

М.Ю. Русакова, Б.М. Галкін, С.Г. Соболева, Т.О. Філіпова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 63 57 61,
e-mail: rusamariya@yandex.ru

АНТИМІКРОБНА ДІЯ ФЕНОТІАЗИНОВИХ СПОЛУК

В роботі вивчена дія фенотіазинових сполук на Staphylococcus aureus та Escherichia coli. Показано що ефективність досліджуваних речовин щодо E. coli після попередньої світлової активації перевищує активність метиленового синього. S. aureus виявив стійкість до впливу похідних фенотіазину, як у темнових умовах, так і за фотоінактивації.

Ключові слова: антимікробна активність, фенотіазинові сполуки, фотоінактивація, Staphylococcus aureus, Escherichia coli.

В останні роки багатьма дослідниками відзначається тенденція прискорення розвитку стійкості патогенних мікроорганізмів до антимікробних препаратів [7]. У зв'язку з цим велика увага приділяється пошуку альтернативних методів боротьби зі штамми збудників, які є резистентними до традиційних лікарських засобів [4].

Антимікробна фотохіміотерапія (ФХТ) полягає у селективній деструкції патогенних мікроорганізмів при комбінованому впливі сполуки — фотосенсибілізатора (ФС) та випромінювання відповідного спектрального складу [10]. До об'єктів антимікробної ФХТ відносять віруси, бактерії та інш. [12]. Природа клітинних мішеней переважно визначається локалізацією ФС, яка у свою чергу залежить від його фізико-хімічних властивостей. Перебуваючи в фотозбудженому стані, молекули ФС генерують активні форми кисню, які індукують пошкодження та інактивацію клітин [5]. Селективність методу обумовлена локальним опроміненням інфікованих ділянок і більш високою (у 20–200 разів залежно від видової приналежності) у порівнянні з клітинами еукаріотів чутливістю мікроорганізмів до фотосенсибілізуючого впливу [2].

Здатність ФС зв'язуватися з мікроорганізмами залежить від особливостей структури останніх, і перш за все, клітинної стінки [5, 9]. Негативний заряд зовнішньої поверхні бактерій обумовлює активне зв'язування з ними і, відповідно, виражену антибактеріальну активність саме катіонних сполук, таких як фенотіазини [8]. Серед представників даного класу єдиною сполукою, що використовується у ФХТ, є метиленовий синій [3, 11]. Протимікробна дія барвника переважно базується на витисканні його катіонами протонів з ендогенних сполук мікроорганізмів,



а також утворенні комплексів з СООН-групами амінокислот, які трудно дисоціюють, що вилучає їх з процесів обміну [13, 14].

Метою даної роботи було визначення чутливості мікроорганізмів *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* до дії нових фенотіазинових сполук в темнових умовах, а також за світлової активації речовин.

Матеріали і методи

В роботі вивчено антимікробну активність похідних фенотіазину, що синтезовані в БННЦ Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, із загальною формулою $C_{12}H_8NSR^1R^2$, де Φ_1 ($R^1=H$, $R^2=C_3H_6NO$), Φ_2 ($R^1=CF_3$, $R^2=C_3H_6NO$), Φ_3 ($R^1=CF_3$, $R^2=C_9H_9O_3$) (рис. 1). Як тест-об'єкти використовували штами мікроорганізмів, що були отримані з музею кафедри мікробіології і вірусології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова: *S. aureus* ATCC 2592, *E. coli* ATCC 25922.

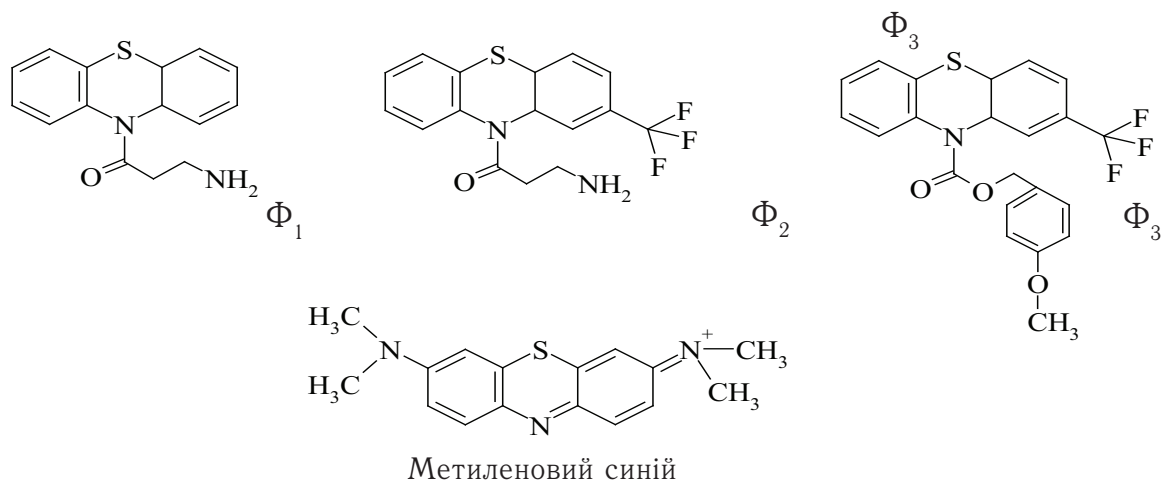


Рис. 1. Структура досліджуваних сполук

Fig. 1. The studied compounds structure

У всіх експериментах використовували добові культури бактерій. Для вивчення впливу досліджуваних сполук готували середовище Гісса з глюкозою без індикатора Андреде [1]. Поживне середовище розливали у пробірки та вносили розчини досліджуваних сполук в диметилсульфоксиді (ДМСО). Концентрація фенотіазинів, а також метиленового синього, в ньому становила 0,005, 0,01, 0,02 і 0,05%.

Вихідна концентрація клітин бактерій в пробірках з досліджуваними сполуками становила $1 \cdot 10^3$ КУО/мл. Культури в присутності фенотіазинів інкубували при температурі 37 °С впродовж 24 годин. Накопичення біомаси штамів визначали за оптичною густиною, яку вимірювали при довжині хвилі 540 нм (OG_{540}).

Для вивчення рівня фотоінактивації клітини мікроорганізмів після 30-хвилинної інкубації зі сполуками опромінювали видимим світлом. Інтенсивність випромінювання становила 20 Вт/см² на рівні зразка, час експозиції — 15 хв [2].

Кожний варіант експерименту проводили у 5 повторах. Всі експерименти повторювали тричі. Статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням критерію Стюдента за допомоги комп'ютерної програми Excel.

Результати та їх обговорення

Аналіз антибактеріальної активності досліджуваних сполук у темних умовах виявив стимулюючий вплив на ріст культур мікроорганізмів (табл.). З підвищенням концентрації фенотіазинів у діапазоні від 0,005% до 0,020% цей ефект щодо *S. aureus* зростає.

Таблиця

Ріст культур в присутності досліджуваних похідних фенотіазину
за темних умов (ОГ₅₄₀)

Table

The culture growth in the studied phenothiazine derivatives
presence under dark conditions (OD₅₄₀)

Варіант		Концентрація, %			
		0,005	0,010	0,020	0,050
<i>S. aureus</i>	Ф1	0,369±0,010	0,369±0,012*	0,365±0,012*	0,320±0,012
	Ф2	0,342±0,008	0,345±0,010*	0,458±0,009*	0,383±0,011*
	Ф3	0,361±0,011	0,349±0,008*	0,439±0,010*	0,370±0,010*
	Метиленовий синій	0,390±0,010*	0,335±0,011*	0,380±0,009*	0,320±0,013
	Контроль**	0,309±0,010			
<i>E. coli</i>	Ф1	0,406±0,010*	0,443±0,020*	0,377±0,014	0,344±0,011
	Ф2	0,430±0,012*	0,419±0,011*	0,463±0,022*	0,354±0,003
	Ф3	0,452±0,014*	0,464±0,009*	0,456±0,013*	0,381±0,008
	Метиленовий синій	0,438±0,010*	0,400±0,015*	0,405±0,010*	0,355±0,017
	Контроль	0,363±0,011			

Примітка: * — $P < 0,05$ у порівнянні з контролем. ** — Контроль — культура мікроорганізмів, яка вирощувалася в присутності ДМСО.



Найбільший рівень оптичної густини суспензії (у 1,5 рази вищий за контроль) спостерігався в присутності 0,020% речовини Φ_2 . Що стосується 0,050%-го вмісту досліджуваних сполук, то всі похідні сприяли зменшенню біомаси *S. aureus* у порівнянні з нижчими концентраціями, але в той же час перевищення контрольного значення залишилося.

Інтенсивний приріст *E. coli* також визначався під впливом 0,005–0,020% фенотіазинових сполук, але на відміну від золотистого стафілококу не мав чіткої залежності від їх концентрації. Так, 0,010% речовин Φ_1 та Φ_3 , а також 0,020% Φ_2 , викликали підвищення оптичної густини приблизно на 25% проти відповідного контролю.

Всі використані концентрації досліджуваних сполук та метиленового синього за темнових умов викликали 10–50% стимуляцію мікроорганізмів, як *S. aureus*, так і *E. coli*. За даними літератури відомо, що в клітинах деяких бактерій має місце модифікація антибіотиків із феназиновими циклами під час розвитку NO-опосередкованої резистентності до них [6]. Це, можливо, призводить не тільки до інактивації антимікробної дії даних сполук, але й до інтенсифікації росту клітин бактерій.

Якщо у темнових умовах фенотіазини стимулювали розвиток бактеріальних штамів, то попередня активація світлом викликала затримку росту культур (рис. 2).

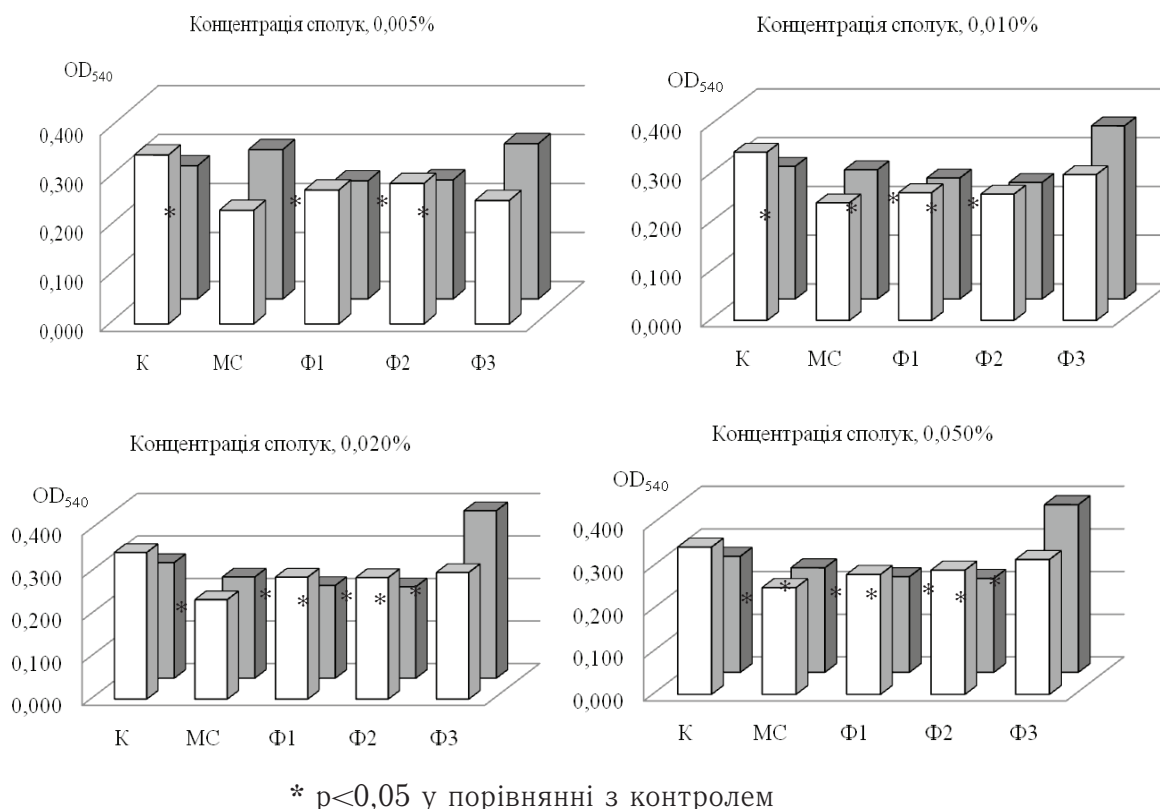


Рис. 2. Ріст бактеріальних культур за фотоіндукованої дії досліджуваних фенотіазинів: □ – *S. aureus*, ■ – *E. coli*, К – контроль, МС – метиленовий синій

Fig. 2. The bacterial culture growth under photoinduced action of the studied phenothiazines: □ – *S. aureus*, ■ – *E. coli*, C – the control, MB – methylene blue

Виняток склало похідне Φ_3 , яке спричинило 1,2–1,7-кратне збільшення оптичної густини суспензії *E. coli* у порівнянні з контролем. Цей ефект зростав під час підвищення концентрації Φ_3 в середовищі. Але на *S. aureus* дана сполука чинила пригнічуючу дію, що призвело до зниження біомаси практично на 30% відносно контролю при внесенні 0,005% Φ_3 . Це, можливо, пов'язано із наявністю в структурі сполуки ароматичного радикалу.

За винятком наведеного випадку *S. aureus* характеризувався вищою стійкістю до фотосенсибілізуючої дії сполук у порівнянні з *E. coli*. Практично всі досліджувані концентрації Φ_1 та Φ_2 знижували приріст культури до 20%. Але на відміну від метиленового синього, дані похідні були менш активними.

Що стосується *E. coli*, то сполуки Φ_1 та Φ_2 пригнічували дану культуру, навіть інтенсивніше ніж метиленовий синій. Максимальне зниження оптичної густини кишкової палички було зафіксовано для 0,005% першого похідного фенотіазину.

Отже, в роботі було встановлено, що активність досліджуваних сполук характеризувалася відсутністю чіткої залежності від концентрації похідних, але змінювалася згідно з будовою їх молекул. Бактерії *S. aureus* виявилися стійкішими до дії похідних фенотіазину, як після попереднього опромінення, так і у темнових умовах, що є характерною особливістю впливу багатьох катіонних ФС на грамозитивні мікроорганізми [4]. За результатами фотоінактивуючої активності щодо *E. coli* Φ_1 та Φ_2 в усіх досліджуваних концентраціях були більш ефективними, ніж метиленовий синій.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования* / Под. ред. М.О. Биргера. — М.: Медицина, 1982. — С. 229–231.
2. *Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R.* Mechanisms in photodynamic therapy. I. Photosensitizers, photochemistry and cellular localization // *Photodiagn. Photodyn. Therapy.* — 2004. — № 1. — P. 279–293.
3. *Clifton J., Leikin J. B.* Methylene blue // *Am. J. Therapy.* — 2003. — 10. — P. 289–291.
4. *Dahl T.A., Midden W.R., Neckers D.C.* Comparison of photodynamic action by Rose Bengal in gram-positive and gram-negative bacteria // *Photochem. Photobiol.* — 1998. — 48. — P. 607–612.
5. *Demidova T.N., Hamblin M.R.* Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation // *Antimicrob. Agents Chemotherapy.* — 2005. — 49. — P. 2329–2335.



6. *Gusarov I., Shatalin K., Starodubtseva M., Nudler E.* Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics // *Science*. — 2009. — 325. — P. 1380–1384.

7. *Hamblin M.R., Hasan T.* Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? // *Photochem. Photobiol. Science*. — 2004. — № 3. — P. 436–450.

8. *Kaatz G.W., Moudgal V.V., Seo S.M., Kristiansen J.E.* Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus* // *Antimicrob. Agents Chemotherapy*. — 2003. — 47. — P. 719–726.

9. *Malik Z., Ladan H., Nitzan Y.* Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions // *J. Photochem. Photobiology*. — 1992. — 14. — P. 262–266.

10. *Rovaldi C.R., Pievsky A., Sole N.A.* Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens *in vitro* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2000. — V. 44, № 12. — P. 3364–3367.

11. *Schirmer R.H., Coulibaly B., Stich A., Scheiwein M.* Methylene blue as an antimalarial agent // *Redox Rep.* — 2003. — 8. — P. 272–275.

12. *Soukos N.S., Ximenez-Fyvie L.A., Hamblin M.R.* Targeted antimicrobial photochemotherapy // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 1998. — 42, № 10. — P. 2595–2601.

13. *Wainwright M., Phoenix D.A., Laycock S.L.* Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* // *FEMS Microbiol. Letters*. — 1998. — 160. — P. 177–181.

14. *Wainwright M.* The use of dyes in modern biomedicine // *Biotech. Histochemistry* // 2003. — 78. — P. 147–155.

М.Ю. Русакова, Б.Н. Галкин, С.Г. Соболева, Т.О. Филипова

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел.: +38 (0482) 63 57 61, e-mail: rusamariya@yandex.ru

АНТИМИКРОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФЕНОТИАЗИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Реферат

В работе было изучено влияние фенотиазиновых соединений на *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Показано, что эффективность исследуемых соединений по отношению к *E. coli* после предварительной активации светом превышает активность метиленового синего. *S. aureus* оказался устойчивым к действию производных фенотиазина как в темновых условиях, так и при фотоинактивации.

Ключевые слова: антимикробная активность, фенотиазиновые соединения, фотоинактивация, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

M.Yu. Rusakova, B.M. Galkin, S.G. Soboleva, T.O. Filipova

Odesa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.:+38 (0482) 63 57 61, e-mail: rusamariya@yandex.ru

THE PHENOTHIAZINE COMPOUND ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Summary

The influence of phenothiazine compounds on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was studied. The efficiency of these compounds after light pre-activation as to *E. coli* exceeded the methylene blue activity level. *S. aureus* was resistant to the action of phenothiazine derivatives both under the dark conditions and in photoinactivation presence.

Key words: antimicrobial activity, phenothiazine compounds, photoinactivation, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

