiol. Lett. — 2004. — V. 230. — P. 27–34.

13. Pesci E.C., Iglewski B.H. The chain of command in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing // Trends Microbiol. — 1997. — V. 5. — P. 132–134.

Стаття надійшла до редакції 18.03.2013 р.

Н.Б. Галкин, В.А. Иваница

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (048)765 33 61,
e-mail: aerugen@onu.edu.ua

СИНТЕЗ ПИОЦИАНИНА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ПРИ ВЛИЯНИИ ВИСМУТОВЫХ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ ПОРФИРИНОВ И АУТОИНДУКТОРОВ СИСТЕМЫ *QUORUM SENSING*

Цель работы — исследование синтеза пиоцианина при совместном влиянии висмутовых комплексов порфиринов и экзогенных аутоиндукторов системы *quorum sensing Pseudomonas aeruginosa*.

Клетки *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (ONU 300) инкубировали 24 часа в 48-луночных планшетах «Nuclo» в присутствии висмутовых комплексов мезо-тетра(4-N-метил-пиридил)порфирина, мезо-тетра(6-N-метил-хинолинил) порфирина и протопорфирина IX (Bi (III)-ТПП, Bi (III)-ТХП и Bi (III)-ПП IX). Конечные концентрации соединений составили 0,4,



40 или 80 мкМ. Аутоиндукторы использовали в концентрациях: 3-оксо- C_{12} -АГЛ и C_4 -АГЛ — 10 мкМ, PQS — 50 мкМ. Содержание пиоцианина определяли по методу Essar et al.

Показано, что сами по себе висмутовые комплексы порфиринов снижают синтез пиоцианина *P. aeruginosa* пропорционально их концентрации в среде. Наибольшую ингибирующую активность проявил Bi(III)-ТПП, наименьшую — Bi(III)-ПП IX. В присутствии 0,4 мкМ Bi(III) ТПП количество пиоцианина в суточной культуре уменьшается в 1,8 раза от контроля. При 40 мкМ Bi (III)-ТПП количество пигмента было ниже в 2,3 раза, а при 80 мкМ — в 3,1 раз. 3-оксо- C_{12} -АГЛ вдвое снижает содержание пиоцианина в культуре без порфиринов и потенцирует ингибирующее влияние висмутовых комплексов на синтез пигмента. В присутствии C_4 -АГЛ наблюдается умеренное (на 10–20%) увеличение содержания пиоцианина в контрольной культуре и при совместном влиянии с порфиринами. PQS полностью восстанавливает до контрольного уровня синтез пигмента в присутствии Bi (III)-ТХП и Bi (III)-ПП IX и повышает его в 1,3–3 раза при действии Bi (III)-ТПП. В культуре без порфиринов содержание пиоцианина при влиянии этого аутоиндуктора увеличивалось на 20%.

Экзогенный сигнальный хинолон (PQS) восстанавливает синтез пиоцианина *P. aeruginosa*, который существенно подавлен в присутствии висмутовых комплексов порфиринов. Ацилированные гомосерин лактоны вызывают разнонаправленные эффекты: 3-оксо- C_{12} -АГЛ потенцирует действие порфиринов, а C_4 -АГЛ умеренно увеличивает содержание пиоцианина при действия этих соединений.

Ключевые слова: пиоцианин, висмутовые комплексы порфиринов, аутоиндукторы системы *quorum sensing Pseudomonas aeruginosa*.

M.B. Galkin, V.O. Ivanytsia

Odesa National Mechnykov University
2, Dvorynska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (048) 765 33 61,
e-mail: aerugen@onu.edu.ua

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PYOCYANIN BIOSYNTHESIS IN PRESENCE OF PORPHYRINES BISMUTH COMPLEXES AND QUORUM SENSING AUTOINDUCERS**

Aim. Study of the pyocyanin biosynthesis in presence of the porphyrins bismuth complexes and *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing autoinducers.

Material and methods. *Pseudomonas aeruginosa* PA01(ONU 300) cells were incubated for 24 hours in 48-well plates «Nuclon» in presence of the



meso-tetra(4-N-methyl-piridyl)porphyrine, *meso*-tetra(6-N-methyl-quinolinyl)porphyrine and protoporphyrine IX bismuth complexes (Bi(III)-TPP, Bi(III)-TQP та Bi(III)-PP IX). The final concentrations of the substances were 0,4; 40 або 80 μM . The autoinducers were used in concentrations: 3-oxo- C_{12} -HSL and C_4 -HSL – 10 μM , PQS – 50 μM . Pyocyanin containment was measured by Essar et al. method.

Results. It was shown, that porphyrins bismuth complexes decrease pyocyanin biosynthesis by *P. aeruginosa* in proportion to their concentrations in culture medium. The highest activity was showed by Bi(III)-TPP, the lowest – Bi(III)-PP IX. In presence of 0,4 μM Bi(III)-TPP pyocyanin concentration in the overnight culture decreases in 1,8 times compare with the control. In presence of 40 μM Bi(III)-TPP pigment concentration was lower in 2,3 times, and in presence of 80 μM – in 3,1 times. 3-oxo- C_{12} -HSL in two times decreases pyocyanin concentration in culture without porphyrines and enhance inhibitory action of bismuth complexes onto pigment biosynthesis. In presence of C_4 -HSL there were detected the moderate (in 10–20%) increase of pyocyanin content in control, and in mixture with porphyrines. PQS completely restores pyocyanine biosynthesis to the control value in presence of Bi(III)-TQP and Bi(III)-PP IX and increases their biosynthesis in 1,3-3 times, in presence Bi(III)-TPP. In culture without porphyrines pyocyanin content in presence of this autoinducer increase by 20%.

Conclusions. Exogenic signal quinolon (PQS) restores pyocyanin biosynthesis by *P. aeruginosa*, which is greatly inhibited in presence of the porphyrines bismuth complexes. Acelated homoserin lactones cause multidirectional effects: 3-oxo- C_{12} -HSL enhance porphyrines action, and C_4 -HSL moderately increases pyocyanin content in presence of these compounds.

Key words: pyocyanin, porphyrines bismuth complexes, *quorum sensing* system autoinducers, *Pseudomonas aeruginosa*.

