

Є.Ю. Пахомова, М.Б. Галкін, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова

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

ВПЛИВ ВІСМУТОВИХ КОМПЛЕКСІВ ПОРФІРИНІВ І БАКТЕРІОФАГА НА ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ ТА СИНТЕЗ ПІОЦИАНІНУ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Встановлено, що за сумісного використання з порфіринами бактеріофаг P. aeruginosa потенціює інгібуючу дію вісмутових комплексів на процеси, контрольовані системою quorum sensing. Показано, що самі по собі вісмутові комплекси порфіринів знижують синтез піоціаніну та утворення біоплівки P. aeruginosa пропорційно їх концентрації у середовищі. Найбільшу інгібуючу активність виявляє Vi(III)-ТПП, найменшу – Vi(III)-ПП IX. За присутності 0,4 мкМ Vi(III)-ТПП кількість піоціаніну у добовій культурі зменшується у 1,8 разу від контролю. При 40 мкМ Vi³⁺-ТПП кількість пігменту була нижчою у 2,3 разу, а при 80 мкМ – у 3,1 разу. За присутності бактеріофага (2×10^5 БУО/мл) вміст пігменту був нижчим у 2,5; 4,7 та 10 разів від контролю при концентраціях вісмутового комплексу ТПП 0,4; 4 і 80 мкМ, відповідно. Маса біоплівки за сумісного впливу бактеріофага і Vi(III)-ТПП утримувалася менша ніж при дії тільки одного порфірину. Вісмутові комплекси інших порфіринів чинять такий самий за спрямованістю ефект, але за кількісними показниками поступаються Vi(III)-ТПП. Встановлено, що за дії тільки бактеріофага формування біоплівки не порушується, але синтез піоціаніну суттєво зменшується.

Ключові слова: біоплівка, піоціанін, P. aeruginosa, бактеріофаг вісмутові комплекси порфіринів.

У зв'язку з широким розповсюдженням бактерій з множинною стійкістю до антибіотиків в останній час виникла концепція відродження фаготерапії – використання бактеріофагів в лікуванні інфекційних захворювань [15]. В більш широкому сенсі фаготерапія передбачає застосування не тільки живих фагів, але і їх білкових продуктів, які можуть вбивати бактерії або підвищувати їх чутливість до інших антимікробних засобів. До таких білків, перш за все, відносяться ферменти бактеріофагів, які розщеплюють пептидоглікани клітинних стінок бактерій, полісахаридні капсули та позаклітинні полімери [10,14]. Наявність деполімераз свідчить про можливість використання бактеріофагів або їх ферментів для руй-



нування бактеріальних біоплівки. Стійкість бактерій у складі біоплівки до антимікробних засобів значною мірою забезпечується матриксом, до складу якого входять різні біополімери [6,7,11]. Розщеплення полімерів зменшує в'язкість біоплівки, що сприяє підвищенню чутливості бактеріальних клітин до антибіотиків [5,13].

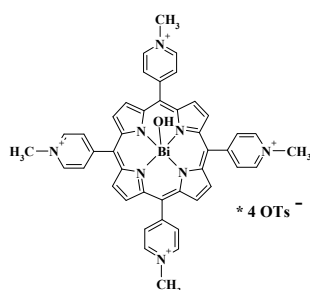
Раніше нами було показано, що комерційний препарат синьогнійного бактеріофага утворює негативні колонії на газоні *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692, але не впливає на формування цим штамом біоплівки та кількість планктонних клітин [3]. Тому було доцільним дослідити здатність цього бактеріофага потенціювати дію сполук, які попереджають утворення біоплівки *P. aeruginosa*.

Метою роботи було дослідження сумісного впливу синьогнійного бактеріофага і вісмутових комплексів синтетичних порфіринів — ефективних інгібіторів системи міжклітинної комунікації і формування біоплівки [1,4], на деякі показники функціонування системи quorum sensing *P. aeruginosa* ATCC 15692.

Матеріали і методи

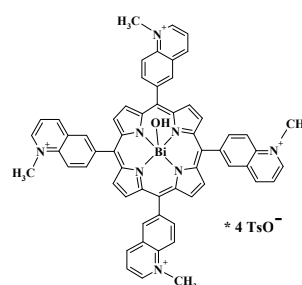
У роботі як тест-мікроорганізм використовували колекційний штам *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692.

Досліджені у роботі порфірини синтезовані у ПНДЛ-5 ОНУ імені І.І. Мечникова. Нижче наведені структурні формули, повні та скорочені назви цих речовин:



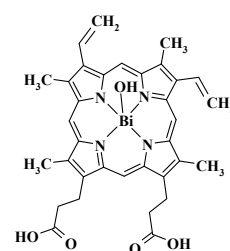
Ві(III)-мезо-тетра(4-N-метил-піридил)порфірин

Ві(III)-ТПП



Ві(III)-мезо-тетра(6-N-метил-хінолінил)порфірин

Ві(III)-ТХП



Ві(III)-протопорфірин IX

Ві(III)-ПП IX

Джерелом бактеріофага слугував комерційний препарат «Бактеріофаг Псевдомонас аеругіноза (синьогнійний)» виробництва МікроГен з титром 10^7 бляшкоутворюючих одиниць в 1 мл.

Вивчення сумісного впливу синьогнійного бактеріофага і вісмутових комплексів синтетичних порфіринів на функціонування системи quorum sensing *P. aeruginosa* проводили у стаціонарній системі «планктон—біоплівка» за показниками: утворення біоплівки, синтез піоціаніну, кількість планктонних клітин.



Культивування здійснювали у 48-лункових планшетах «Nuclon». У кожну лунку поміщали 1 мл середовища Гіса з глюкозою без індикатора Андреде і вносили добову культуру *P. aeruginosa* до кінцевої концентрації 10^3 кл/мл. В експериментах з бактеріофагом у лунки вносили по 20 мкл комерційного препарату. Вісмутові комплекси порфіринів додавали до кінцевих концентрацій 0,4; 40 та 80 мкМ.

Планшети інкубували в термостаті при температурі 37 °С впродовж 24 годин. Після цього вимірювали оптичну густину планктонної культури на спектрофотометрі “μQuant” (Угорщина) при довжині хвилі 540 нм.

Біоплівки у планшетах відмивали від неприкріплених клітин фізіологічним розчином та фіксували 96% етанолом на протязі 10 хв. Після фіксації зразки забарвлювали водними розчином кристалічного фіолетового впродовж 5 хв. Біоплівку у планшетах після висушування при кімнатній температурі руйнували за допомогою лізуючого розчину 0,1 М NaOH + 1% SDS та інкубували при кімнатній температурі 1,5 год. Облік результатів проводили на спектрофотометрі “μQuant” (Угорщина) при довжині хвилі 592 нм [9].

Для визначення вмісту піоціаніну 5 мл супернатанту переносили у чисті пробірки, екстрагували 3 мл хлороформу і реекстрагували 1 мл 0,2 Н HCl до виникнення червоного забарвлення. Заміряли оптичну густину розчину піоціаніну у 0,2 Н HCl на спектрофотометрі “μQuant” (Угорщина) при довжині хвилі 510 нм [8].

Всі експерименти проводили тричі з 5 повторами в кожному.

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

Результати та їх обговорення

Одержані результати (рис. 1–3) свідчать про те, що досліджувані вісмутові комплекси порфіринів інгібують утворення біоплівки, синтез піоціаніну та зменшують вміст клітин *P. aeruginosa* у планктоні. Вираженість цих ефектів залежить від концентрації сполук у середовищі. Показано, що найбільшу пригнічуючу активність виявляє Ві(III)-ТПП. Вже за концентрації 0,4 мкМ цей комплекс знижує утворення біоплівки і синтез піоціаніну на 35% і 44%, відповідно.

Два інші комплекси у даній концентрації зменшують ці показники на 20–30%. За впливу більш високих концентрацій досліджуваних сполук спостерігаються більш суттєві відмінності між їх ефектами.

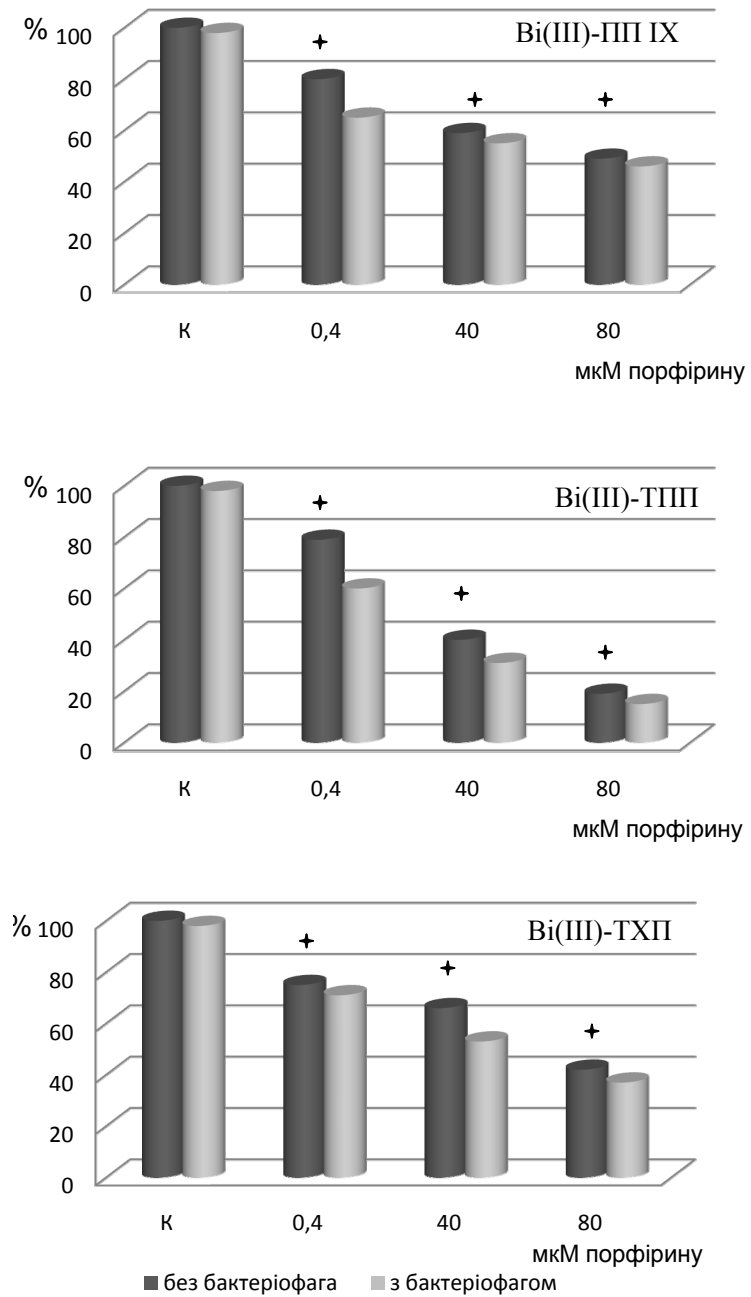


Рис. 1. Вміст планктонних клітин *P. aeruginosa* ATCC 15692 за впливу вісмутових комплексів порфіринів та бактеріофага

Примітка: — різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig.1. *P. aeruginosa* ATCC 15692 planktonic cells contain on the porphyrines bismuth complexes and bacteriophage presence

Note: — significant different from control

Якщо за присутності 80 мкМ Ві(III)-ПП ІХ маса біоплівки становить біля 70% від контролю, то за дії Ві(III)-ТПП і Ві(III)-ТХП вона є нижчою у 12 та 5,5 разів, відповідно. Така сама залежність спостерігається при визначенні впливу на пігментоутворення *P. aeruginosa*. Більш високу інгібуючу активність у порівнянні з Ві(III)-ПП ІХ виявляють мезозаміщені вісмутові комплекси. Синтез піоціаніну зменшується у два рази за присутності вісмутового комплексу протопорфірину ІХ і у три рази за дії двох інших сполук. На нашу думку більша ефективність Ві(III)-ТПП і Ві(III)-ТХП може бути обумовлена присутністю в мезо-замісниках цих молекул чотирьох позитивно заряджених атомів азоту, що полегшує їх зв'язування з негативно зарядженою поверхнею клітин. В молекулі Ві(III)-ПП ІХ у бокових замісниках таких атомів немає. Крім того, цей комплекс може руйнуватися гемоксигеназою клітин.

Кількість клітин у планктоні (рис. 1) зменшується за впливу усіх досліджуваних сполук, але не так значно, як утворення біоплівки і синтез фенізінового пігменту. Оскільки пул планктонних клітин формується завдяки їх поділу та відкріпленню від біоплівки, можна припустити, що вісмутові комплекси порфіринів сприяють саме другому механізму. На користь цього свідчать отримані нами раніше дані про більш ефективне пригнічення досліджуваними сполуками росту *P. aeruginosa* у суспензійній культурі в порівнянні зі зменшенням вмісту клітин у рідкій фазі в системі «планктон–біоплівка» [12].

Наведені на рис. 1 і 2 дані демонструють, що за додавання тільки одного бактеріофага формування біоплівки і накопичення клітин у планктоні не порушуються. Однак при цьому вдвічі зменшується синтез піоціаніну (рис. 3). У разі сумісного використання з порфіринами препарат бактеріофага потенціє дію вісмутових комплексів, хоча у різному степені щодо окремих характеристик. Так, зменшення вмісту планктонних клітин спостерігається в усіх варіантах, але воно не перевищує 5–15% і не є достовірним (рис. 1). У той же час, контрольовані системою *quorum sensing* процеси формування біоплівки та синтез піоціаніну за присутності бактеріофага достовірно інгібуються у порівнянні з дією тільки одних порфіринів (рис. 2 і 3). Найбільш суттєві зміни (зниження у 2–3 рази) спостерігаються при концентраціях вісмутових комплексів 40 і 80 мкМ. Наприклад, за присутності 0,4 мкМ Ві(III)-ТПП кількість піоціаніну у добовій культурі зменшується у 1,8 разу від контролю, при 40 мкМ кількість пігменту була нижчою у 2,3 разу, а при 80 мкМ — у 3,1 разу. За додавання бактеріофага вміст пігменту був нижчим у 2,5; 4,7 та 10 разів від контролю при концентраціях вісмутового комплексу ТПП 0,4; 40 і 80 мкМ, відповідно. Маса біоплівки за сумісного впливу бактеріофага і Ві(III)-ТПП утричі менша ніж при дії тільки одного порфірину.

Вісмутові комплекси інших порфіринів чинять такий самий за спрямованістю ефект. Слід відмітити також значне зростання ефективності найменш активного з досліджуваних сполук Ві(III)-ПП ІХ.

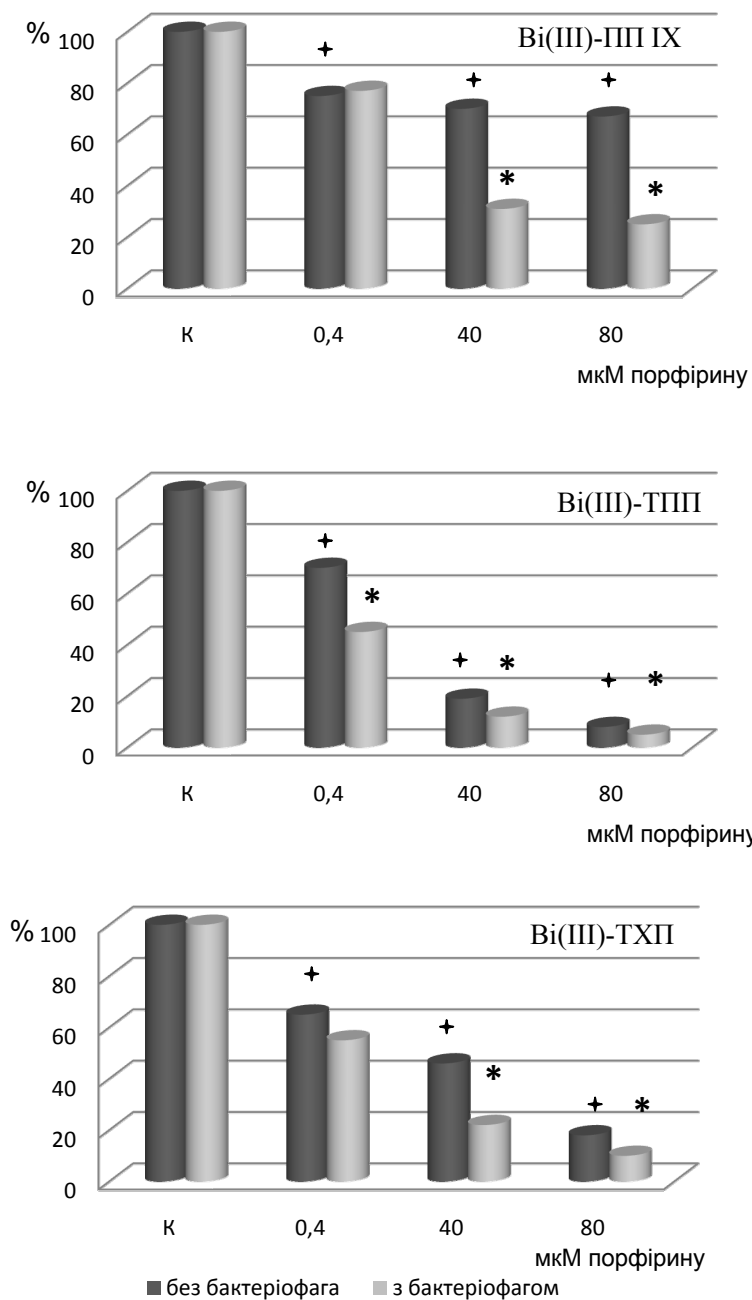


Рис. 2. Утворення біоплівки *P. aeruginosa* ATCC 15692 за впливу вісмутових комплексів порфіринів та бактеріофага

Примітка: * — різниця достовірна у порівнянні з дією тільки порфіринів
 — різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 2. *P. aeruginosa* ATCC 15692 biofilm formation on the porphyrines bismuth complexes and bacteriophage presence

Note: * — significant different from porphyrines
 Note: — significant different from control



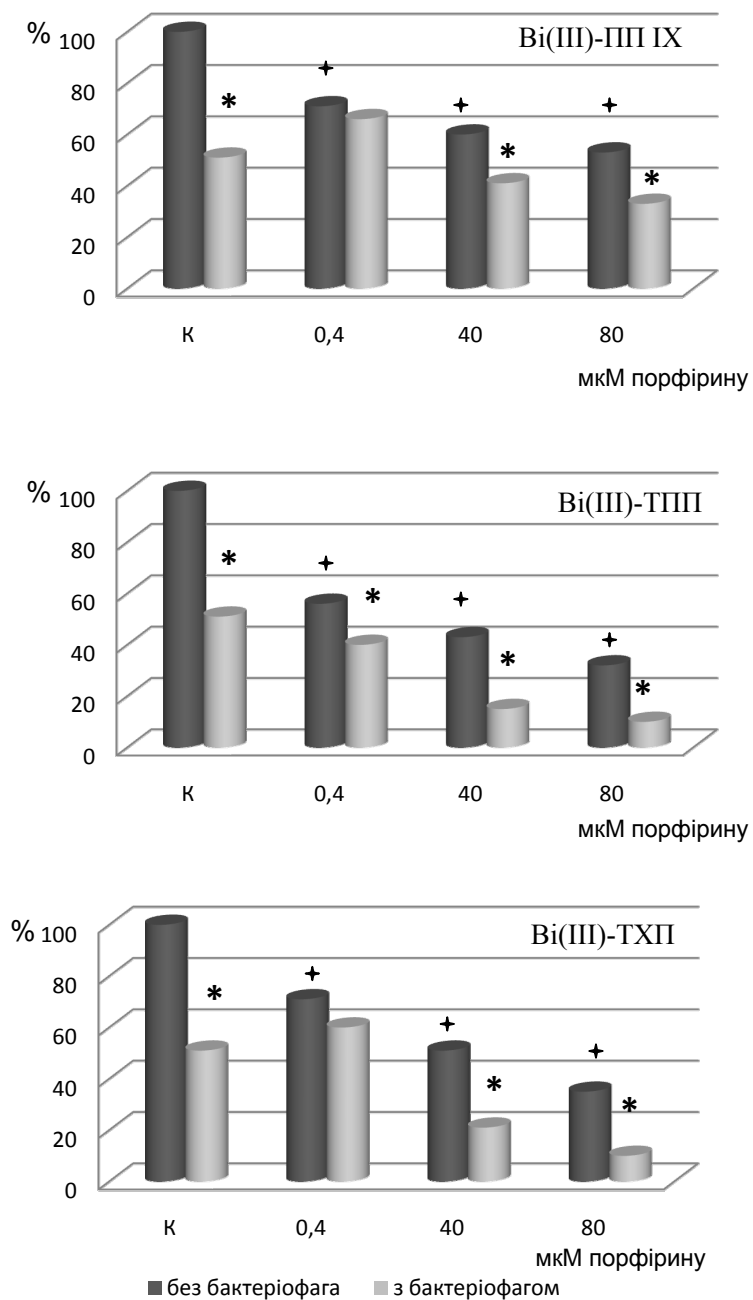


Рис. 3. Синтез піоціаніну *P. aeruginosa* ATCC 15692 за впливу вісмутових комплексів порфіринів та бактеріофага

Примітка: * — різниця достовірна у порівнянні з дією тільки порфіринів
 — різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 3. *P. aeruginosa* ATCC 15692 piocyanin biosynthesis on the porphyrines bismuth complexes and bacteriophage presence

Note: — significant different from porphyrines
 Note: — significant different from control

Таким чином, встановлено, що за комбінованого використання бактеріофага та інгібіторів системи quorum sensing *P. aeruginosa* спостерігається потенціювання ефектів цих засобів і пригнічення *rhl*-ланки міжклітинної комунікації *P. aeruginosa*. Значне зниження синтезу піоціаніну, як одного з факторів патогенності, зменшує інфекційний потенціал *P. aeruginosa*. Можливим механізмом потенціювання дії вісмутових комплексів порфіринів може бути розрідження матриксу біоплівки і слизового шару навколо клітин завдяки впливу деполімераз бактеріофага, що поліпшує контакт цих сполук з клітинами. Здатність самого препарату бактеріофага пригнічувати синтез піоціаніну свідчить про наявність в ньому компонентів, які є інгібіторами *rhl*-ланки quorum sensing. Останнє обґрунтовує доцільність дослідження більш широкого кола ознак, залежних від функціонування системи міжклітинної комунікації та її окремих ланок.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Галкін М.Б., Водзінський С.В., Кириченко Г.М., Іваниця В.О. Особливості формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 при темновому та фотоіндукованому впливі вісмут-містких порфіринів // Мікроб. і біотехнол. — 2010. — № 3(11). — С. 51–60.
2. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К. : Морион, 2001. — 260 с.
3. Пахомова Е.Ю., Галкин Н.Б., Филиппова Т.О. Формирование биопленки *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 в присутствии порфиринов и бактериофага // Мат-ли Х міжнародної наукової конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2012», Київ, 19–23 березня 2012. — С. 243–244.
4. Філіпова Т.О., Жіліна 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. 167–172.
5. Alkawash M.A., Soothill J.S., Schiller N.L. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. — APMIS. — 2006. — V. 114, № 2. — P. 131–138.
6. Chambless J., Hunt S., Stewart P. A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials // Appl. Environ. Microbiol. — 2006. — V. 72. — P. 2005–2013.
7. Cotter P.A., Stibitz S. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation // Curr. Opin. Microbiol. — 2007. — V. 10. — P. 17–23.
8. Essar D.W., Eberly L., Hadero A., Crawford I.P. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. // J. bacterial. — 1990. — V. 172. — № 2. — P. 884–900.
9. 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 // J. clin. microbiol. — 1985. — V. 22, № 6. — P. 996–1006.

10. *Fischetti V.A.* Bacteriophage lytic enzymes: Novel anti-infectives // Trends Microbiol. — 2005. — V. 13. — P. 491–496.

11. *Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S., Stoodley P.* Survival strategies of infectious biofilms // Trends Microbiol. — 2005. — V. 13. — P. 34–40.

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

13. *Glonti T., Chanishvili N., Taylor P.W.* Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginic acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* // J. Appl. Microbiol. — 2010. — V. 108, № 2. — P. 695–702.

14. *Sillankorva S., Neubauer P., Azeredo J.* Isolation and characterization of a T7-like lytic phage for *Pseudomonas fluorescens* // BMC Biotechnology. — 2008. — V. 8. — P. 79–90.

15. *Summers W.C.* Bacteriophage therapy // Annu Rev Microbiol. — 2001. — V. 55. — P. 437–451.

Стаття надійшла до редакції 20.09.2012 р.

УДК 579.222:579.262

Е.Ю. Пахомова, Н.Б. Галкин, Б.Н. Галкин, Т.О. Филиппова

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

ВЛИЯНИЕ ВИСМУТОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ПОРФИРИНОВ И БАКТЕРИОФАГА НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ И СИНТЕЗ ПИОЦИАНИНА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Реферат

Показано, что при совместном использовании с порфиринами препарат бактериофага *P. aeruginosa* потенцирует ингибирующее действие висмутовых комплексов на процессы, контролируемые системой *quorum sensing*. Сами по себе висмутовые комплексы порфиринов снижают синтез пиоцианина и образование биопленки *P. aeruginosa* пропорционально их концентрации в среде. Наибольшую угнетающую активность проявляет 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 содержание пигмента было ниже в 2,3 раза, а при 80 мкМ — в 3,1 раза. В присутствии бактериофага (2×10^5 БОЕ/мл) содержание пигмента снижалось в 2,5; 4,7 та 10 раз от контроля при концентрациях висмутового комплекса



ТПП 0,4; 4 і 80 мкМ, відповідно. Маса біопленки при спільному впливі бактеріофага і Вi(III)-ТПП була менше втричі ніж при впливі тільки одного порфірину. Висмутові комплекси інших порфіринов надають такий же самий по направленості ефект, але по кількісним показателям поступають Вi(III)-ТПП. При використанні одного бактеріофага утворення біопленки не порушується, однак синтез піоціаніну суттєво знижується.

Ключевые слова: біопленка, піоціанін, *P. aeruginosa*, бактеріофаг висмутові комплекси порфіринов.

UDC 579.222:579.262

E.Yu. Pachomova, M.B. Galkin, B.M. Galkin, T.O. Filipova

Odesa Mechnykov National University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (0482) 63 57 61,
e-mail: tphilippova@onu.edu.ua

ACTION OF PORPHYRINES BISMUTH COMPLEXES AND BACTERIOPHAGE ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BIOFILM FORMATION AND PIOCYNANIN BIOSYNTHESIS

Summary

It was shown that *P. aeruginosa* bacteriophage can possess inhibitory action on the quorum sensing system in presence of synthetic porphyrines bismuth complexes. Synthetic porphyrines bismuth complexes, used alone, show an ability to inhibit piocyanin biosynthesis depend of its concentration in culture media. Bi(III)-TPP shows the highest inhibitory activity, Bi(III)-ПП IX – the lowest. In presence of 0.4 μM Bi(III)-TPP piocyanin concentration in culture media decreases 1.8 times as compared to the control. In presence of 40 μM Bi(III)-TPP pigment concentration decreased 2.3 times and in presence of 80 μM – 3.1 times. In presence of bacteriophage (2×10^5 PFU/ml) and Bi(III)-TPP concentrations (0.4; 4 and 80 μM) pigment contain decreased 2.5; 4.7 and 10 times respectively. The biofilm mass on the synergistic action of the bacteriophage and Bi(III)-TPP was three times lower than in presence of this porphyrine bismuth complex alone. Bismuth complexes of other porphyrines used, show the same effects, but rather lower than Bi(III)-TPP. Bacteriophage used alone show no effects on the biofilm formation, while piocyanine biosynthesis in presence of bacteriophage strongly decreased.

Key words: biofilm, piocyanin, *P. aeruginosa*, bacteriophage, porphyrines bismuth complexes.

