

УДК 582.282.23.043

М.Б. Галкін, С.В. Водзінський, Г.М. Кириченко, В.О. Іваниця

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

ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 27853 ПРИ ТЕМНОВОМУ ТА ФОТОІНДУКОВАНОМУ ВПЛИВІ ВІСМУТ-МІСТКИХ ПОРФІРИНІВ

*Вісмутові металокомплекси мезо-тетра(4-N-метил)-піридилпорфірину (Vi^{3+} -ТПП) і мезо-тетра(6-N-метил)-хінолінілпорфірину (Vi^{3+} -ТХП) дозо-залежно пригнічують формування біоплівки, накопичення біомаси планктонної культури та синтез альгінату *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. При концентрації 80 мкМ ці показники знижуються на 85–98% при дії Vi^{3+} -ТПП і на 50–82% – Vi^{3+} -ТХП. На відміну від мезо-заміщених порфіринів інгібуючий ефект вісмутового комплексу протопорфірину IX (Vi^{3+} -ПП IX) не залежить від концентрації і не перевершує 50–60%. Утворення біоплівки більш значно пригнічується усіма дослідженими сполуками після їх фотоактивації. Темновий вплив вісмутових комплексів виявився, на відміну від фотоіндукованого, більш суттєвим у відношенні накопичення біомаси у планктонній культурі і вмісту альгінату в біоплівці. Лише при концентраціях 40 і 80 мкМ Vi^{3+} -ТПП і Vi^{3+} -ТХП сильніше (в 1,2–2 рази) гальмували накопичення біомаси у планктонній культурі після фотоактивації.*

*Ключові слова: біоплівка *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, вісмутові металокомплекси порфіринів, темнова та фотоіндукована дія.*

Інфекції, які викликаються умовно-патогенними бактеріями, займають значне місце у патології людини. Їх поширення у медичних стаціонарах є досить суттєвою проблемою для сучасної медицини. Це перш за все пов'язане з високою резистентністю збудників таких інфекцій до традиційних антимікробних та дезінфікуючих засобів та наявністю механізмів, які сприяють униканню їх дії [8, 11]. Одним з таких механізмів є здатність умовно-патогенних бактерій до утворення біоплівки.

Біоплівка являє собою досить складну структуру, а клітини які входять до її складу набувають деяких досить унікальних ознак [12]. Так, *Pseudomonas aeruginosa* яка є одним з поширених збудників внутрішньолікарняних інфекцій, за рахунок здатності до утворення біоплівки

© М.Б. Галкін, С.В. Водзінський, Г.М. Кириченко, В.О. Іваниця, 2010



стає резистентною до антимікробних препаратів [6, 9, 11]. Тому, дуже актуальним є пошук нових антимікробних препаратів, які мають володіти здатністю вражати бактерії у складі біоплівки та володіти декількома різними механізмами дії.

Раніше нами було показано, що синтетичні мезо-заміщені порфірини та їх металокомплекси, не тільки володіють значним спектром антимікробної активності, а також мають два незалежних механізми дії — темновий та фотоіндукований [3, 13].

Метою даної роботи було вивчення темного та фотоіндукованого впливу вісмуткових комплексів синтетичних та природних порфіринів на планктонні культури та біоплівку *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Матеріали і методи

У роботі був використаний штамп *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, отриманий з музею культур мікроорганізмів кафедри мікробіології і вірусології ОНУ імені І.І. Мечникова. Вивчені у роботі вісмуткові металокомплекси мезо-тетра(4-N-метил)-піридилпорфірину (Bi^{3+} -ТПП), мезо-тетра(6-N-метил)-хінолінілпорфірину (Bi^{3+} -ТХП) і протопорфірину IX (Bi^{3+} -ПП IX) були синтезовані у ПНДЛ-5 Одеського національного університету імені І.І. Мечникова за методом [1].

Антимікробну активність вісмуткових комплексів досліджували з використанням модифікованого методу серійних розведень у середовищі Гісса, в діапазоні кінцевих концентрацій від 0,4 до 80 мкМ. При вивченні темного впливу *P. aeruginosa* інкубували в присутності сполук 24 години при 37 °С.

Для оцінки фотоіндукованого впливу у пробірці з середовищем Гісса вносили добову культуру *P. aeruginosa*, додавали досліджувані сполуки до кінцевих концентрацій від 0,4 до 80 мкМ і піддавали опроміненню лампою видимого світла потужністю 500 ват. Термін опромінення складав 15 хв, відстань від лампи 50 см. Після опромінення клітини осаджували центрифугуванням при 1000 об/хв на протязі 15 хвилин, над осадову рідину видаляли, а осад суспендували у стерильному середовищі Гісса. Подальше культивування опромінених культур здійснювали 24 години при 37 °С за відсутності досліджуваних сполук.

Інкубацію усіх культур проводили у 48-лункових планшетах для культури тканин фірми “Nuncclon”. У кожену лунку додавали по 1 мл суспензії клітин *P. aeruginosa*, яка містила 10^3 КУО/мл. Через 24 години з кожної лунки ретельно відбирали планктонні культури і спектрофотометрично оцінювали накопичення в них біомаси при 540 нм. Біоплівки на дні лунок відмивали фізіологічним розчином та фіксували 96% етанолом на протязі 10 хв. Біоплівки фарбували водними розчинами кристалічного фіолетового або алціанового синього на протязі 5 хв. при кімнатній температурі. Планшети із забарвленою біоплівкою підсушували 24 години за кімнатної температури та заливали лізуючим розчином, що містив 0,1 N NaOH і



1% SDS, по 1 мл у кожному лунку. Планшети витримували 1,5–2 години до повного лізису біоплівки за кімнатної температури. Інтенсивність формування біоплівки та синтезу альгінату визначали шляхом вимірювання оптичної густини дослідних та контрольних зразків на спектрофотометрі “Spekol-10” при довжинах хвиль що відповідають максимумам поглинання кожного з барвників (кристалічний фіолетовий – 592 нм; алціановий синій – 608 нм) [5].

Усі експерименти повторювали 3 рази. Кількість паралелей кожного з варіантів дорівнювала 6. Для обробки та аналізу даних використовували методи віріаційної статистики з розрахунком середньої арифметичної та її середньоквадратичного відхилення. Вірогідність різниці показників оцінювали за допомогою *t*-критерію Стьюдента. Математичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням програми MS Excel [2].

Результати дослідження та їх обговорення

Співставлення показників контрольних та опромінених за відсутності досліджуваних сполук культур показало, що суттєвих відмінностей між ними немає (табл.). Однак можна відмітити деяку тенденцію до підвищення цих показників (на 5–10%) після опромінення культур. Враховуючи це, дані щодо впливу вісмуту комплексів виражали у відсотках до показників контролю.

Таблиця
Накопичення біомаси *P. aeruginosa* у планктонній культурі та біоплівці після опромінення видимим світлом

Table
P. aeruginosa biomass accumulation in planktonic culture and biofilm after irradiation with visible light

Варіант	Накопичення біомаси у планктоні, E_{540}	Біомаса біоплівки, E_{592}	Вміст альгінату у матриці біоплівки, E_{608}
Контроль	1,360±0,113	1,564±0,094	0,310±0,025
Опромінення видимим світлом	1,503±0,122	1,656±0,108	0,328±0,027

Отримані результати свідчать про те, що досліджені вісмуту комплексі синтетичних та природних порфіринів володіють різним рівнем антимікробної активності (рис. 1–3). Крім того, спостерігаються відмінності між Vi^{3+} -ТПП і Vi^{3+} -ТХП, з одного боку, та Vi^{3+} -ПП ІХ, з іншого боку, щодо залежності їх дії від концентрацій. Вісмуту комплекс природного порфірину (Vi^{3+} -ПП ІХ) викликає практично однакові зміни при низьких та високих концентраціях (рис. 1–3, В) як у темнових умовах, так і при опроміненні. У той же час, ефекти вісмуту комплексів синтетичних



порфіринів (Bi^{3+} -ТПП і Bi^{3+} -ТХП) чітко залежать від концентрацій цих сполук (рис. 1–3, А, Б). Так, при малих концентраціях вони зменшують біомасу *P. aeruginosa* ATCC 27853 у планктонній культурі лише на 10–40%, тоді як при високих – на 45–80%.

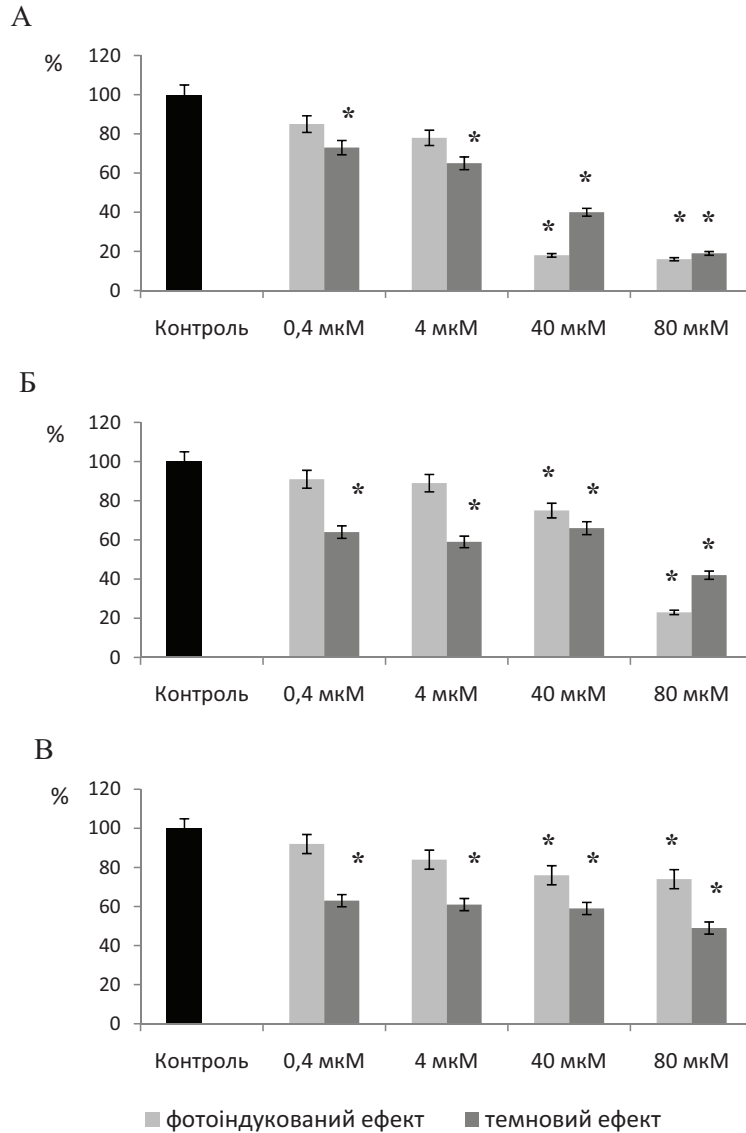


Рис. 1. Вплив вісмутових комплексів порфіринів на біомасу планктонної культури *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 за темнових умов та опромінення (А – Bi^{3+} -ТПП, Б – Bi^{3+} -ТХП, В – Bi^{3+} -ПП IX)

Примітка: * – різниця вірогідна у порівнянні з контролем

Fig. 1. Influence of the porphyrins bismuth complexes on the planktonic culture biomass of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 in dark conditions and after irradiation (А – Bi^{3+} -TPyP, Б – Bi^{3+} -TQP, В – Bi^{3+} -PP IX)

Note: * – significant different from control



Вісмутовий комплекс протопорфірину IX зменшував біомасу при опроміненні на 10–25%, а за темного впливу на 40–50%. До особливостей впливу Bi^{3+} -ТПП і Bi^{3+} -ТХП на біомасу планктонної культури відносяться більш виражені зміни при низьких концентраціях в темнових умовах у порівнянні з опроміненням, тоді як при високих концентраціях сполук переважає фотодинамічна дія. Для Bi^{3+} -ПП IX при усіх концентраціях темнова дія є більш значною.

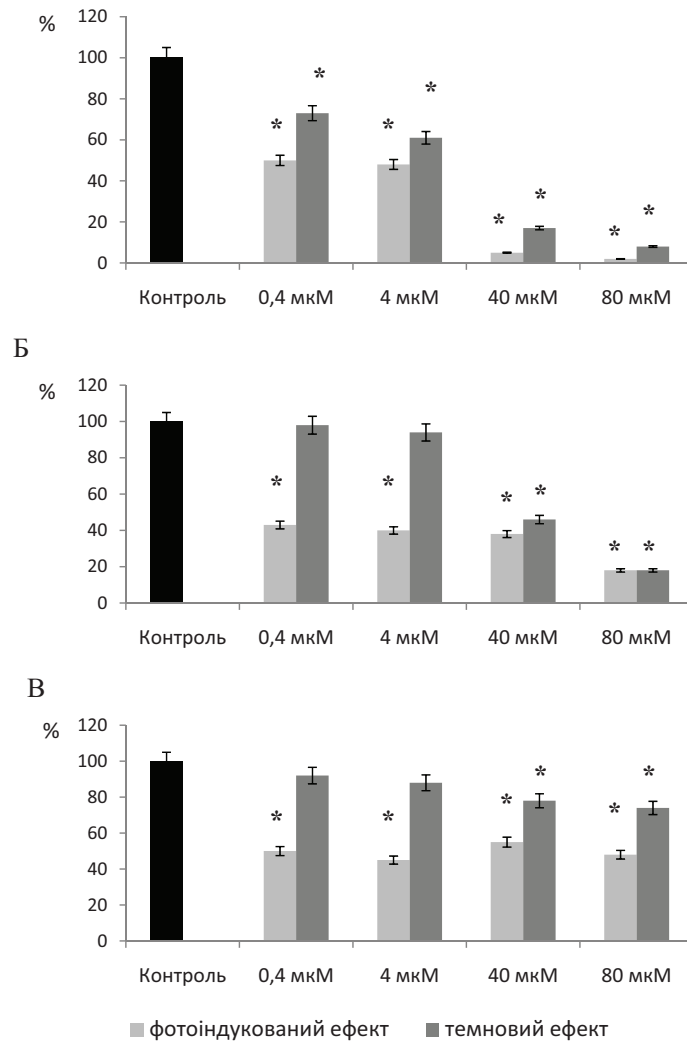


Рис. 2. Вплив вісмутових комплексів порфіринів на формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 за темнових умов та опромінення (А – Bi^{3+} -ТПП, Б – Bi^{3+} -ТХП, В – Bi^{3+} -ПП IX)

Примітка: * – різниця вірогідна у порівнянні з контролем

Fig. 2. Influence of the porphyrins bismuth complexes on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 in dark conditions and after irradiation (А – Bi^{3+} -TPP, Б – Bi^{3+} -TQP, В – Bi^{3+} -PP IX)

Note: * – significant different from control



Процес формування біоплівки порушується більш значно, ніж накопичення біомаси у планктонній культурі, особливо за дії Vi^{3+} -ТПП і Vi^{3+} -ТХП (рис. 2). У концентрації 40 мкМ Vi^{3+} -ТПП пригнічує його на 83–95%, а у концентрації 80 мкМ — на 95–98%. Для Vi^{3+} -ТХП відповідні зміни складають 54–62% та 80–82%. Вісмутувий комплекс природного порфірину незалежно від концентрації гальмує формування біоплівки після фотоактивації удвічі. Слід також зазначити, що фотодинамічне інгібування досліджуваними сполуками біоплівки є більш ефективним ніж темнове. Враховуючи, що наслідком фотосенсибілізації порфіринів є утворення з молекул O_2 високоактивних, але короткоживучих, форм кисню [15], можна припустити, що вони викликають суттєві метаболічні зміни в клітинах *P. aeruginosa*, які перешкоджають утворенню біоплівки.

Враховуючи, що матрикс біоплівки приблизно на 90% складається з альгінату, було вивчено вплив вісмутувих комплексів порфіринів на його вміст. Встановлено, що характер впливу усіх сполук на цей компонент аналогічний їх впливу на біомасу планктонної культури: більш значне зменшення вмісту альгінату при темнових умовах та залежність ефектів синтетичних порфіринів від концентрацій (рис. 3). Слід також відмітити суттєвий темновий вплив на цей показник Vi^{3+} -ПП ІХ, який знижує вміст альгінату на 45–50% при малих і на 55–60% при високих концентраціях.

Порівняння впливу досліджуваних сполук на формування біоплівки та її матриксу свідчить про те, що фотоіндукована дія усіх вісмутувих комплексів і темнові ефекти високих концентрацій Vi^{3+} -ТПП і Vi^{3+} -ТХП переважно пригнічують клітинні компоненти біоплівки. Відомо, що формування біоплівки мікроорганізмами знаходиться під контролем системи quorum sensing, яка забезпечує необхідну для цього комунікацію клітин [9, 16]. Порушення комунікації, в свою чергу, може сприяти більш інтенсивному відкріпленню клітин від біоплівки і переходу до планктонної культури. Наслідком цього є менш виражене зменшення біомаси планктонної культури у порівнянні з біоплівкою (рис. 1 і 3). Крім того, існує припущення [14], що незалізни металокомплекси порфіринів використовують для потрапляння усередину клітин системи транспорту гемму та/або гемоглобіну, які є джерелами заліза, недостатність котрого пригнічує життєдіяльність бактерій.

Одержані результати свідчать про більш високу активність вісмутувового комплексу мезо-тетра(4-N-метил)-піридилпорфірину, особливо при високих концентраціях, ніж відповідного комплексу мезо-тетра(6-N-метил)-хінолінілпорфірину. Така залежність спостерігається як за темної дії цих сполук, так і в умовах їх фотоактивації.

Менша активність Vi^{3+} -ПП ІХ в порівнянні з вісмутувими комплексами синтетичних порфіринів, а також її незалежність від концентрацій може бути обумовлена можливістю утворення з протопорфірину ІХ за участю бактеріальної гемоксигенази білівердину, який є потужним анти-



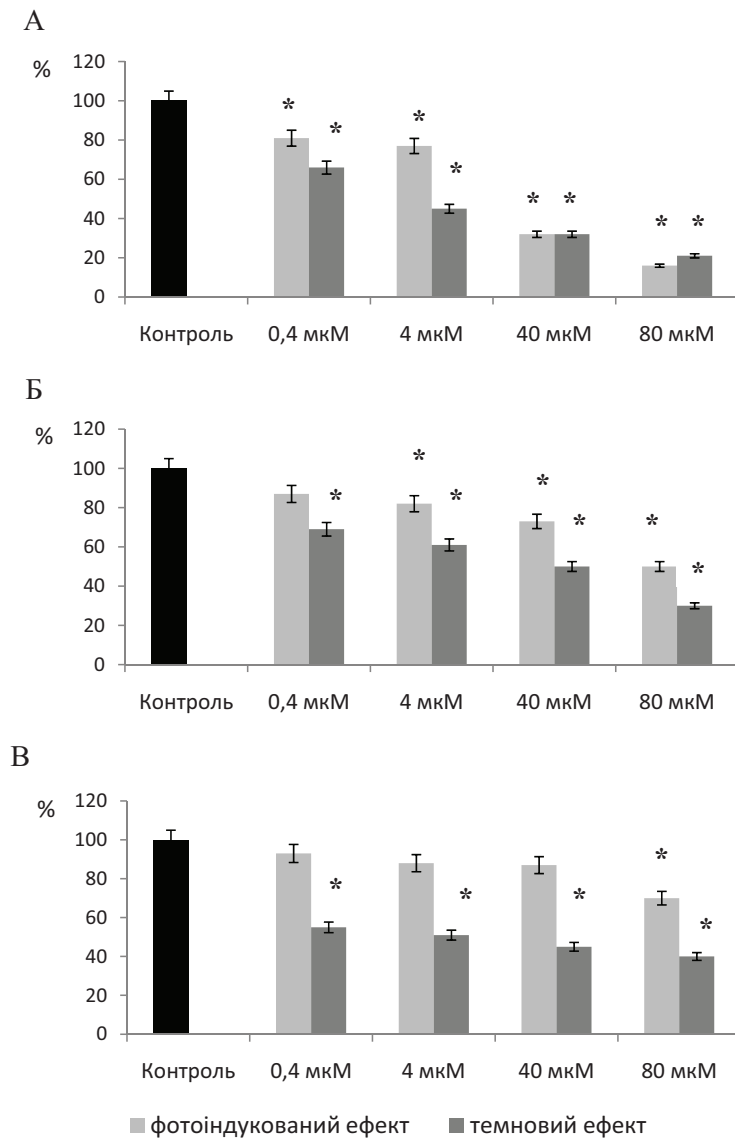


Рис. 3. Вплив вісмутових комплексів порфіринів на синтез кислих мукополісахаридів *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 за темнових умов та опромінення (А – Bi^{3+} -ТПП, Б – Bi^{3+} -ТХП, В – Bi^{3+} -ПП IX)

Примітка: * - різниця вірогідна у порівнянні з контролем

Fig. 3. Influence of the porphyrins bismuth complexes on alginate production *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 in dark conditions and after irradiation (A – Bi^{3+} -TPyP, B – Bi^{3+} -TQP, B – Bi^{3+} -PP IX)

Note: * - significant different from control

оксидантом [10], а також компонентом бактеріофітохромів (BphPs), які функціонують як сенсорні кінази двокомпонентної сигнальної системи, що забезпечує експресію численних генів, зокрема системи quorum sensing [4, 7]. Металокомплекси синтетичних мезо-заміщених порфіринів не

тільки не є субстратами цього ферменту, але здатні суттєво інгібувати його активність [14].

Враховуючи отримані результати і дані інших авторів, можна припустити, що вісмутові комплекси порфіринів здатні блокувати ріст і утворення біоплівки *P. aeruginosa* за участю різних механізмів, поглиблене вивчення яких буде здійснюватися у подальших дослідженнях.

ЛІТЕРАТУРА

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. Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Зінченко О.Ю., Русакова М.Ю., Жилина З.И., Водзінський С.В., Ишков Ю.В. Взаємодія мікроорганізмів з природними і синтетичними порфіринами // Вісник ОНУ. Біологія. — 2001. — Т. 6, вип. 2. — С. 317—322.
4. Bhoo S.H., Davis S.J., Walker J., Karniol B., Vierstra R.D. Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore // Nature. — 2001. — V. 414. — P. 776—779.
5. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices // Journal of Clinical Microbiology. — 1985. — V. 22. — № 6. — P. 996—1006.
6. Gillis R.J., White K.G., Kyoung-Hee Choi. Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Antimicrobial agents and chemotherapy. — 2005. — V. 49. — № 4. — P. 3858—3867.
7. Gooderham W.J., Hancock R.E. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa* // FEMS Microbiol. Rev. — 2009. — V. 33. — P. 279—294.
8. Hilf M., Yu V.L., Zuravleff J.J. Antibiotic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: outcome correlation in a prospective study of 200 patients // Am. J. Med. — 1989. — V. 87 — P. 540—546.
9. Hoštacká A., Čížnár I., Slobodniková L., Kotulová D. Clinical *Pseudomonas aeruginosa*: potential factors of pathogenicity and resistance to antimicrobials // Folia Microbiologi. — 2006. — V. 6. — P. 633—638.
10. Kikuchi G., Yoshida T., Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation // Biochem. Biophys. Res. Com. — 2005. — V. 338. — P. 558—567.
11. Kok-Fai Kong, Suriya Ravi Jayawardena, Shalaka Dayaram Indulkar. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB lactamases, proteases,



quorum sensing, and other virulence factors // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2005. — V. 49, № 11. — P. 4567–4575.

12. *O'Toole George A.* To Build a biofilm // *Journal of Bacteriology*. — 2003. — V. 185, № 9. — P. 2687–2689.

13. *Philippova T.O., Galkin B.N., Zinchenko O.Yu.* The antimicrobial properties of new synthetic porphyrins // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* // 2003. — V. 12, № 11–12. — P. 141–148.

14. *Stojiljkovic I., Kumar V., Srinivasan N.* Non-iron metalloporphyrins: Potent antibacterial compounds that exploit haem/Hb uptake systems of pathogenic bacteria // *Mol. Microbiol.* — 1999. — V. 31, № 2. — P. 429–442.

15. *Wilson M., Burns T., Pratten J.* Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agent // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. — 1996. — V. 37. — P. 377–381.

16. *Wilson M.* Lethal photosensitisation of biofilm-grown bacteria // *J. Proc. SPIE*. — 1997. — V. 3191. — P. 68–78.

Н.Б. Галкин, С.В. Водзинский, А.М. Кириченко, В.А. Иваница

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

**ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЁНКИ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA ATCC 27853 ПРИ ТЕМНОВОМ
И ФОТОИНДУЦИРОВАННОМ ВЛИЯНИИ
ВИСМУТ-СОДЕРЖАЩИХ ПОРФИРИНОВ**

Реферат

Висмутовые металлокомплексы мезо-тетра(4-N-метил)-пиридил-порфирина (Vi^{3+} -ТПП) и мезо-тетра(6-N-метил)-хинолинилпорфирина (Vi^{3+} -ТХП) дозо-зависимо подавляют образование биоплёнки, накопление биомассы в планктонной культуре и синтез альгината *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. При концентрации 80 мкМ эти показатели снижаются на 85–98% при действии Vi^{3+} -ТПП и на 50–82% — Vi^{3+} -ТХП. В отличие от мезо-замещенных порфиринов ингибирующий эффект висмутового комплекса протопорфирина IX (Vi^{3+} -ПП IX) не зависит от концентрации и не превышает 50–60%. Образование биоплёнки более выражено подавляется всеми изученными соединениями после их фотоактивации. Темновое воздействие висмутовых комплексов оказалось, в



отличие от фотоиндуцированного, более существенным в отношении накопления биомассы в планктонной культуре и содержания альгината в биопленке. Лишь при концентрациях 40 и 80 мкМ Bi^{3+} -ТПП и Bi^{3+} -ТХП сильнее (в 1,2–2 раза) подавляли накопление биомассы в планктонной культуре после фотоактивации.

Ключевые слова: биоплёнка *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, висмутовые металлокомплексы порфиринов, темновое и фотоиндуцированное действие.

M.B. Galkin, S.V. Vodsinsky, F.M. Kirichenko, V.O. Ivanytsia

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38(048) 765 33 61, e-mail: volandaron@ukr.net

THE PECULIARITY OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 27853 BIOFILM FORMATION AT THE DARK OR PHOTOINDUCED ACTION OF BISMUTH-CONTAINING PORPHYRINS

Summary

Bismuth complexes of the *meso*-tetra(4-N-methyl)-pyridylporphyrin, *meso*-tetra(6-N-methyl)-quinolinyldiporphyrin inhibit biofilm formation, alginate synthesis and planktonic culture growth by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 in dependence of the dose. In concentration of the 80 μM these markers decreased for 85–98% in presence of the Bi^{3+} -TPP, and for 50–82% – Bi^{3+} -THP. In contrast with *meso*-substituted porphyrins, protoporphyrin IX bismuth-complex action was not dependent from a concentration and was not higher then 50–60%. Biofilm formation process was repressed higher in presence of the photoactivated compounds. Instead this, dark action were prevailed to photoinduced on the planktonic culture biomass and alginate synthesis. Only in presents of the concentrations 40 and 80 μM Bi^{3+} -TPP, and Bi^{3+} -THP higher (in 1.2–2 times) inhibit planktonic culture biomass after photoactivation.

Key words: biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, bismuth metallocomplexes of porphyrins, dark and photoinduced action.

