

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 COOH-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 БНЦ 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.

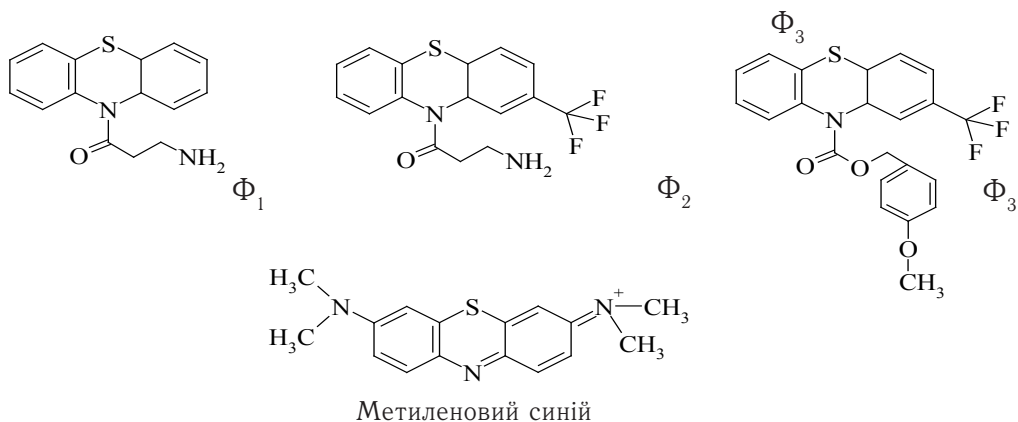


Рис. 1. Структура досліджуваних сполук

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 повторях. Всі експерименти повторювали тричі. Статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням критерію Стьюдента 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).

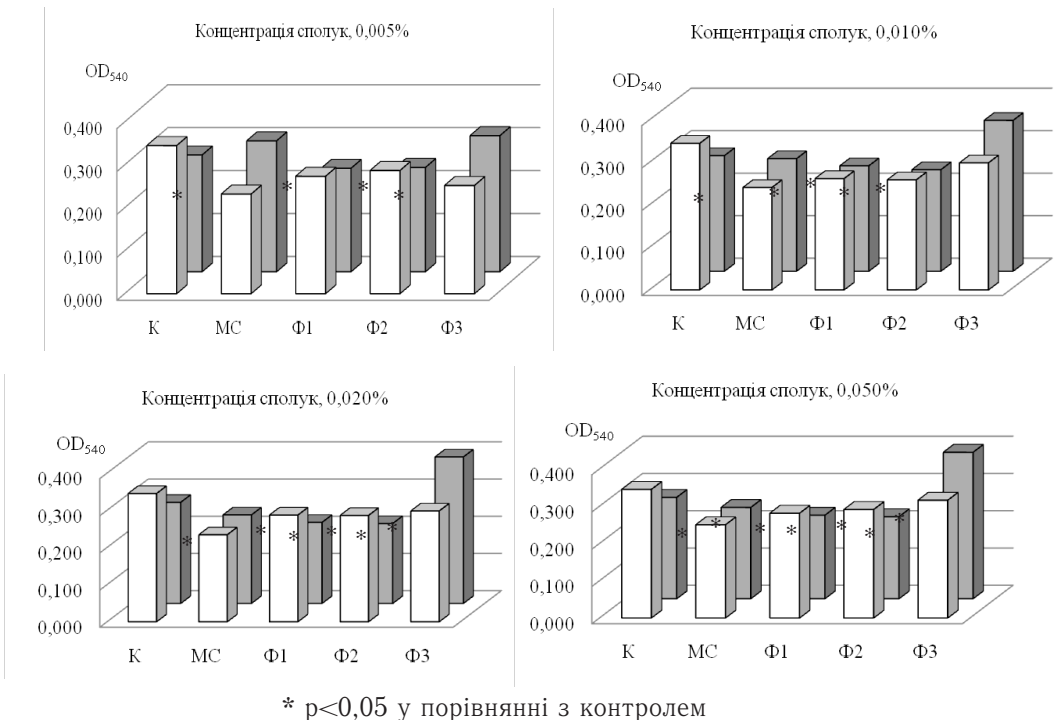


Рис. 2. Ріст бактеріальних культур за фотоіндукованої дії досліджуваних фенотіазинів: □ – *S. aureus*, ■ – *E. coli*, К – контроль, МС – метиленовий синій

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 грампозитивні 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. Филиппова

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 фенойтиазиновых 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 фенойтиазина как в темновых условиях, так и при фотоинактивации.

Ключевые слова: антимикробная активность, фенойтиазиновые 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*.

