

**М.Б. Галкін, З.І. Жиліна, Ю.В. Ішков, М.О. Петрова,
В.О. Іваниця**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (0482) 765 33 61,
e-mail: volandaron@ukr.net

ВПЛИВ КОМПЛЕКСУ МЕЗО-ТЕТРА(4-N-МЕТИЛ-ПІРИДИЛ) ПОРФІРИНУ З ВІСМУТОМ НА РІСТ ТА ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 27853

Комплекс мезо-тетра(4-N-метил-піридил)порфірину з вісмутом суттєво інгібує ріст Pseudomonas aeruginosa у суспензійній культурі. Підвищення інгібуючого ефекту спостерігається в двох інтервалах концентрацій: від 0,04 до 4,0 та від 40 до 80 мкмолей. Максимальна з досліджених концентрацій (80 мкмолей) зменшувала приріст біомаси P. aeruginosa на 80 %. Металокомплекс у концентраціях 0,04 та 40 мкмолей запобігає формуванню біоплівки у 1,8 і 2,7 рази, відповідно. При цьому знижується здатність клітин P. aeruginosa синтезувати кислі мукополіцукриди та об'єднуватися у конгломерати.

К л ю ч о в і с л о в а: мезо-тетра(4-N-метил-піридил)порфірин, металокомплекс з вісмутом, антимікробна активність, біоплівка, Pseudomonas aeruginosa.

Процес формування біоплівки численими умовно-патогенними мікроорганізмами має величезне значення у медичній практиці. Здатність до її утворення є одним з вирішальних факторів у передачі внутрішньолікарняних інфекцій, що викликаються, зокрема, псевдомонадами, стафілококами, кандидами тощо. Дані літератури свідчать про утворення біоплівок умовно-патогенними мікроорганізмами на катетерах довгострокового використання, які слугують джерелами інфікування людей [3, 7]. Формування біоплівок має місце не тільки на катетерах та іншому медичному обладнанні, але і на зубах та зубних протезах; системах кондиціонування повітря; та, у певних випадках, в організмі людини, наприклад, у дихальних шляхах хворих на муковісцидоз. Сформовані біоплівки є джерелами хронічних інфекцій, які погано піддаються лікуванню [8].

Найчастіше спалахи внутрішньолікарняних інфекцій обумовлені *Pseudomonas aeruginosa*, яка у складі біоплівок практично нечутлива до антибіотиків [3, 6]. Тому пошук принципово нових груп антимікробних засобів, ефективних по відношенню до мікроорганізмів, що знаходяться у складі біоплівок, є сучасною, актуальною проблемою.



Раніше нами було показано, що синтетичні мезо-заміщені порфірини та їх металокомплекси володіють значною антимікробною активністю, яка не залежить від чутливості бактерій до антибіотиків [5,10].

Метою роботи було вивчення впливу вісмутного комплексу мезо-тетра(4-N-метил-піридил)порфірина (Ві-ТПП) на формування біоплівки та синтез кислих екзополісахаридів *P. aeruginosa*.

Матеріали і методи

У роботі був використаний штам *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, отриманий з музею культур мікроорганізмів кафедри мікробіології і вірусології ОНУ імені І. І. Мечникова. Мезо-тетра(4-N-метил-піридил)-порфірин (ТПП) та його комплекс з вісмутом синтезовані у ПНДЛ-5 ОНУ імені І. І. Мечникова [1].

Антимікробну активність Ві-ТПП щодо *P. aeruginosa* досліджували з використанням методу серійних розведень у середовищі Гісса, в діапазоні концентрацій від 0,04 до 80 мкмоль. Антимікробний ефект оцінювали за оптичною густиною 24-годинної культури на спектрофотометрі "Spekol-10".

Для оцінки формування біоплівки у стерильні бюкси з покривними скельцями (18x18 мм) додавали 2 мл середовища Гісса та клітини тест-штаму до концентрації 10^3 КУО/мл. У дослідні проби додавали синтезовані сполуки до кінцевих концентрацій 0,04 і 40 мкмоль та інкубували при 37 °С у термостаті впродовж 24 годин. По закінченні інкубації скельця відмивали від неприкріплених клітин фізіологічним розчином, фіксували 96 % етанолом та фарбували впродовж 10 хв кристалічним фіолетовим. Після відмивання барвника і висушування на повітрі оцінювали стан біоплівок візуально та під мікроскопом [11].

Для вивчення кількісного впливу досліджуваних сполук на формування біоплівки та синтез кислих полісахаридів *P. aeruginosa* використовували 96-лункові пластикові планшети. У лунки вносили 0,1 мл суспензії бактерій (10^3 КУО/мл). У дослідні проби додавали сполуки до кінцевих концентрацій 0,04 і 40 мкмоль та інкубували при 37 °С у термостаті. Через 24 год надосадову рідину видаляли і тричі промивали біоплівку, додаючи у кожен лунку по 0,2 мл фізіологічного розчину. Стан біоплівок на дні лунк оцінювали після фарбування кристалічним фіолетовим, або алціановим блакитним. Облік результатів здійснювали на фотометрі для імуноферментного аналізу при $\lambda=570$ нм та $\lambda=605$ нм, відповідно [11].

Усі експерименти повторювали 4 рази. Кількість паралелей кожного з варіантів дорівнювала 5. Для обробки та аналізу даних використовували методи варіаційної статистики з розрахунком середньої арифметичної та її середньоквадратичного відхилення. Вірогідність різниці показників оцінювали за допомогою *t*-критерію Ст'юдента. Математичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням програми MS Excel [2].

Результати та їх обговорення

Вивчення впливу Ві-ТПП на ріст *P. aeruginosa* показало, що досліджена нами сполука має високу антимікробну активність щодо даного мікроорганізму (рис. 1). Характер інгібуючого впливу виявився подібним до впливу цієї ж сполуки на ріст *Salmonella enteritidis* як було показано нами раніше [5]. Підвищення інгібуючого впливу спостерігалось у діапазоні концентрацій від 0,04 до 4 та від 40 до 80 мкмоль. У діапазоні концентрацій 4-40 мкмоль спостерігалось плато, відсутність залежності зростання інгібуючої активності від концентрації Ві-ТПП. При цьому інтенсивність росту тест-штаму становила 40 % від контролю. Найбільша з вивчених концентрацій (80 мкмоль) пригнічувала ріст тест-штаму майже на 80 %.



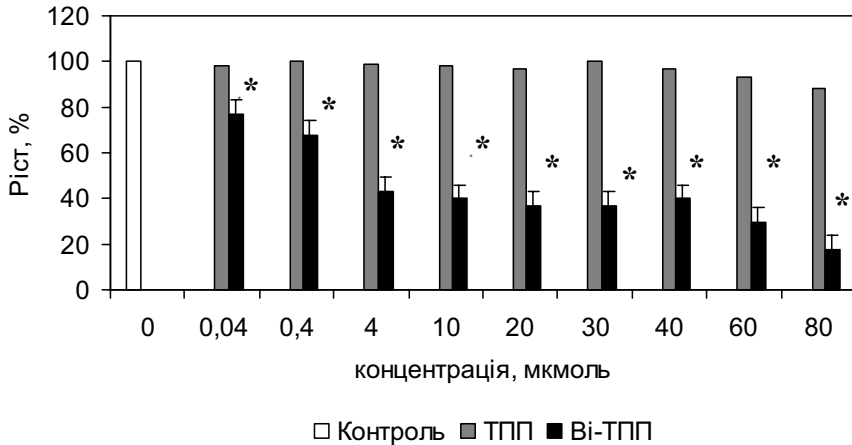


Рис. 1. Ріст *P. aeruginosa* ATCC 27853 за присутності мезо-тетра(4-N-метил-піридил)порфірину та його комплексу з вісмутом
* – різниця вирогідна у порівнянні з контролем ($p < 0,05$)

Fig. 1. *P. aeruginosa* ATCC 27853 growth in presence of meso-tetra(4-N-methyl-pyridyl)porphyrin and its bismuth complex
* – $p < 0,05$ by Student's test

На нашу думку подібна картина інгібування росту *P. aeruginosa* може свідчити про те, що у зонах малих та великих концентрацій механізм антимікробної дії досліджуваної сполуки може суттєво відрізнятися. Не виключно також, що за різних концентрацій транспорт Ві-ТПП усередину клітин бактерій може здійснюватися за різними механізмами. Вільна основа та нітрат вісмуту суттєвого впливу на *P. aeruginosa* не спричиняли. Лише найбільша концентрація ТПП пригнічувала ріст мікроорганізму на 12 %.

Вивчення ефекту досліджуваної сполуки на формування біоплівки у планшети показало, що у присутності вісмутового комплексу цей процес суттєво пригнічується (рис. 2). За присутності комплексу у концентрації 0,04 мкмоль, число клітин тест-штаму прикріплених до дна лунки зменшувалось у 1,8 рази, а за концентрації 40 мкмоль – майже у 2,7 рази. Ефект вільної основи синтетичного порфірину виявився меншим за ефект металокомплексу і склав 25 та 57 %, відповідно. Нітрат вісмуту на процес формування біоплівки суттєвого впливу не спричиняв. Цікавим є той факт, що вісмутовий комплекс мезо-тетра(4-N-метил-піридил)порфірину має значно більшу здатність до пригнічення формування біоплівки, ніж до інгібування росту *P. aeruginosa* у суспензійній культурі. Так, ефект найнижчої з використаних концентрацій склав у першому випадку майже 80 % (рис. 2), тоді як у другому (рис. 1) лише 23 %.

Це дає змогу припустити, що пригнічення формування біоплівки Ві-ТПП пов'язано не тільки з впливом його на ріст *P. aeruginosa*. Можливо ця сполука може гальмувати або модифікувати деякі метаболічні процеси в клітинах бактерії, зокрема впливати на синтез екзополісахаридів, які разом з фімбріями та іншими факторами сприяють адгезії *P. aeruginosa* до різних поверхонь. Така здатність була показана для комплексів вісмуту з ліпофільними тіолами, які інгібували синтез екзополісахаридів у *P. aeruginosa* та деяких інших бактерій [9,12].

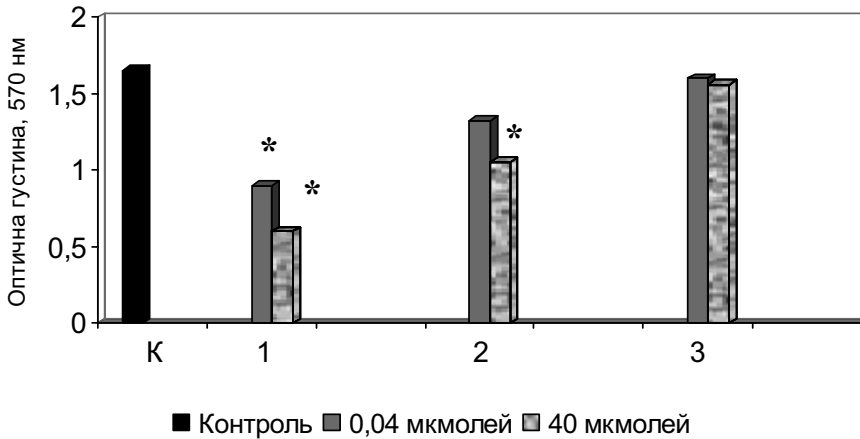


Рис. 2. Вплив досліджених сполук на інтенсивність формування біоплівки *P. aeruginosa*
 К - контроль, 1 – Bi-ТПП, 2 – ТПП, 3 – Bi(NO₃)₃
 * – різниця вирогідна у порівнянні з контролем (p < 0,05)

Fig. 2. Influence of studied compounds on the *P. aeruginosa* biofilm formation process
 K - kontrol, 1 – Bi-TPP ; 2 – TPP; 3 – Bi(NO₃)₃
 * – p < 0,05 by Student's t test

Результати дослідження якісного впливу металокомплексу на формування біоплівки показані на рис. 3 і 4. Загальний вигляд біоплівки на скельцях (рис. 3), пофарбованих кристалічним фіолетовим, свідчить про пригнічення цього процесу. Вплив Bi-ТПП виявився залежним від його концентрації.

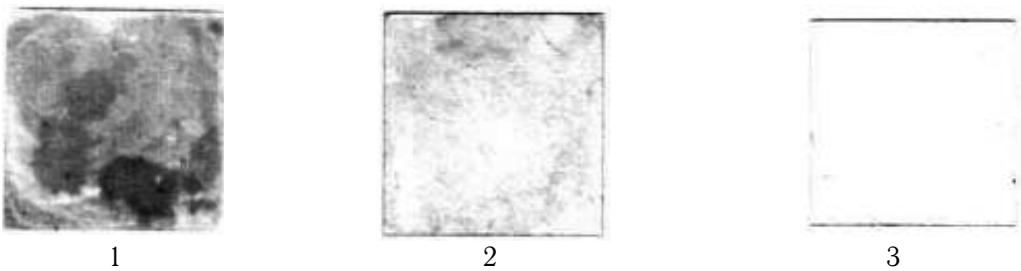


Рис. 3. Загальний вигляд біоплівки, пофарбованої кристалічним фіолетовим
 1 – контроль; 2 – 0,04 мкмоль Bi-ТПП; 3 – 40 мкмоль Bi-ТПП

Fig. 3. General view of the *P. aeruginosa* biofilm stained by crystal violet
 1 – control; 2 – 0,04 μM Bi-TPP; 3 – 40 μM Bi-TPP

На мікрофотографіях скелець, представлених на рис. 4, видно, що металокомплекс значно знижує здатність *P. aeruginosa* до формування конгломератів клітин, які лежать в основі біоплівки. При концентрації 0,04 мкмоль у препаратах присутня значна кількість поодиноких клітин, тоді як у контролі практично усі клітини зібрані

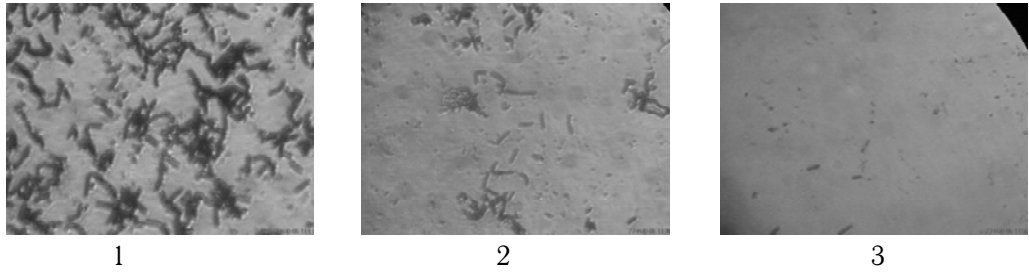


Рис. 4. Вигляд біоплівки, сформованої в присутності різних концентрацій Ві-ТПП, під мікроскопом (x900)
1 – контроль; 2 – 0,04 мкмоль; 3 – 40 мкмоль

Fig. 4. Microscopic view of the *P. aeruginosa* biofilm formed in presence of different concentrations of Bi-TPP (x900)
1 – control; 2 – 0,04 μM; 3 – 40 μM

у великі конгломерати. За концентрації 40 мкмоль Ві-ТПП, на скельцях присутні лише поодинокі клітини розкидані по усьому полю зору і сформована біоплівка практично відсутня.

Фарбування біоплівки алциановим блакитним (рис. 5) виявило також залежне від концентрації Ві-ТПП пригнічення синтезу кислих мукополісахаридів, які є важливими компонентами слизу *P. aeruginosa* і сприяють адгезії цього мікроорганізму. Незначне гальмування синтезу екзополісахаридів відмічено у присутності ТПП, а нітрат вісмуту зовсім не впливав на цей процес.

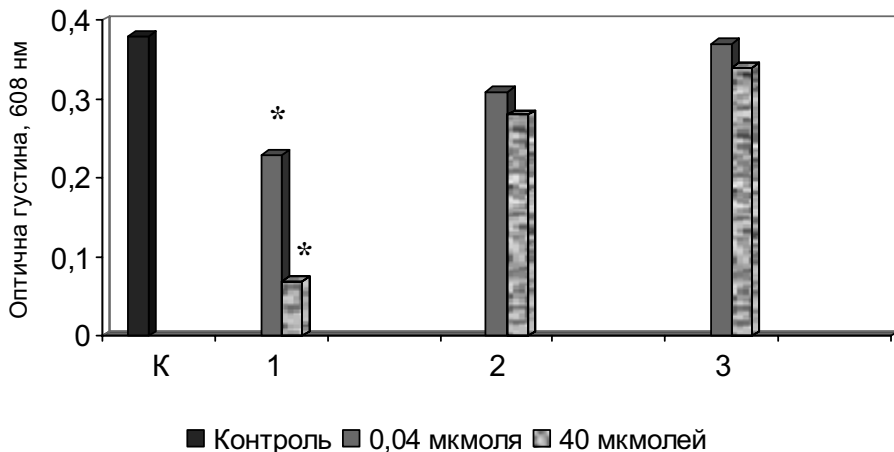


Рис. 5. Вплив досліджених сполук на інтенсивність синтезу кислих полісахаридів в біоплівці *P. aeruginosa*
К - контроль, 1 – Ві-ТПП, 2 – ТПП, 3 – $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$
* – різниця вирогідна у порівнянні з контролем ($p < 0,05$)

Fig. 5. Influence of studied compounds on the acid polysaccharides synthesis intensity
К - kontrol, 1 – Bi-TPP; 2 – TPP, 3 – $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$
* – $p < 0,05$ by Student's test

Таким чином, отримані експериментальні дані дають можливість вважати, що комплекс мезо-тетра(4-N-метил-піридил)порфірину з вісмутом не тільки пригнічує ріст *P. aeruginosa*, але і запобігає утворенню нею біоплівки. За попередніми результатами останнє обумовлюється інгібуючим впливом дослідженої сполуки на синтез кислих полісахаридів та формування клітинних конгломератів. Подальші дослідження будуть спрямовані на більш глибоке вивчення механізмів дії вісмутового комплексу на процес утворення біоплівки.

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., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морнон, 2001. — 260 с.
3. Рафальский В.В. Особенности выбора антимикробной терапии при осложненных инфекциях мочевыводящих путей // Consilium medicum. — 2004. — т. 6, вып. 7. — С. 75-79.
4. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М. О. Биргера. — М.: Медицина, 1972. — С. 175 — 177.
5. Філіпова Т.О., Жиліна З.І., Іваниця В.О., Галкін М.Б., Малярчик І.О. Ішков Ю.В., Зінченко О.Ю. Антибактеріальна активність металокомплексу мезо-тетра(4-N-метил-піридил)порфірину з вісмутом // Вісник ОНУ. Біологія. — 2005. — т. 10, вип. 7. — С. 167- 171.
6. Anwar H., Strap J.L., Costerton J.W. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy // Antimicrob. Agents Chemother. — 1992. — V. 36. — P. 1347-1351.
7. Ching-Tsan Huang, Stewart P.S. Reduction of polysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by bismuth dimercaprol (BisBAL) treatment // Journal of antimicrobial chemotherapy. — 1999. — V. 44. — P. 601-602.
8. Costerton J.W. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection // Trends Microbiol. — 2001. — V. 9. — P. 50-52.
9. Domenico P., Tomas J.M., Merino S., Rubires X., Burke A.C. Surface Antigen Exposure by Bismuth Dimercaprol Suppression of *Klebsiella pneumoniae* Capsular Polysaccharide // Infect. Immun. — 1999. — V. 67. — P. 664-669.
10. Philippova T.O., Galkin B.N., Zinchenko O.Yu., Rusakova M.Yu., Ivanytsya V.O., Zhilina Z.I. The antimicrobial properties of new synthetic porphyrins // Journal of Porphyrins and Phthalocyanines. — 2003. — V. 12, № 11-12. — P. 141-148.
11. Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B., Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation // J. Microbiol. Methods. — 2000. — V. 40. — P. 175-179.
12. Wu C. L., Domenico P., Hassett D. J., Merino S., Tomas J.M. Subinhibitory Bismuth-Thiols Reduce Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. — 2002. — V. 26. — P. 731-738.



Н.Б. Галкин, З.И. Жилина, Ю.В. Ишков, М.А. Петрова, В.А. Иваница

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (0482) 765 33 61,
e-mail: volandaron@ukr.net

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА МЕЗО-ТЕТРА(4-N-МЕТИЛ-ПИРИДИЛ) ПОРФИРИНА С ВИСМУТОМ НА РОСТ И ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 27853

Реферат

Комплекс мезо-тетра(4-N-метилпиридил) порфирина с висмутом обладает выраженной способностью ингибировать рост *Pseudomonas aeruginosa* в суспензионной культуре. Повышение ингибирующего эффекта наблюдалось в интервалах концентраций от 0,04 до 4 и от 40 до 80 мкмоль. Максимальная из использованных концентраций (80 мкмоль) ингибировала рост *P. aeruginosa* на 80 %. Металлокомплекс в концентрациях 0,04 и 40 мкмоль ингибировал образование биоплёнки в 1,8 и 2,7 раз, соответственно. При этом снижается способность клеток *P. aeruginosa* синтезировать кислые мукополисахариды и образовывать конгломераты.

К л ю ч е в ы е с л о в а: мезо-тетра(4-N-метил-пиридил) порфирин, металлокомплекс с висмутом, антимикробная активность, биопленка, *Pseudomonas aeruginosa*.

M.B. Galkin, Z.I. Zhilina, Yu.V. Ishkov, M.O. Petrova, V.O. Ivanytsya

Odesa National Mechnykov University,
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, тел.: 8 (0482) 765 33 61,
e-mail: volandaron@ukr.net

INFLUENCE OF MESO-TETRA (4-N-METHYLPIRYDIL) PORPHYRIN COMPLEX WITH BISMUTH ON PSEUDOMONAS AERUGINOSA ATCC 27853 BIOFILM GROWTH AND FORMATION

Summary

The complex of meso-tetra (4-N-methylpyridil) porphyrin with bismuth can truly inhibit the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. Increasing of inhibitory effect was observed at two intervals of concentration from 0.04 to 4 and from 40 to 80 μM . At interval of concentration of 4 - 40 μM the inhibitory effect was constant and arranged 60 %. The highest of used concentrations – 80 μM inhibited *P. aeruginosa* growth to 80 %. The complex can effectively prevent the biofilm formation used the strain of *P. aeruginosa*. Under discovered property concentrations – 0.04 and 40 μM , the biofilm formation was inhibited into 1,8 and 2,75 times. Under this decreasing of mucopolysaccharides synthesis was detected.

К e y w o r d s: meso-tetra (4-N-methylpyridil) porphyrin, metallocomplex with bismuth, antimicrobial activity, biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*.

