

## АНТИВІРУЛЕНТНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОХІДНОГО АДАМАНТАНУ 4-(АДАМАНТИЛ-1)-1-(1-АМІНОБУТИЛ) БЕНЗОЛУ ЩОДО *Pseudomonas aeruginosa*

Н.І. Гуменюк<sup>1</sup>, Н.О. Вринчану<sup>1</sup>, Л.Б. Зелена<sup>2</sup>, Л.М. Іщенко<sup>3</sup>, Т.А. Бухтіарова<sup>1</sup>, О.М. Важничка<sup>4</sup>, І.О. Бойко<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>ДУ “Інститут фармакології та токсикології НАМН України”, Київ, Україна

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ, Україна

<sup>3</sup>Українська лабораторія якості та безпеки продукції агропромислового комплексу при Національному університеті біоресурсів і природокористування України, Київ, Україна

<sup>4</sup>Полтавський державний медичний університет, Полтава, Україна

\*Corresponding author: boikoil.ol@gmail.com

Received 14 June 2023; Accepted 20 September 2023

**Проблематика.** *Pseudomonas aeruginosa* – опортуністичний патоген, що характеризується високим рівнем вірулентності та віднесений до патогенів із критичним рівнем пріоритетності щодо необхідності розробки нових антимікробних препаратів. Вплив на фактори вірулентності є одним із перспективних напрямів створення антимікробних препаратів.

**Мета.** Дослідити антивірулентні властивості похідного аміноадамантану 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил)бензолу щодо *P. aeruginosa*.

**Методика реалізації.** Мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил)бензолу (шифр АМ-166) щодо клінічного тест-штаму *P. aeruginosa* 449 визначали загальноприйнятним методом серійних мікророзведень. Для визначення впливу АМ-166 на експресію генів проводили кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі. Вивчали синтез піоціаніну, гемолітичну та протеазну активність і рухливість *P. aeruginosa* за впливу АМ-166.

**Результати.** Отримані дані свідчать, що МІК сполуки АМ-166 становить 100 мкг/мл. За дії АМ-166 (0,5 МІК) відзначено зниження транскрипційної активності генів *lasI*, *lasR*, *pqsR*, *aprA*, *exoA*, *exoS* та збільшення експресії гена *rhlR*. Встановлено, що АМ-166 не змінює експресію гена *toxA*. АМ-166 збільшує продукцію піоціаніну, не впливає на протеазну активність, пригнічує гемолітичну активність і рухливість *P. aeruginosa* 449.

**Висновки.** Похідне адамантану АМ-166 порушує функціонування систем Quorum sensing і вірулентність *P. aeruginosa*, змінює транскрипційну активність генів, що регулюють синтез факторів вірулентності.

**Ключові слова:** похідне адамантану; *Pseudomonas aeruginosa*; експресія генів; Quorum sensing; фактори вірулентності.

### Вступ

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) – грам-негативна бактерія, присутня в різних екологічних нішах, включаючи ґрунт і воду. Вона колонізує різні живі організми та є умовно-патогенним збудником, однак становить небезпеку для пацієнтів із ослабленим імунітетом [1, 2]. У 2017 р. Всесвітня організація охорони здоров'я віднесла *P. aeruginosa* до групи з критичним рівнем пріоритетності щодо необхідності розробки нових антимікробних препаратів. Синьогнійна паличка – представник групи ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp.), характеризується природною стійкістю до широкого спектра протимікробних агентів. Небезпека *P. aeruginosa* ви-

значається унікальними характеристиками, серед яких генетична пластичність, що забезпечується регуляторними генами (геном клітини ~5–7 млн п.н.), прогресуюча резистентність до антимікробних препаратів (АМП) і здатність до прямого пошкодження тканин організму завдяки арсеналу патогенетичних факторів (адгезинів, ферментів, токсинів тощо) [1, 3].

Патогенність *P. aeruginosa* контролюється Quorum sensing (QS) системами LasI/LasR, RhlI/RhlR, PQS та IQS, які ієрархічно взаємопов'язані. Система Las позитивно регулює функціонування трьох інших систем, IQS активує систему PQS, остання впливає на Rhl-систему. Rhl-система негативно регулює PQS. Сигнальними молекулами (аутоіндукторами) у Las і Rhl системах є два ацил-гомосеринових лактони (АГЛ) – 3-оксо-додеканоїл-L-гомосерин лак-

тон (3-охо-С<sub>12</sub>-HSL) і *N*-бутаноїл-*L*-гомосерин лактон (С<sub>4</sub>-HSL), тоді як PQS-система використовує алкіл-4(1H)-хінолони (AQ), які включають дві молекули – 2-гептил-гідрокси-1H-хінолін-4-он (PQS) і його попередник 2-гептил-4(1H)-хінолон (HHQ). Інтегрована система QS (IQS) як аутоіндуктор використовує 2-(2-гідроксифеніл)-тіазол-4-карбальдегід [4, 5]. Системи QS *P. aeruginosa* відіграють ключову роль на всіх етапах розвитку інфекційного процесу, включаючи адгезію, колонізацію тканин організму людини, інвазію, розвиток запального процесу, а також в ухиленні збудника від імунного захисту та резистентності до антимікробних препаратів. Адгезія мікроорганізмів до тканин, їх колонізація та поширення бактерій по організму забезпечуються джгутиками (*swimming*-міграція) та пілями IV типу (*twitching*-міграція). Завдяки пілям і джгутикам *P. aeruginosa* переміщується у в'язкому середовищі (*swarming*-міграція) [6] та колонізує легені пацієнтів із муковісцидозом [7].

На етапах інвазії, розвитку запального процесу та при ухиленні збудника від імунного захисту важливу роль відіграють численні фактори вірулентності. У QS-системі Las-синтаза LasI активує рецептор LasR, який є регулятором експресії генів, асоційованих із формуванням біоплівки, продукцією LasA-протеази, LasB-еластази, Arg-алкалін-протеази, гемолізину та екзотоксину А. Подібним чином система Rhl через синтазу RhlI активує рецептор RhlR і продукцію LasB-еластази, піоціаніну, рамноліпідів, ціаніду водню (HCN), сидерофорів, а також регулює рухливість мікроорганізмів. Система PQS модулює експресію генів, що беруть участь у плівкоутворенні, рухливості, HCN, лектинів, рамноліпідів, піохеліну та піовердину. Також PQS забезпечує уникнення збудника від імунного захисту макроорганізму та індукує лізис нейтрофілів і макрофагів [3, 5, 8]. Продукція клітинами *P. aeruginosa* протеаз (еластази, лужної протеази), феназину (піоціаніну), токсинів (екзотоксину А), рамноліпідів та ціаністого водню призводить до деструкції клітин/тканин хазяїна через порушення проникного бар'єра та пригнічення синтезу білка.

З урахуванням ролі факторів вірулентності та регуляторних механізмів бактерій у розвитку інфекційного процесу, поширення стійких до антимікробних препаратів штамів мікроорганізмів останніми роками велика увага приділяється дослідженню лікарських засобів, які виявляють антивірулентні властивості. Саме вплив

на фактори вірулентності патогенів нині розглядається як один із перспективних напрямів лікування пацієнтів з інфекційними захворюваннями, спричиненими полірезистентними штамми мікроорганізмів, оскільки він може підвищити чутливість бактерій до АМП та ефективність антибіотикотерапії при інфекційних процесах [9–11].

У цьому плані на увагу заслуговують похідні адамантану, які характеризуються широким спектром біологічної активності та вже протягом тривалого часу застосовуються в клінічній практиці [12, 13]. Зокрема, є багато досліджень, які підтверджують, що адамантанвмісні сполуки виявляють виразну інгібуючу дію щодо метицилінрезистентного *S. aureus* (MRSA), *Propionibacterium acnes*, *Enterococcus faecalis* та грибів *Candida albicans* [12–15]. Похідні адамантану здатні підвищувати чутливість тестштамів до антимікробних препаратів [14]. Дані літератури щодо антивірулентних властивостей сполук, які містять адамантильний радикал, обмежені [16, 17].

Це спонукало нас зосередити увагу на дії похідного адамантану на QS-системи (Las, Rhl, PQS), які регулюють синтез факторів вірулентності *P. aeruginosa* і забезпечують адгезію, інвазію й утворення екзотоксинів.

*Метою нашої роботи* було встановлення антивірулентних властивостей похідного аміноадамантану 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил)бензолу щодо *P. aeruginosa*.

## Матеріали та методи

*Досліджувані речовини.* У дослідженні використано похідне аміноадамантану 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил)бензол (шифр АМ-166). Сполука АМ-166 синтезована на ПАТ НВК “Борщагівський ХФЗ” (Україна). Для проведення експериментів адамантанвмісну речовину розчиняли в 10 % диметилсульфоксиді, концентрація вихідного розчину становила 1 мг/мл.

*Мікроорганізми.* Експерименти проведені з використанням клінічного тест-штаму *P. aeruginosa* 449, виділеного від хворого гнійно-запальним процесом. Культура є резистентною до дії цефепіму; помірночутливою до дії цефтриаксону, цефотаксиму, меропенему; чутлива до азтреонаму, цефоперазону, ципрофлоксацину, гентаміцину й амікацину.

*Визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК).* МІК визначали методом серійних

мікророзведень у рідкому живильному середовищі згідно з [18].

**Утворення піоціаніну.** Синтез піоціаніну *P. aeruginosa* за впливу AM-166 здійснювали згідно з [19]. Концентрації сполуки становили: 0,15, 0,5 та 2,0 МІК. Експерименти проводили, використовуючи живильне середовище King A. Культуру ( $10^6$  КУО/мл) зі сполукою інкубували 24 год за 37 °С та центрифугували за 3000 об/хв упродовж 20 хв. До супернатанту додавали 3 мл хлороформу, ретельно перемішували та витримували протягом 10 хв за кімнатної температури. Шар із хлороформом (блакитного кольору) відбирали та додавали 1 мл 0,2 М НСІ. Реекстрагований шар із НСІ (червоного кольору) переносили в полістиролові планшети та вимірювали оптичну густину (OD) на Adsorbance Microplate Reader ELx800 (BioTek, США) за довжини хвилі 540 нм. Концентрацію піоціаніну (C) розраховували за формулою

$$C \text{ мг/л} = OD_{540} \times 17,072.$$

Густину інокуляту визначали у 5 мл 0,9 % розчину NaCl за довжини хвилі 600 нм. Для перерахування вмісту піоціаніну на кількість бактеріальних клітин застосовували співвідношення  $OD_{540}/OD_{600}$ .

**Гемолітична активність.** Вплив AM-166 на гемолітичну активність тест-штаму *P. aeruginosa* здійснювали згідно з [20]. Культури, вирощені впродовж 24 год (37 °С) на LB-агарі зі сполукою або без неї (контроль), доводили до оптичної густини  $OD_{630} = 0,4$  у LB-бульйоні та центрифугували (6000 об/хв, 5 хв). Отриманий супернатант змішували з еритроцитами ( $10^8$  клітин/мл) у співвідношенні 1:1 та інкубували впродовж 2 год за 37 °С. Нелізовані еритроцити осаджували за 4000 об/хв протягом 5 хв. Кількість вивільненого гемоглобіну в супернатанті оцінювали на Adsorbance Microplate Reader ELx800 (BioTek, США) за довжини хвилі 540 нм. Позитивним контролем слугували еритроцити, лізовані 0,1 % розчином натрію додецилсульфату (SDS).

**Протеазна активність.** Вплив похідного аміноадамтану на протеазну активність *P. aeruginosa* досліджували, використовуючи агар з 1,5 % казеїном [21]. Культуру бактерій вирощували в рідкому живильному середовищі TSB із додаванням досліджуваної сполуки в концентрації 0,15, 0,5 та 2,0 МІК або без неї (контроль). Тривалість інкубації – 18 год за 37 °С. Після закінчення терміну інкубації нічну культуру (50 мкл) вносили в лунки агару та інкубували

протягом 16–18 год за 37 °С. Для виявлення зон протеолізу в чашки вносили 5,0 мл 5 % розчину трихлороцтової кислоти та витримували 3 хв за кімнатної температури. Діаметри зон протеолізу вимірювали штангенциркулем із точністю не менше 1,0 мм на темній матовій поверхні.

**Рухливість бактерій.** Для встановлення здатності досліджуваної сполуки впливати на рухливість тест-штаму *P. aeruginosa* 16-годинну культуру інкубували зі сполукою AM-166 (0,5 та 2,0 МІК) протягом 30–45 хв за 37 °С. Дослідження здійснювали згідно з [22, 23].

**Swimming-міграція.** Здатність до *swimming*-міграції вивчали, використовуючи агаризоване середовище, що містило 1 % триптон, 0,5 % дріжджового екстракту, 0,5 % NaCl та 0,3 % агару. У чашки Петрі з агаризованим середовищем за допомогою проколу стерильною зубочисткою вносили суспензію клітин та інкубували протягом 16–20 год за кімнатної температури. Рухливість оцінювали за діаметром зони, утвореної бактеріями, які мігрували від точки інокуляції.

**Swarming-міграція.** *Swarming*-міграцію визначали на поверхні живильного середовища такого складу: 1 % триптон, 0,5 % дріжджовий екстракт, 0,5 % NaCl, 0,5 % агар, 1 М MgSO<sub>4</sub>, 0,5 % глюкози. Клітини бактерій вносили мікропіпеткою (2 мкл) у верхню частину напівтвердого агару, після чого інкубували протягом 16–24 год за 37 °С і вимірювали діаметри зон росту мікроорганізмів.

**Twitching-міграція.** *Twitching*-міграцію бактерій досліджували, використовуючи середовище, що містило 1 % триптон, 0,5 % дріжджового екстракту, 0,5 % NaCl та 1,0 % агару. Клітини синьогнійної палички вносили на дно чашки через шар агару. Після інкубації протягом 24–48 год за 37 °С спостерігали зону росту на межі між агаром і поверхнею скла. Здатність бактерій до *twitching*-рухливості на поверхні скла оцінювали шляхом фарбування прикріплених клітин *P. aeruginosa* розчином кристалічного фіолетового.

**Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).** Генномну ДНК екстрагували з 24-годинної культури клітин *P. aeruginosa* методом кип'ятіння [24]. Ампліфікацію генів *P. aeruginosa* проводили із використанням 2x ПЛР суміші (PCR-Mix M0207L, New England Biolabs). Кількість праймерів становила 5 пмоль. Екстраговану ДНК зі зразків додавали в кількості 5 мкл. Температурний режим ампліфікації встановлювали для кожної пари праймерів відповідно до табл. 1.

Таблиця 1: Праймери, використані в молекулярних дослідженнях

Праймери	Нуклеотидна послідовність (5'–3')	Посилання
<i>lasI</i> (Fw)	5'-CGCACATCTGGGAACCTCA-3'	[25]
<i>lasI</i> (Rv)	5'-CGGCACGGATCATCATCT-3'	
<i>lasR</i> (Fw)	5'-CTGTGGATGCTCAAGGACTAC-3'	[25]
<i>lasR</i> (Rv)	5'-AACTGGTCTTGCCGATGG-3'	
<i>rhlR</i> (Fw)	5'-GCCAGCGTCTTGTTCCGG-3'	[25]
<i>rhlR</i> (Rv)	5'-CGGTCTGCCTGAGCCATC-3'	
<i>pqsR</i> (Fw)	5'-CTGATCTGCCGGTAATTGG-3'	[25]
<i>pqsR</i> (Rv)	5'-ATCGACGAGGAACTGAAGA-3'	
<i>exoS</i> (Fw)	5'-GGCGGATGCGGAAAAGTAC-3'	[26]
<i>exoS</i> (Rv)	5'-CTGACGCAGAGCGCGATT-3'	
<i>toxA</i> (Fw)	5'-GGTAACCAGCTCAGCCACAT-3'	[27]
<i>toxA</i> (Rv)	5'-TGATGTCCAGGTCATGCTTC-3'	
<i>exoA</i> (Fw)	5'-GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC-3'	[28]
<i>exoA</i> (Rv)	5'-CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT-3'	
<i>aprA</i> (Fw)	5'-GCTTCAGCCAGAACCAGAAGAT-3'	[29]
<i>aprA</i> (Rv)	5'-TCGACACATTGCCCTTCAAC-3'	
<i>rpsL</i> (Fw)	5'-GCAACTATCAACCGACTGGTG-3'	[30]
<i>rpsL</i> (Rv)	5'-GCTGTGCTCTTGCAGGTTGTG-3'	
<i>rpoS</i> (Fw)	5'-CTCCCCGGGCAACTCCAAAAG-3'	[31]
<i>rpoS</i> (Rv)	5'-CGATCATCCGCTTCCGACCAG-3'	
<i>16S pPHK</i> (Fw)	5'-CTGTCGTCAGCTCGTGTGTGT-3'	[32]
<i>16S pPHK</i> (Rv)	5'-TTCATGGAGTCGAGTTGCAG-3'	

Примітки. Fw – прямий праймер; Rv – зворотний праймер.

Дослідження проводили в ампліфікаторі 2720 (Applied Biosystems). Розділення продуктів ампліфікації здійснювали в 1,2 % агарозному гелі.

**Кількісна ПЛР у реальному часі (qRT-PCR).** Загальну РНК виділяли з 24-годинної суспензії клітин *P. aeruginosa*, культивованих зі сполукою AM-166 (0,5 МІК) або без сполуки за допомогою Direct-zol™ RNA Miniprep Plus (Zymo Research). Реакційна суміш для qRT-PCR містила 10 мкл Luna Universal One-Step Reaction Mix (2X), 1 мкл Luna\_WarmStart® RT Enzyme Mix, 10 пмоль кожного праймера (прямого та зворотного) (див. табл. 1) та 5 мкл РНК бактерії. Ампліфікацію проводили за допомогою CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, Німеччина). Експресію гена 16S рРНК, *rpsL* або *rpoS* розглядали як внутрішній контроль. Відносний рівень експресії генів розраховували за  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -методом [33].

**Статистична обробка результатів.** Для оцінки результатів досліджень використовували метод ANOVA і непараметричний метод Краскела–Уолліса. Рівні експресії генів до та після

впливу сполуки порівнювали за допомогою парного *t*-тесту. *p*-значення менше 0,05 ( $p < 0,05$ ) вважалося значущим. Для аналізу даних використовували програму STATISTICA, версія 10 (StatSoft, США). Усі експерименти проводили не менш ніж у 3 повторах.

## Результати

Отримані дані щодо чутливості тест-штаму *P. aeruginosa* 449 до похідного адамантану свідчать, що МІК сполуки AM-166 становить 100 мкг/мл.

Вплив похідного адамантану на фактори вірулентності синьогнійної палички оцінено за продукцією піоціаніну, протеазною активністю, гемолітичною активністю, рухливістю бактерій та експресією генів за його дії.

**Детекція й експресія генів.** Проведені дослідження щодо детекції генів показали (рис. 1 а–в), що у тест-штаму *P. aeruginosa* 449 наявні гени: *lasI*, *lasR*, що регулюють функціонування Las-системи QS, *rhlR* – системи Rhl, *pqsR* – PQS-системи.

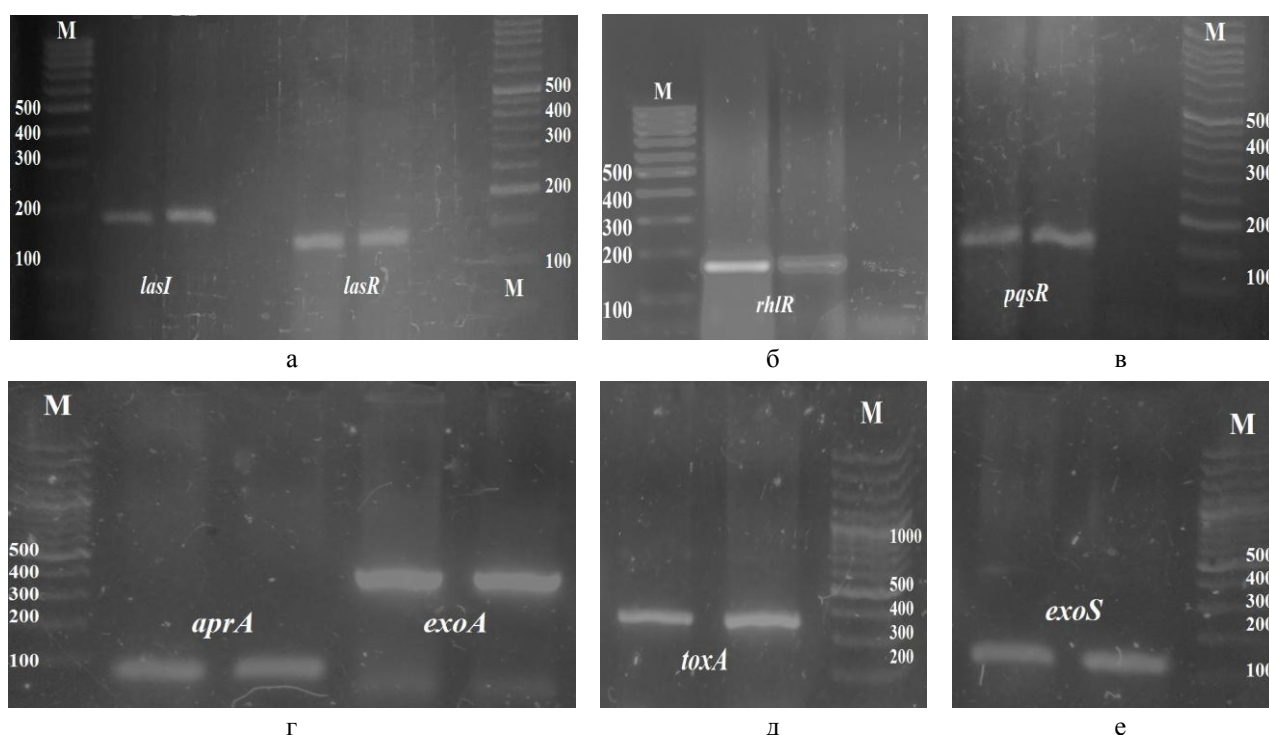
Згідно з отриманими даними (рис. 1 г–е), у клінічного ізоляту *P. aeruginosa* 449 наявні гени *aprA*, *exoA*, *toxA* та *exoS*.

Вплив АМ-166 на транскрипційну активність генів вивчали в субінгібуючій концентрації (0,5 МІК). Встановлено, що сполука АМ-166 впливає на Las-, Rhl- та PQS-системи QS *P. aeruginosa* 449 (рис. 2). За її дії відзначено зниження транскрипційної активності гена *lasI* у 3,2 разу, гена *lasR* – у 5,5 разу порівняно з контролем. Похідне адамантану АМ-166 знижує

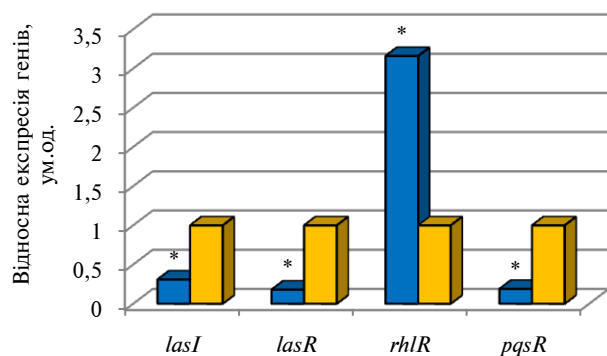
у 5,4 разу експресію гена *pqsR*, що регулює функціонування PQS-системи, експресія гена *rhlR* збільшується в 3,1 разу порівняно з контролем.

Згідно з результатами проведених експериментів (рис. 3), похідне адамантану знижує експресію гена *aprA* (у 2,5 разу), який регулює синтез лужної фосфатази у *P. aeruginosa*.

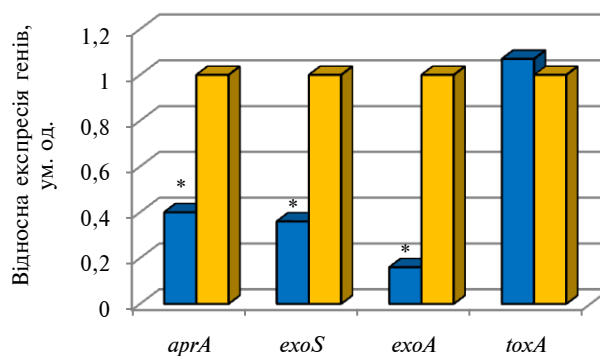
За дії АМ-166 відзначено зменшення експресії генів *exoA* і *exoS* у 6,3 і 2,8 разу відповідно. Згідно з отриманими даними, сполука АМ-166 не змінює транскрипційну активність



**Рисунок 1:** Електрофореграма продуктів ампліфікації з праймерами до генів: (а) *lasI* (176 п.н.), *lasR* (133 п.н.); (б) *rhlR* (160 п.н.); (в) *pqsR* (142 п.н.); (г) *aprA* (78 п.н.), *exoA* (397 п.н.); (д) *toxA* (352 п.н.); (е) *exoS* (121 п.н.); М – ДНК-маркер молекулярних мас



**Рисунок 2:** Відносна експресія QS-асоційованих генів ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) у *P. aeruginosa* 449 за дії сполуки АМ-166; ■ – АМ-166; ■ – контроль; \* – відмінності статистично достовірні порівняно з контролем ( $p < 0,05$ )



**Рисунок 3:** Відносна експресія генів, асоційованих із факторами вірулентності *P. aeruginosa* ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) за дії сполуки АМ-166; ■ – АМ-166; ■ – контроль; \* – відмінності статистично достовірні порівняно з контролем ( $p < 0,05$ )

гена *toxA*, його експресія не відрізняється від такої контролю.

**Синтез піоціаніну.** Отримані результати свідчать (рис. 4), що адамантанвмісна сполука АМ-166 у субінгібуючих концентраціях збільшує продукцію піоціаніну штамом *P. aeruginosa* 449: за 0,15 МІК – на 17,1 %, за 0,5 МІК – на 48,6 % і за 2,0 МІК – на 54,0 % порівняно з контролем (у контролі значення вважалось за 100 %).

**Протеазна активність.** Досліджувана сполука не впливає на протеазну активність використаного штаму синьогнійної палички, зміни діаметрів зон протеолізу відсутні (порівняно з контролем,  $p > 0,05$ ).

**Гемолітична активність.** Отримані дані свідчать (див. рис. 4), що адамантанвмісна сполука АМ-166 виразно пригнічує гемолітичну активність *P. aeruginosa* 449, пов'язану з позаклітинними гемолізінами. За її дії у концентрації 0,15 МІК продукція гемолізинів пригнічується на 82,0 %, за 0,5 МІК – на 50,1 %, за 2,0 МІК – на 51,5 % (порівняно з контролем).

**Рухливість бактерій.** Проведені дослідження показали, що рухливість клітин залежить від

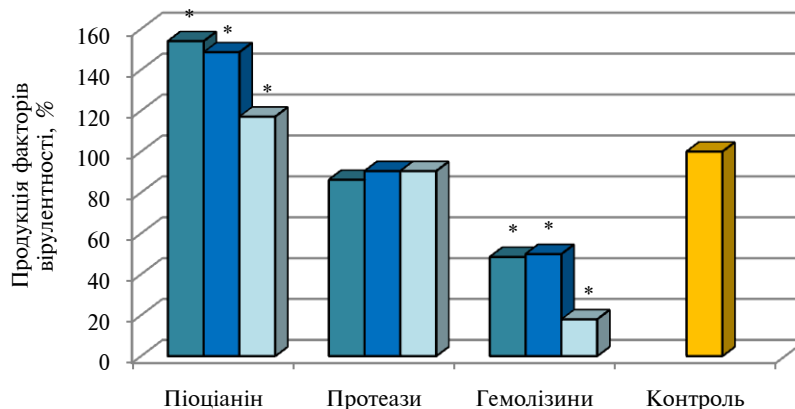
наявності джгутиків (*swimming*), пілей IV типу (*twitching*), а також їх сумісного впливу (*swarming*): діаметри відповідних зон рухливості в контролі становили 7,0, 9,0 і 10,7 мм (табл. 2).

Експериментально встановлено (табл. 2), що за дії похідного адамантану АМ-166 у субінгібуючій концентрації 0,5 МІК рухливість синьогнійної палички за типом “*swimming*” зменшується в 1,7 разу, “*swarming*” – в 1,4 разу, “*twitching*” – в 1,2 разу порівняно з контролем. Виявлені зміни у *twitching*-міграції *P. aeruginosa* статистично не достовірні ( $p > 0,05$ ).

Сполука АМ-166 у концентрації 2,0 МІК повністю пригнічує *swimming*-, *twitching*- і *swarming*-рухливість *P. aeruginosa*.

Вплив сполуки АМ-166 на експресію генів, що регулюють синтез факторів вірулентності *P. aeruginosa*, відображено на схемі (рис. 5).

Таким чином, адамантанвмісна сполука 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил)бензол здатна порушувати функцію систем QS, впливати на патогенність синьогнійної палички, про що свідчать експресія генів і синтез QS-асоційованих факторів вірулентності.



**Рисунок 4:** Продукція позаклітинних факторів вірулентності *P. aeruginosa* за дії АМ-166; \* – відмінності статистично достовірні порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ): ■ – 2,0 МІК, ■ – 0,5 МІК, ■ – 0,15 МІК (МІК – мінімальна інгібуюча концентрація)

**Таблиця 2:** Вплив сполуки АМ-166 на рухливість *P. aeruginosa*

Умови експерименту	Зони рухливості мікроорганізмів, мм		
	<i>Swimming</i>	<i>Twitching</i>	<i>Swarming</i>
АМ-166, 0,5 МІК	4,10 ± 0,24*	7,50 ± 0,76	7,50 ± 0,41*
АМ-166, 2,0 МІК	0	0	0
Контроль	7,0 ± 0,05	9,0 ± 0,90	10,7 ± 0,40

**Примітки.** 0 – зони відсутні; \* – відмінності статистично достовірні порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ); МІК – мінімальна інгібуюча концентрація.



Хср (T2SS) [36], чинить як місцевий, так і системний вплив, транспортуючись через кров з інфекційного локусу. Екзотоксин А найбільш активно вражає легеневу тканину, паренхіму печінки, нирок, призводячи до некрозів, крововиливів і формування гострої чи хронічної дисфункції уражених органів тощо.

В експериментах виявлено збільшення за дії похідного адамантану експресії гена *rhIR* системи RhlI/RhlR, що може реалізуватись активацією синтезу рамноліпідів, необхідного для диференціювання клітин біоплівки, формування каналів й архітектури біоплівки, активацією однієї із 5 систем екскреції ендотоксинів – T2SS. Оскільки за дії АМ-166 спостерігається пригнічення синтезу позаклітинних і клітинно-асоційованих гемолізинів, регуляція яких здійснюється Rhl-системою, то механізм антисиньогнійної активності сполуки може бути пов'язаний із впливом на всі три системи QS: Las, Rhl і PQS. З урахуванням того, що Las-система впливає на IQS, IQS – на PQS-систему, а PQS – на Rhl, то не виключений прямий чи опосередкований вплив адамантанвмісної сполуки і на четверту систему QS *P. aeruginosa* – IQS, що потребує подальших досліджень із відповідним аутоіндуктором.

Про можливий вплив АМ-166 на різні ланки QS свідчить підвищення продукції піоціаніну *P. aeruginosa* за його впливу. Отримані дані узгоджуються з дослідженнями К. Zhu *et al.* [37], які спостерігали накопичення піоціаніну в штамів *P. aeruginosa* за дії субінгібуючих концентрацій антибіотиків різних груп (канаміцину, хлорамфеніколу, норфлуксацину, карбеніциліну та поліміксину В). Ефект препаратів пов'язують із відповіддю мікроорганізмів на стресовий чинник або з впливом на систему QS. Згідно з [38], зменшення вмісту піоціаніну за дії екзогенного 3-оксо-С<sub>12</sub>-АГЛ спричинено саме негативним впливом на Rhl-ланку QS, що регулює утворення пігменту.

У дослідженні виявлено вплив сполуки АМ-166 на PQS-систему, яка регулює експресію генів *lecA* (синтез лектинів), *exoUTS* (синтез екзоферментів) та впливає на ген *rhIAB* (синтез рамноліпідів), як і система LasI/LasR. За дії сполуки спостерігається зниження експресії генів *pqsR* (у 5,4 разу) та *exoS* (у 2,8 разу). Отримані результати є дуже важливими, оскільки похідне адамантану не тільки не стимулює синтез екзотоксинів, але й здатне пригнічувати синтез токсичних продуктів синьогнійної палички, зокрема екзотоксину S. Ток-

син ExoS є “контактним” екзотоксином, використовує III тип секретії – “макромолекулярний шприц” для вивільнення [39], потрапляє безпосередньо в цитоплазму клітини, до якої адгезований мікроорганізм. Це призводить до пошкодження конкретної клітини, проте унеможливорює вплив “токсинів III типу” на інші клітини господаря, які не контактують із патогеном. Токсин ExoS має властивості ГТФ-активуючого протеїну й АДФ-рибозилтрансферази, які в синергізмі обумовлюють перебудову актину в цитоскелеті клітини господаря, що призводить до її загибелі. Механізм контактної інтоксикації дає синьогнійній паличці змогу протидіяти впливу імунної системи, оскільки контактні токсини не надходять у позаклітинне середовище й не можуть бути нейтралізовані антитілами.

QoS-система *P. aeruginosa* регулює рухливість і адгезію мікроорганізмів до тканини, що реалізуються декількома органелами, зокрема піями IV типу, джгутіками й експресованими численними CupA (chaperone-usheer pathway) [40, 41]. Блокада цих компонентів призводить до порушення адгезії, знижує здатність мікробної клітини до інвазії. За дії сполуки АМ-166 спостерігається порушення рухливості клітин бактерій, механізм цього ефекту ще не встановлено. Зазначений ефект може бути наслідком впливу на регуляторні гени (*aefA*, *ampR*), сигнальну молекулу c-di-GMP, QS, які прямо чи опосередковано впливають на міграцію та плівкоутворення *P. aeruginosa* [1, 41–43].

## Висновки

Проведені дослідження показали, що похідне адамантану 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил)бензол чинить як пригнічуючий, так і активуючий ефект на системи Quorum sensing *P. aeruginosa*. За його впливу змінюється функціонування систем LasI/LasR-, PQS- та RhlI/RhlR, про що свідчить пригнічення транскрипційної активності генів *lasI*, *lasR*, *aprA*, *exoA* (системи Las), генів *pqsR*, *exoS* (PQS) та підвищення експресії гена *rhIR* (Rhl). Зміна експресії генів реалізується пригніченням факторів вірулентності *P. aeruginosa* – лужної протеази, екзотоксину А та екзоферменту S. Дія похідного адамантану на вірулентність синьогнійної палички супроводжується також впливом на рухливість, гемолітичну активність і продукцію піоціаніну. Незважаючи на отримані дані щодо впливу адамантанвмісної сполуки на



QS-системи та вірулентність синьогнійної палички, необхідним є проведення подальших поглиблених досліджень для з'ясування її впливу на c-di-GMP з урахуванням важливості цієї молекули у формуванні та поширенні біоплівки.

### Фінансування

Дослідження виконано за фінансової підтримки НАМН України в рамках науково-дослідної роботи Державної установи “Інститут

фармакології та токсикології НАМН України” “Вивчення особливостей формування біоплівок *Pseudomonas aeruginosa* та *Quorum Sensing* регуляції за дії похідних адамантану” (№ державної реєстрації 0121U109291).

### Розкриття інтересів

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

### References

- [1] Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Feb 15; 7:39. DOI:10.3389/fcimb.2017.00039
- [2] Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc*. 2018 Jan;81(1):7-11. DOI: 10.1016/j.jcma.2017.07.012
- [3] Liao C, Huang X, Wang Q, Yao D, Lu W. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and antivirulence strategies to combat its drug resistance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jul 6;12:926758. DOI: 10.3389/fcimb.2022.926758
- [4] Jurado-Martín I, Sainz-Mejias M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 18;22(6):3128. DOI: 10.3390/ijms22063128
- [5] Santajit S, Sookrung N, Indrawattana N. Quorum Sensing in ESKAPE Bugs: A target for combating antimicrobial resistance and bacterial virulence. *Biology (Basel)*. 2022 Oct 6;11(10):1466. DOI: 10.3390/biology11101466
- [6] Madukoma CS, Liang P, Dimkovikj A, Chen J, Lee SW, Chen DZ, et al. Single cells exhibit differing behavioral phases during early stages of *Pseudomonas aeruginosa* swarming. *J Bacteriol*. 2019 Sep 6;201(19):e00184-19. DOI: 10.1128/JB.00184-19
- [7] Coleman SR, Blimkie T, Falsafi R, Hancock REW. Multidrug adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* swarming cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020 Feb 21;64(3):e01999-19. DOI: 10.1128/AAC.01999-19
- [8] Chadha J, Harjai K, Chhibber S. Revisiting the virulence hallmarks of *Pseudomonas aeruginosa*: a chronicle through the perspective of quorum sensing. *Environ Microbiol*. 2022 Jun; 24(6):2630-56. DOI: 10.1111/1462-2920.15784
- [9] Sintchenko V, Timms V, Sim E, Rockett R, Bachmann N, O'Sullivan M, et al. Microbial genomics as a catalyst for targeted antivirulence therapeutics. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Apr 13;8:641260. DOI: 10.3389/fmed.2021.641260
- [10] D'Angelo F, Baldelli V, Halliday N, Pantalone P, Polticelli F, Fiscarelli E, et al. Identification of FDA-approved drugs as antivirulence agents targeting the pqs quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Oct 24;62:e01296-18. DOI: 10.1128/AAC.01296-18
- [11] Imperi F, Chen W, Smani Y. Editorial: Antivirulence drugs against bacterial infections. *Front. Microbiol*. 2021 May 25;12:690672. DOI: 10.3389/fmicb.2021.690672
- [12] Spilovska K, Zemek F, Korabecny J, Nepovimova E, Soukup O, Windisch M, et al. Adamantane - A lead structure for drugs in clinical practice. *Curr Med Chem*. 2016;23(29):3245-66. DOI: 10.2174/0929867323666160525114026
- [13] Rusu A, Tanase C, Pascu GA, Todoran N. Recent advances regarding the therapeutic potential of adapalene. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020 Aug 28;13(9):217. DOI: 10.3390/ph13090217
- [14] Cheng AV, Kim W, Escobar IE, Mylonakis E, Wuest WM. Structure-activity relationship and anticancer profile of second-generation anti-MRSA synthetic retinoids. *ACS Med Chem Lett*. 2019 Jul 17;11(3):393-7. DOI: 10.1021/acsmchemlett.9b00159
- [15] Tan F, She P, Zhou L, Liu Y, Chen L, Luo Z, et al. Bactericidal and anti-biofilm activity of the retinoid compound CD437 against *Enterococcus faecalis*. *Front Microbiol*. 2019 Oct 9;10:2301. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02301
- [16] Trognon J, Vera G, Rima M, Stigliani JL, Amielet L, El Hage S, et al. Investigation of direct and retro chromone-2-carboxamides based analogs of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing signal as new anti-biofilm agents. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 Mar 29;15(4):417. DOI: 10.3390/ph15040417
- [17] Emam A, Carter WG, Lingwood C. Glycolipid-dependent, protease sensitive internalization of *Pseudomonas aeruginosa* into cultured human respiratory epithelial cells. *Open Microbiol J*. 2010 Dec 13;4:106-15. DOI: 10.2174/1874285801004010106
- [18] International Standards Organization. ISO 20776-1:2019. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. Geneva: ISO; 2019.

- [19] Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford IP. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol.* 1990 Feb;172(2):884-900. DOI: 10.1128/jb.172.2.884-900.1990
- [20] Lankisch PG, Vogt W. Direct haemolytic activity of phospholipase A. *Biochim Biophys Acta.* 1972 Jun 19;270(2):241-7. DOI: 10.1016/0005-2760(72)90235-4
- [21] Montville TJ. Dual-substrate plate diffusion assay for proteases. *Appl Environ Microbiol.* 1983 Jan;45(1):200-4. DOI: 10.1128/aem.45.1.200-204.1983
- [22] Fonseca AP, Sousa JC. Effect of antibiotic-induced morphological changes on surface properties, motility and adhesion of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strains under different physiological states. *J Appl Microbiol.* 2007 Nov;103(5):1828-37. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03422.x
- [23] Kinscherf TG, Willis DK. Swarming by *Pseudomonas syringae* B728a requires gacS (lemA) and gacA but not the acyl-homoserine lactone biosynthetic gene ahlI. *J Bacteriol.* 1999 Jul;181(13):4133-6. DOI: 10.1128/JB.181.13.4133-4136.1999
- [24] Dashti AA, Jadaon MM, Abdulsamad AM, Dashti HM. Heat treatment of bacteria: A simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Med. J.* 2009 Jun;41:117-22.
- [25] El-Mowafy SA, Abd El Galil KH, El-Messery SM, Shaaban MI. Aspirin is an efficient inhibitor of quorum sensing, virulence and toxins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog.* 2014 Sep;74:25-32. DOI: 10.1016/j.micpath.2014.07.008.
- [26] Joly B, Pierre M, Auvin S, Colin F, Gottrand F, Guery B, et al. Relative expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes analyzed by a real time RT-PCR method during lung infection in rats. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Feb 1;243(1):271-8. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.12.012
- [27] Khattab MA, Nour MS, Sheshtawy NM. Genetic identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes among different isolates. *J Microb Biochem Technol.* 2015 Jan;7(5):274-7. DOI:10.4172/1948-5948.1000224
- [28] Ghanbarzadeh Corehtash Z, Khorshidi A, Firoozeh F, Akbari H, Mahmoudi Aznavah A. Biofilm formation and virulence factors among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Jundishapur J Microbiol.* 2015 Oct 21;8(10):e22345. DOI: 10.5812/jjm.22345
- [29] Lenz AP, Williamson KS, Pitts B, Stewart PS, Franklin MJ. Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2008 Jul;74(14):4463-71. DOI: 10.1128/AEM.00710-08
- [30] Shigemura K, Osawa K, Kato A, Tokimatsu I, Arakawa S, Shirakawa T, et al. Association of overexpression of efflux pump genes with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains clinically isolated from urinary tract infection patients. *J Antibiot (Tokyo).* 2015 Sep;68(9):568-72. DOI: 10.1038/ja.2015.34
- [31] Birmes FS, Spring R, Hauke MC, Ritzmann NH, Drees SL, Daniel J, et al. Interference with *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and virulence by the mycobacterial *Pseudomonas* quinolone signal dioxygenase AqC in combination with the N-Acylhomoserine lactone lactonase QsdA. *Infect Immun.* 2019 Sep 19;87(10):e00278-19. DOI: 10.1128/IAI.00278-19
- [32] Zelena L, Gretskey I, Gromozova E. Influence of ultrahigh frequency irradiation on *Photobacterium phosphoreum* luxB gene expression. *Cent Eur J Biol.* 2014 Aug;9(10):1004-10. DOI: 10.2478/s11535-014-0347-5
- [33] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- [34] Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell.* 2015 Jan;6(1):26-41. DOI: 10.1007/s13238-014-0100-x
- [35] Smith RS, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *J Clin Invest.* 2003 Nov;112(10):1460-5. DOI: 10.1172/JCI20364
- [36] Michalska M, Wolf P. *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Front Microbiol.* 2015 Sep 15;6:963. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00963
- [37] Zhu K, Sysoeva TA. Universal antibiotic tolerance arising from antibiotic-triggered accumulation of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Biol.* 2019 Dec;17(12):e3000573. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000573
- [38] Galkin MB, Ivanytsia VO. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin biosynthesis in presence of porphyrines bismuth complexes and quorum sensing autoinducers. *Microbiol Biotechnol.* 2013;1(21):23-36. DOI: 10.18524/2307-4663.2013.1(21).48720
- [39] Horna G, Ruiz J. Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res.* 2021 May;246:126719. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126719
- [40] Francis VI, Stevenson EC, Porter SL. Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 2017 June;364(11):fnx104. DOI: 10.1093/femsle/fnx104
- [41] Guo Q, Kong W, Jin S, Chen L, Xu Y, Duan K. PqsR-dependent and PqsR-independent regulation of motility and biofilm formation by PQS in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Basic Microbiol.* 2014 Jul;54(7):633-43. DOI: 10.1002/jobm.201300091

- [42] Li Y, Bai F, Xia H, Zhuang L, Xu H, Jin Y, et al. A novel regulator PA5022 (*aefA*) is involved in swimming motility, biofilm formation and elastase activity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res*. 2015 Jul;176:14-20. DOI: 10.1016/j.micres.2015.04.001
- [43] Khan F, Pham DTN, Oloketuyi SF, Kim YM. Regulation and controlling the motility properties of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020 Jan;104(1):33-49. DOI: 10.1007/s00253-019-10201-w

N.I. Humeniuk<sup>1</sup>, N.O. Vrynchanu<sup>1</sup>, L.B. Zelena<sup>2</sup>, L.M. Ishchenko<sup>3</sup>, T.A. Bukhtiarova<sup>1</sup>, E.M. Vazhnichaya<sup>4</sup>, I.O. Boiko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Institution "Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>3</sup>Ukrainian Laboratory of Quality and Safety of Agricultural Products of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>4</sup>Poltava State Medical University, Poltava, Ukraine

#### ANTIVIRULENT PROPERTIES OF THE ADAMANTANE DERIVATIVE 4-(ADAMANTHYL-1)-1-(1-AMINOBTYL) BENZENE AGAINST *Pseudomonas aeruginosa*

**Background.** *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen characterized by a high level of virulence and classified as a microorganism with a critical priority for the development of new antimicrobial drugs. Targeting virulence factors is one of the promising approaches in antimicrobial drug development.

**Objective.** Investigating the antivirulence properties of the aminoadamantane derivative 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl)benzene against *P. aeruginosa*.

**Methods.** The minimum inhibitory concentration (MIC) of 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl)benzene (code AM-166) against the clinical strain *P. aeruginosa* 449 was determined using the serial microdilution method. We conducted quantitative real-time PCR to assess the impact of AM-166 on gene expression. Additionally, we investigated the synthesis of pyocyanin, hemolytic and protease activity, as well as motility of *P. aeruginosa* under the influence of AM-166.

**Results.** The obtained data indicate that the MIC of the AM-166 compound is 100 µg/ml. When exposed to AM-166 (at 0.5 MIC), we observed a decrease in the transcriptional activity of the *lasI*, *lasR*, *pqsR*, *aprA*, *exoA*, and *exoS* genes, along with an increase in the expression of the *rhlR* gene. Notably, AM-166 did not alter the expression of the *toxA* gene. Furthermore, AM-166 increased the production of pyocyanin, had no significant effect on protease activity, and inhibited both hemolytic activity and motility in *P. aeruginosa* 449.

**Conclusions.** The adamantane derivative AM-166 disrupts the functioning of the Quorum sensing systems and pathogenicity of *P. aeruginosa* while also altering the expression of genes that regulate the synthesis of virulence factors.

**Keywords:** adamantane derivative; *Pseudomonas aeruginosa*; gene expression; Quorum sensing; virulence factors.