

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-166

**ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПИГМЕНТА
PSEUDOMONAS AERUGINOSA НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ***

PHOTODYNAMIC ACTION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PIGMENT ON BACTERIAL BIOFILMS

А. Т. Ишемгулов, О. К. Давыдова, М. Е. Григорьев, В. А. Абдрахманова, С. Н. Летута

Оренбургский государственный университет

A. T. Ishemgulov, O. K. Davydova, M. E. Grigoriev, V. A. Abdrakhmanova, S. N. Letuta

Orenburg State University

✉ azamat.ischemgulov@yandex.ru

Аннотация

Исследовалась выживаемость бактерий *P. aeruginosa* в биопленках в результате фотодинамического действия вырабатываемого бактериями пигмента. Из пигментированных бактерий выделен бактериальный пигмент, который приблизительно в 3,5 раза снизил жизнеспособность непигментированного штамма после светового облучения. Также обсуждаются возможности применения бактериального пигмента в сочетании с экзогенными сенситизаторами.

Abstract

The survival of *P. aeruginosa* bacteria in biofilms was studied as a result of the photodynamic action of a pigment produced by the bacteria. A bacterial pigment was isolated from pigmented bacteria, which reduced the viability of the non-pigmented strain by approximately 3.5 times after light irradiation. The possibilities of using the bacterial pigment in combination with exogenous sensitizers are also discussed.

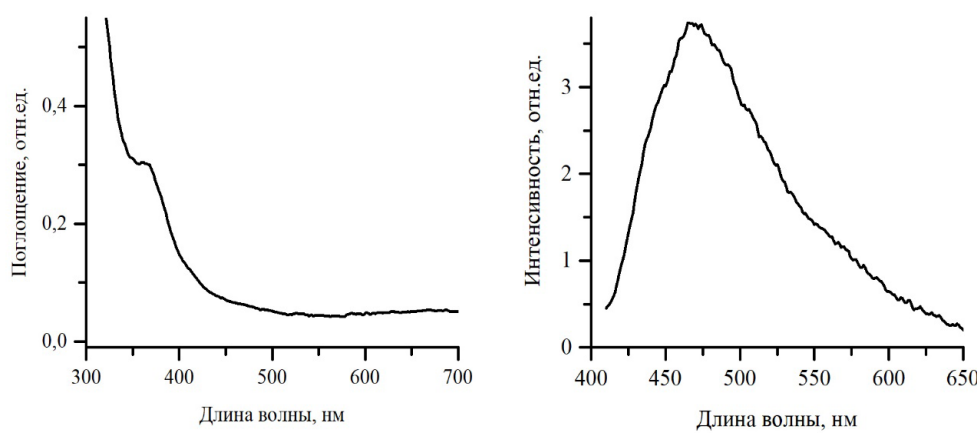
Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* вызывают у человека ряд тяжелых инфекций и достаточно устойчивы к традиционным антибиотикам во многом из-за интенсивного образования биопленок [1, 2]. Антимикробная фотодинамическая терапия (аФДТ) может воздействовать на биопленки за счет генерации активных форм кислорода, которые повреждают клетки бактерий и биопленочный матрикс, не вызывая резистентности. Кроме того, аФДТ действует локально, минимизируя побочные эффекты, и может сочетаться с традиционными методами лечения для повышения эффективности [3]. В настоящей работе исследовалась фотодинамическая активность бактериального пигмента, вырабатываемого *P. aeruginosa*, в отношении этих микроорганизмов, как пигментированного, так и лишённого пигмента штаммов.

При фильтрации суспензии пигментированного штамма *P. aeruginosa* через бактериальный фильтр был выделен раствор с пигментом. При исследовании его спектров поглощения был выявлен максимум в области 370–380 нм, характерный для бактериального пигмента пиовердина (см. рисунок). Была также обнаружена люминесценция пиовердина на 470 нм.

Биопленки для эксперимента выращивались на смеси ЦПХ-бульона и ЦПХ-агара, причем пропорциональность смеси подбиралась таким образом, чтобы при температуре инкубации среда оставалась жидкой (таким образом создаются условия для роста биопленки на поверхности), а при комнатной температуре среда застывала для формирования твердой подложки (в таком случае можно изготавливать множество одинаковых образцов биопленки). Для фотодинамического воздействия образцы биопленки размещались в лунки стандартного планшета. Фотодинамическое воздействие на все образцы оказывалось с помощью лампы КГМ-150, плотность мощности 0,05 Вт/см², продолжительность воздействия 15 мин. Далее образцы биопленок помещались в пробирку, суспензировались, полученная суспензия разводилась и высевалась для подсчета КОЕ.

Нативные биопленки (как пигментированного, так и непигментированного штаммов) не проявляли значимого снижения жизнеспособности при облучении без фотосенсибилизатора. Количество КОЕ из непигментированных биопленок, инкубированных как в растворе пигмента, так и в физрастворе (без светового воздействия), практически одинаково, что исключает значимое темновое действие пигмента.

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FSGU-2023-0003).



Спектры поглощения (слева) и люминесценции на длине волны 380 нм (справа) выделенного из суспензии бактериального пигмента

Фотодинамический эффект наблюдается только при облучении непигментированных биопленок, предварительно инкубированных с пигментом: в этом случае количество КОЕ снижается приблизительно в 4 раза (см. таблицу).

КОЕ, полученные при фотодинамической обработке пигментированных и непигментированных биопленок, а также непигментированных биопленок с добавленным пигментом

| | | | | | | |
|-------------|----------------|--------------|------------------|----------------|------------------------|----------------------|
| Схема | | | | | | |
| Обозначение | Контроль пигм. | Пигм. облуч. | Контроль непигм. | Непигм. облуч. | Добавл. пигм. контроль | Добавл. пигм. облуч. |
| КОЕ | 855 ± 86 | 710 ± 53 | 835 ± 72 | 800 ± 58 | 733 ± 68 | 235 ± 34 |

После облучения выживаемость клеток естественно пигментированного штамма составляет ~ 90 %, тогда как у непигментированного штамма с добавленным пигментом — менее 25 %. Поскольку концентрация выделенного пигмента в эксперименте не определялась, невозможно установить, была ли она эквивалентна его содержанию в естественно пигментированных биопленках. Если концентрация сенситизатора в образцах с добавленным пигментом существенно превышала таковую в естественно пигментированных биопленках, наблюдаемая разница в эффективности может быть объяснена именно этим фактором. Несмотря на слабую собственную фотодинамическую активность пигмента в отношении бактериальных клеток (его основная роль, вероятно, заключается в конкурентном подавлении других микроорганизмов в биопленках при дефиците ресурсов [4]), гипотеза состоит в том, что под воздействием света и внешнего фотодинамического стресса пигмент усиливает инактивацию пигментированных клеток. Наблюдаемое несколько меньшее выживание пигментированных бактерий при равных условиях не противоречит этой идее. Полученные результаты имеют высокий потенциал для внедрения в клиническую практику в качестве нового метода лечения инфекций, связанных с медицинскими устройствами (катетерами, имплантатами, протезами), и хронических ран (диабетических, ожоговых), развивая новые методы борьбы с биопленкообразованием.

Литература

1. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents // Nat. Rev. Drug Discov. 2003. Vol. 2. P. 114–122.
2. Sharma G., Rao S., Bansal A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets // Biologicals. 2014. Vol. 42 (1). P. 1–7.
3. Vinagreiro C. S. et al. Antibacterial Photodynamic Inactivation of Antibiotic-Resistant Bacteria and Biofilms with Nanomolar Photosensitizer Concentrations // ACS Infect. Dis. 2020. Vol. 6. P. 1517–1526.
4. Piel J., Vollenweider V., Polymenidou M. et al. Antimicrobial activity of iron-depriving pyoverdines against human opportunistic pathogens // eLife. 2024. Vol. 13.