

Влияние природных гипополипидемических соединений на формирование биоплёнок штаммами рода *Pseudomonas*

Т. О. ПУЖЕВСКАЯ¹, М. В. БИБИКОВА¹, Н. Э. ГРАММАТИКОВА¹, Н. А. МИХАЙЛОВА², А. В. КАТЛИНСКИЙ³

¹ Государственный научный центр по антибиотикам, Москва

² Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова, Москва

³ Московская медицинская академия им. М. И. Сеченова, Москва

Influence of Natural Hypolipidemic Compounds on Formation of *Pseudomonas* biofilms

T. O. PUZHEVSKAYA, M. V. BIBIKOVA, N. E. GRAMMATIKOVA, N. A. MIKHAILOVA, A. V. KATLINSKY

National Research Centre of Antibiotics, Moscow, I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow

M. I. Sechenov Moscow Medical Academy, Moscow

Отобраны природные соединения, проявляющие значительный ингибирующий эффект на образование биопленок *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Установлен синергидный эффект отобранных соединений с гентамицином как по ингибированию образования биопленок, так и в проявлении антибиотической активности гентамицина.

Ключевые слова: биоплёнки, *Pseudomonas aeruginosa*, гентамицин.

Natural compounds showing considerable inhibitory effect on formation of biofilms by *P.aeruginosa* were selected. Synergism of the compounds with gentamicin with respect to both the inhibition of the biofilm formation and the gentamicin antibacterial effect was stated.

Key words: biofilms, *Pseudomonas aeruginosa*, gentamycin.

Большинство возбудителей инфекционных заболеваний способны образовывать биоплёнки — ассоциации микроорганизмов с высокой устойчивостью к антибактериальным препаратам и к воздействию защитных иммунных механизмов макроорганизма. Минимальная подавляющая концентрация (МПК) антибиотиков в отношении возбудителей, находящихся в биоплёнках в 10—1000 раз превышает МПК для этих же бактерий в планктонном состоянии [1]. Отмечается ряд факторов, определяющих резистентность бактерий в биоплёнках: медленный рост, связанный, в частности, с низким содержанием в биоплёнках кислорода [2], повышенная возможность обмена плазидами, содержащими гены резистентности [3] и т. д. Важным моментом, объясняющим рецидивы инфекций после проведенной терапии, является наличие персистирующих форм бактерий, находящихся в биоплёнках [4]. Более того, с наличием возбудителей в составе биоплёнок связывают течение многих хронических воспалительных процессов. Способность *Pseudomonas aeruginosa* образовывать биоплёнки на бронхах может приводить к летальному исходу при муковисцидозе. Показано, что при муковисцидозе

у *P.aeruginosa* функционируют различные факторы адгезии (пили, альгинат, гемагглютинин, экзоэнзим S, жгутик), за счет которых бактерии связываются с соответствующими рецепторами на поверхности клеток макроорганизма, содержащих лактозные и сиалозные остатки. *P.aeruginosa* способна легко прикрепляться к различным поверхностям, в том числе к полимерным поверхностям с последующим формированием биоплёнки. Это свойство имеет основное значение для развития катетер-ассоциированных инфекций [5—7].

Бактерии в биоплёнке окружены продуцируемым ими полимерным матриксом. Среди различных молекул, обнаруженных в составе матрикса, особое внимание привлекают липиды и внеклеточная ДНК [8, 9]. Показано, что обработка ДНКазой разрушает сформированные биоплёнки или приводит к уменьшению ее массы в момент образования. Установлен синергидный эффект при совместном действии ДНКазы и антибиотиков [10]. Представляет несомненный интерес оценка возможности воздействия на формирование биоплёнок различных гипополипидемических соединений.

Материал и методы

Штаммы. В работе был использован штамм *P.aeruginosa* ATCC 27853, полученный из коллекции культур микроорганизмов ГНЦА.

© Коллектив авторов, 2009

Адрес для корреспонденции: 117105 Москва, Нагатинская ул., д. За. ГНЦА

Таблица 1. Влияние комплексных экстрактов и фракций на формирование биоплёнок штаммом *P.aeruginosa* ATCC 27853

Проба	Плотность биоплёнки в ЕД оптической плотности*	Плотность биоплёнки в % по отношению к контролю
Контроль	0,692	100
Комплексный препарат № 169	0,963	139
Жирные кислоты комплекса № 169	1,205	174
Фракция 11 комплекса № 169	0,623	90
Комплексный препарат № 162	1,019	147
Жирные кислоты комплекса № 162	1,267	183
Комплексный препарат № 59	1,107	159
Комплексный препарат № 7	1,152	167
Фракция 1 комплекса № 7	0,554	82
Фракция 3 комплекса № 7	0,484	70

Примечание. * – среднее по результатам трех опытов.

Питательные среды. Среда БТН № 1 (Биотехновация), агар Мюллера-Хинтона (BioMerieux S. A.), бульон Мюллера-Хинтона (BioMerieux S. A.).

Антибиотики: Полимиксин В (Pfizer, США), гентамицин (РФ).

Эксперимент. Биоплёнки получали в пластиковых 96-луночных планшетах (Медполимер, РФ). В лунки вносили по 0,1 мл 24-часовой бульонной культуры бактерий, разведённой до конечной концентрации 5×10^7 КОЕ/мл, инкубировали 24 часа при температуре 37°C, после чего добавляли испытуемые соединения и инкубировали в последующие 24 ч. Для контроля чистоты препаратов, их вносили в среду культивирования без тест-организма и культивировали параллельно. После инкубации удаляли остатки среды с планктонными клетками, образовавшиеся биоплёнки трёхкратно отмывали фосфатным буфером (рН 7,4) и окрашивали кристаллвиолетом (0,1%) в течение 10 мин. Для извлечения остатков красителя лунки несколько раз промывали тем же буфером, затем добавляли раствор, содержащий ацетон:этанол в соотношении (20:80), для извлечения красителя из биоплёнок. Интенсивность окраски экстрагента (оптическую плотность) определяли спектрофотометрически при 540 нм. Плотность биоплёнок, полученных при наличии исследуемых веществ и/или антибиотиков, оценивали по отношению к интактному контролю, принятому за 100%.

Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) антибиотиков определяли в жидкой питательной среде методом серийных разведений.

Жизнеспособность бактерий оценивали по оптической плотности раствора после флуоресцентного окрашивания [11, 12]. В качестве флуоресцентного красителя использовали диацетат флуоресцеина (ФДА). Для проведения опыта готовили 0,1% раствор ФДА в ацетоне, непосредственно перед работой готовили водный раствор красителя в соотношении 1:10. В стерильные пробирки с 5 мл стерильной воды добавляли по 100 мкл суспензии клеток *P.aeruginosa*. Затем в каждую пробирку вносили по 0,5 мл разведенного ФДА и перемешивали. Выдерживали в термостате 60–90 мин до зеленого окрашивания раствора в контрольных пробирках. Биомассу отделяли центрифугированием при 3000 об/мин и оценивали интенсивность окраски нативного раствора спектрофотометрически при длине волны 490 нм.

Определение антибактериальной активности исследуемых образцов в отношении *P.aeruginosa* ATCC 27853 определяли методом диффузии в агар [13]. При определении антимикробной активности концентраты комплексных соединений вносили в количестве 200 мкл в лунки, вырезанные в агаре, зараженном тест-культурой *P.aeruginosa* ATCC 27853. О величине МПК каждого исследуемого образца судили по диаметру зон подавления роста тест-организма.

Результаты и обсуждение

Штамм *P.aeruginosa* ATCC 27853 демонстрировал способность к формированию биоплёнок, ко-

торую можно было зарегистрировать через 24 ч культивирования. В последующие сутки плотность плёнки увеличивалась. Нами было установлено, что МПК гентамицина и полимиксина для планктонной культуры этого штамма составили 2 мкг/мл.

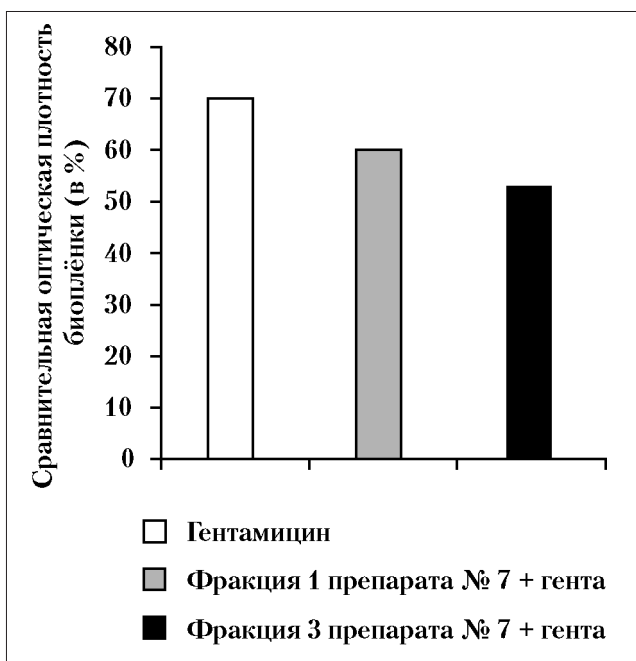
Как гентамицин, так и полимиксин, внесенные в среду через 24 ч культивирования в концентрациях, соответствующих МПК — 2 мкг/мл для планктонной культуры *P.aeruginosa* ATCC 27853, не оказывали ингибирующего эффекта на формирование биоплёнок при последующем культивировании в течение суток. Добавление гентамицина в концентрации 64 мкг/мл к 24 часовой культуре снижало уровень образования биоплёнки тест-культурой на 27–30%. Полученные результаты подтверждают, что антибактериальные препараты, активные в отношении синегнойной палочки, проявляют активность только в отношении планктонной культуры и почти не влияют на бактериальные биоплёнки. Из литературных данных известно, что в условиях эксперимента, подобных нашему, контрольное вещество фуранон 56 в дозе 10 мкг/мл ингибировало образование биоплёнки штаммом *P.aeruginosa* PA01 на 13% [14]. Природные изоляты, полученные нами при скрининге проявляли более высокую ингибирующую способность.

Ранее авторами исследования был проведен скрининг природных гипополипидемических соединений, в результате которого были отобраны микроорганизмы, экстракты из мицелия которых ингибировали синтез холестерина, триглицеридов, снижали содержание ЛПНП и повышали содержание ЛПВП в крови кроликов [15]. Выделенные вещества не обладали антибактериальным действием, но представляло интерес оценить их способность воздействовать на способность ингибировать биоплёнки, в состав которых входят липидсодержащие полисахариды. Было исследовано 4 экстракта и ряд хроматографически очищенных фракций этих экстрактов.

В табл. 1 представлены результаты оценки влияния комплексных экстрактов и их фракций на формирование биопленок *P.aeruginosa* ATCC

Таблица 2. Влияние совместного применения гентамицина и фракций препарата № 7 на выживаемость *P.aeruginosa* ATCC 27853

Проба	Оптическая плотность (ОП) раствора после флуоресцентного окрашивания диацетатом флуоресцеина
Контроль	1,260
Гентамицин 1 мкг/мл	1,206
Гентамицин 1 мкг/мл + фракция 1 (10 мкг/мл)	0,472
Гентамицин 1 мкг/мл + фракция 3 (10 мкг/мл)	0,064



Усиление ингибирующего действия гентамицина (64 мкг/мл) фракциями 1 и 3 препарата № 7 (9 мкг/мл) на формирование биоплёнки *P.aeruginosa* ATCC 27853.

27853. Препараты вносили в среду при культивировании в концентрации 9 мкг/мл.

Способность ингибировать рост биоплёнки *P.aeruginosa* ATCC 27853 установлена у фракций 11 препарата №169, выделенной из комплексного препарата, полученного из мицелия гриба *Lecanicillium* sp. №169, а также у фракций 1 и 3, выделенных из мицелия *Beauveria* sp. № 7. Фракция 11 препарата №169 в концентрации 9 мкг/мл снижала уровень образования биоплёнок тест-культурой на 10%, фракции 1 и 3, выделенные из культуры № 7, в той же концентрации — на 18% и 30% соответственно.

Комплексные экстракты и их фракции, содержащие жирные кислоты, усиливали интенсивность образования биоплёнок, возможно, за счет использования этих веществ и/или их компонентов культурами в качестве питательного субстрата, что приводило к экранизации проявления ингибирующей активности отобранных фракций.

Как показано выше, гентамицин способен ингибировать образование биоплёнок *P.aeruginosa*

ATCC 27853 в концентрации 64 мкг/мл. Нами установлен синергизм по ингибированию формирования биоплёнок тест-культурой гентамицина (64 мкг/мл) с отобранными фракциями (по 9 мкг/мл). Максимальное снижение формирования биоплёнок наблюдалось при совместном воздействии гентамицина и фракции № 3, выделенной из комплексного препарата *Beauveria* sp. № 7 (рисунок).

Отобранные фракции в концентрации 1–100 мкг/мл не ингибировали рост планктонной тест-культуры, однако добавленные в питательную среду при засеве одновременно с гентамицином, дозозависимо усиливали действие антибиотика. В этом случае жизнеспособность бактерий в присутствии препаратов и гентамицина оценивали по оптической плотности раствора после флуоресцентного окрашивания. Совместное применение фракций № 1 и 3 (10 мкг/мл) и гентамицина (1 мкг/мл — субингибирующая концентрация) приводило к значительному снижению числа жизнеспособных микробных клеток (табл. 2).

Таким образом, в результате исследований отобраны соединения, ингибирующие образование биоплёнок штаммом *P.aeruginosa* ATCC 27853. Установлен синергизм этих соединений с гентамицином как по ингибированию формирования биоплёнок, так и в воздействии на планктонную культуру.

Заключение

Способность к формированию биоплёнки *P.aeruginosa* затрудняет терапию антибактериальными препаратами при лечении заболеваний, вызванных этим возбудителем. Предполагается, что около 80% всех заболеваний связано с образованием биоплёнок [16].

Учитывая, что формирование биоплёнок в настоящее время рассматривается как важнейший элемент патогенеза инфекционных заболеваний при которых антимикробная терапия не эффективна, необходим поиск новых соединений, как воздействующих непосредственно на биоплёнку, так и усиливающие действие существующих антибактериальных препаратов.

В результате проведённых нами исследований было установлено, что природные соединения, полученные в результате скрининга, проявили способность к ингибированию образования биоплёнок.

Выживаемость бактерий в биоплёнках при совместном применении отобранных препаратов и гентамицина значительно уменьшалась. Наблюдалось потенцирование действия антибиотика в отношении тест-культуры *P.aeruginosa* ATCC 27853 (МПК снижалось в 2—3 раза).

ЛИТЕРАТУРА

1. Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E. et al. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 711—745.
2. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318—1322.
3. Roberts S. K., Bass C., Brading M. H. et al. Biofilm formation and structure: what's new? *BioLine* 1999; 15—35.
4. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 4: 999—1007.
5. Ефименко Н. А., Гучев И. А., Сидоренко С. В. Инфекции в хирургии. Фармакотерапия и профилактика. Смоленск, 2004; 296.
6. Hoiby N. Prospects for the prevention and control of Pseudomonal infection in children with cystic fibrosis. *Pediatr Drugs* 2000; 2: 6: 451.
7. Juhas M., Eberl L., Tummel B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol* 2005; 7: 459—471.
8. Тец Г. В. Роль внеклеточной ДНК и липидов матрикса во взаимодействии бактерий биоплёнок с антибиотиками: Автореф дисс канд мед наук. Санкт-Петербург, 2007.
9. Мошкевич И. Р. Микробные биоплёнки при смешанных инфекциях: Автореф дисс канд мед наук. Санкт-Петербург, 2007.
10. Тец Г. В., Артеменко К. Л. Совместное действие антибиотиков и дезоксирибонуклеазы на бактерии. *Антибиотики и химиотер* 2006; 6: 11—14.
11. Paton A. M., Jones S. H. The observation and enumeration of microorganisms in fluids using membrane filtration and incident fluorescence microscope. *J Appl Bact* 1975; 38: 199—200.
12. Joux F., Lebaron P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection*. 2000; 2: 1523—1535.
13. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. М.: 2004; 528.
14. Hu J.-F., Garo E., Goering G. Bacterial biofilm inhibitors from *Diospyros dendo*. *J Nat Prod* 2006; 69: 118—120.
15. Чмель Я. В., Бибикова М. В., Спиридонова И. А. и др. Скрининг природных соединений с гиполипидемической активностью. *Антибиотики и химиотер* 2004; 8—9: 8—12.
16. Spoering A. L., Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 2001; 183: 6746—6751.