УДК 547.233:615.281:579.262.9: 576.54:579.25 https://doi.org/10.33250/17.01.044

Н. І. Гуменюк[1], Н. О. Вринчану[1], Л. М. Іщенко[2]

Вплив похідного адамантану на експресію генів плівкоутворення *P. Aeruginosa*

[1]Державна установа «Інститут фармакології та токсикології Національної академії медичних наук України», м. Київ

[2]Українська лабораторія якості та безпеки продукції агропромислового комплексу при Національному університеті біоресурсів і природокористування України, м. Київ

Ключові слова: похідне адамантану, плівкоутворення, Pseudomonas aeruginosa, експресія генів

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) – грамнегативний ґрунтовий мікроорганізм, який адаптувався до виживання в різних екологічних секторах, спричиняючи захворювання рослин, тварин і людини. Синьогнійна паличка практично не колонізує неушкоджені тканини, але становить загрозу для пацієнтів з імунодефіцитом, викликаючи інфекцію сечовивідних шляхів, дихальної системи, шкіри та м'яких тканин, кісток і суглобів, шлунково-кишкового тракту, крові, особливо в пацієнтів з опіками, туберкульозом, СНІДом та онкохворих [1, 2]. Летальність від ускладнень, спричинених *P. aeruginosa*, в онкохворих, пацієнтів з муковісцидозом та опіками сягає 70 % [2].

Синьогнійна паличка існує як планктонна культура та в асоційованих на поверхні спільнотах – біоплівках, що утворюються на різноманітних абіотичних і біотичних субстратах. Клітини бактерій у складі біоплівки захищені від впливу імунної системи й менш сприйнятливі до дії антимікробних засобів, оскільки вкриті позаклітинним матриксом, складовими якого є екзополісахариди, позаклітинна ДНК, нуклеїнові кислоти білок тощо. Розвиток біоплівки – послідовний процес, який ініціюється прикріпленням планктонних клітин до поверхні та супроводжується утворенням мікроколоній, формуванням і дозріванням біоплівки.

Важливу роль в адгезії та формуванні біоплівок у немукоїдних штамів *P. aeruginosa* відіграють полісахариди Psl і Pel, у мукоїдних штамів – альгінат [3–5]. Полісахарид Psl складається з пентамера, що містить d-маннозу, l-рамнозу та d-глюкозу, утворюючи тканиноподібний матрикс, який з'єднує клітини біоплівки. Внаслідок надмірної продукції Psl-полісахариду підсилюється міжклітинна адгезія *P. aeruginosa* та адгезія до субстрату, що є критичним для ініціювання та підтримки структури біоплівки.

Полісахарид Pel, катіонний екзополісахарид, утворений 1,4-глікозамідними зв'язками аміноцукрів N-ацетилгалактозаміну та N-ацетилглюкозаміну, відіграє важливу роль у структурі біоплівок, утворених штамами, які не містять Psl. Pel є продуктом гена локусу *pelABCDEFG* [4], який у разі взаємодії з еДНК мікроколоній біоплівки сприяє її стабільності.

P. aeruginosa здатна синтезувати високомолекулярний ацетильований полісахарид, що складається з уронових кислот (мануронової та гіалуронової кислот) – альгінат [6]. Співвідношення між мануроновою та гіалуроновою кислотами впливає на в'яз-

© Колектив авторів, 2023

кість альгінату, що є важливим для пацієнтів з муковісцидозом.

Утворення полісахаридних компонентів біоплівки є складним процесом і контролюється багатьма регуляторними шляхами [4, 7, 8]. Встановлено, що опосередкована AlgC регуляція метаболізму координує загальну кількість екзополісахаридів у *P. aeruginosa* шляхом контролю пулу попередників цукру для їхнього синтезу [7]. У регуляції експресії *pel* і *psl* беруть участь FleQ (пригнічує транскрипцію оперонів *pel* і *psl*), внутрішньоклітинні сигнальні молекули c-di-GMP і RpoS, системи QS [8], а також система Gac-Rsm [9].

Складні регуляторні мережі плівкоутворення *P. aeruginosa*, багаточисельні фактори вірулентності та стійкість до дії антимікробних засобів потребують розробки препаратів, здатних порушувати синтез факторів вірулентності, зокрема й формування біоплівок, що підвищить ефективність антимікробної терапії.

Мета дослідження – вивчити експресію генів, що регулюють формування біоплівки *P. aeruginosa* за дії похідного адамантану.

Матеріали та методи. У дослідженнях використана сполука 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил)бензол (шифр АМ-166), яка синтезована на ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ». Розчинником був 10 % диметилсульфоксид, концентрація вихідного розчину – 1 мг/мл.

У дослідженнях використано клінічний тест-штам *P. aeruginosa* 449, резистентний до дії цефепіму; помірночутливий до цефтриаксону, цефотаксиму, меропенему; чутливий до азтреонаму, цефоперазону, ципрофлоксацину, гентаміцину та амікацину.

Вплив АМ-166 на біоплівки *P. aeruginosa* оцінювали згідно з [10]. Для приготування інокуляту нічну культуру розводили у TSB у 100 разів (1:100). Інкубаційний період зі сполукою становив 24 год за 37 °С. Біомасу біоплівки фарбували 0,1 % розчином генціанвіолету протягом 10–15 хв з наступним екстрагуванням барвника етанолом (15 хв). Вимірювання оптичної густини проводили на «Adsorbance Microplate Reader ELx × 800» (VioTek, США) за довжини хвилі 630 нм.

Детекцію генів *algL, pslA, pelA, algD, algR, algU, mucA P. aeruginosa* проводили за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для ампліфікації ДНК бактерій використовували реакційну суміш, яка містила буфер для ПЛР (2,5 мкл), dNTP (0,25 мкл), 10 пмоль кожного праймера, $MgCl_2$ (2,5 mM), воду, яка є вільною від нуклеаз, з розрахунку 19,75 мкл ПЛР-суміші та 0,25 мкл розчину Taq ДНК-полімерази. Приготовану суміш ретельно перемішували на центрифузі-вортекс, вносили в пробірки для ПЛР по 20 мкл і додавали по 5 мкл досліджуваних зразків ДНК.

Температурний профіль ампліфікації був специфічним для кожної пари праймерів [11–16]. Постановка ПЛР супроводжувалася негативним контролем (ПЛР-суміш без матриці). Послідовності праймерів зазначено в таблиці.

Розділення продуктів ампліфікації проводили в 1,2 % агарозному гелі.

Вплив похідного адамантану в концентрації 0,5 МІК на експресію генів *algL, pslA, pelA, algD, algR, algU, mucA* досліджували за допомогою ПЛР у реальному часі.

Сумарну РНК виділяли з суспензії клітин добової культури з використанням TRIzol Reagent (Invitrogen) з подальшою обробкою ДНКазою I («Fermentas», Литва). Концентрацію РНК визначали на спектрофотометрі DS-11 FX+ (DeNovix, США). Ампліфікацію генів

Таблиця

Олігонуклеотиди, що використані в молекулярних дослідженнях

Праймер	Послідовність, 5'–3'	Посилання
algD (Fw) *algD* (Rv)	5'-GCTCAACCTGTCGCGCTACT-3 5'-GAACTCGCCACCACTTCGTC-3'	[11]
algR (Fw) *algR* (Rv)	5'-GAAGAAGCGCTGACGCTGAT-3' 5'-ATGGCGCAAGGTCACGTACT-3'	[11]
algU (Fw) *algU* (Rv)	5'-GATTGATCGTGCGGTTCGTG-3' 5'-AAGATCCGCGACCGTACCGT-3'	[11]
algL (Fw) *algL* (Rv)	5'-CCGCTCGCAGATCAAGGACATC-3' 5'-TCGCTCACCGCCCAGTCG-3'	[12]
pslA (Fw) *pslA* (Rv)	5'-TCCCTACCTCAGCAGCAAGCTGGT-3' 5'-CGGATGTCGTGGTTGCGTACCAGGTAT-3'	[13]
pelA (Fw) *pelA* (Rv)	5'-CCTTCAGCCATCCGTTCTTCT-3' 5'-TCGCGTACGAAGTCGACCTT-3'	[14]
mucA (Fw) *mucA* (Rv)	5'-CTCTGCAGCCTTTGTTGCGAGAAGC-3' 5'-CTGCCAAGCAAAAGCAACAGGGAGG-3'	[15]
rpsL (Fw) *rpsL* (Rv)	5'-GCAACTATCAACCGACTGGTG-3' 5'-GCTGTGCTCTTGCAGGTTGTG-3'	[16]
rpoS (Fw) *rpoS* (Rv)	5'-CTCCCCGGGCAACTCCAAAAG-3' 5'-CGATCATCCGCTTCCGACCAG-3'	[17]
16S pPHK (Fw) *16S pPHK* (Rv)	5'-CTGTCGTCAGCTCGTGTTGT 5'-TTCATGGAGTCGAGTTGCAG	[18]

Примітка. «Fw» – forward; «Rv» – reverse.

проводили за допомогою набору Luna Universal One-Step Reaction Mix (2x) або PowerUp™ SYBR™ Green MasterMix (Applied Biosystems™) на приладі QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) за відповідних температурних режимів [11–15]. Як ендогенний контроль приймали експресію гена *16S pPHK* або *rpsL*, або *rpoS* [16–18]. Розрахунок відносного рівня експресії генів проводили за методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [19].

Для статистичного аналізу даних використані критерій Краскела-Уолеса та дисперсійний аналіз ANOVA. Статистичну обробку проводили за допомогою комп'ютерної програми «Statistica 6.0» (StatSoft. Inc., USA). Вірогідними вважали відмінності за рівня значущості $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Антибіоплівкову активність сполуки АМ-166 щодо *P. aeruginosa* вивчали в концентраціях 2,0 МІК, 0,5 МІК і 0,15 МІК. Результати відображено на рисунку 1.

Згідно з отриманими даними (рис. 1), за дії АМ-166 біомаса біоплівки зменшилась у разі 2,0 МІК на (62,9 ± 2,7) %, 0,5 МІК – на (49,4 ± 2,7) %, 0,15 МІК – на (22,8 ± 3,2) % ($p < 0,05$).

Для визначення експресії генів за дії похідного адамантану на початковому етапі дослідження здійснювали визначення продуктів ампліфікації з праймерами до генів плівкоутворення *P. aeruginosa* (рис. 2).

Результати детекції генів методом гель-електрофорезу показали, що в

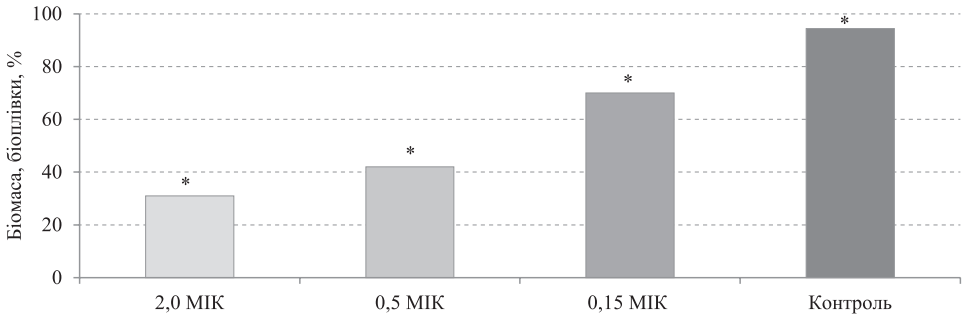

Рис. 1. Плівкоутворення P. aeruginosa 449 за дії АМ-166 (відсоток утвореної біоплівки, біомаса)

*Примітка. *Статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).*

тест-штаму *P. aeruginosa* 449 наявні гени плівкоутворення: *algL* – 432 п.н., *pslA* – 198 п.н., *pelA* – 118 п.н., *algD* – 400 п.н. (А), *algR* – 400 п.н., *algU* – 410 п.н. (Б), *mucA* – 688 п.н. (В) (рис. 2А–2В).

Результати проведених досліджень щодо експресії генів, асоційованих з факторами плівкоутворення, наведено на рисунку 3.

Результати проведених експериментів щодо експресії генів у *P. aeruginosa*, які регулюють синтез полісахаридів, свідчать про статистично значуще підвищення рівня експресії генів *pelA, pslA* та *algD, algR*. Після обробки однодобової культури *P. aeruginosa* сполукою АМ-166 у субінгібуючій концентрації експресія генів *pelA* і *pslA* підвищувалась у 16,6 і 2,5 разу відповідно, генів *algD* та *algR* – у 6,0 і 2,9 разу відповідно. Слід зазначити, що рівень експресії генів *algU* та *algL* був вірогідно нижчим порівняно з контролем (у 1,7 і 2,3 разу відповідно). Ген *mucA* практично не детектувався (у 50 разів менше порівняно з контролем) (рис. 3).

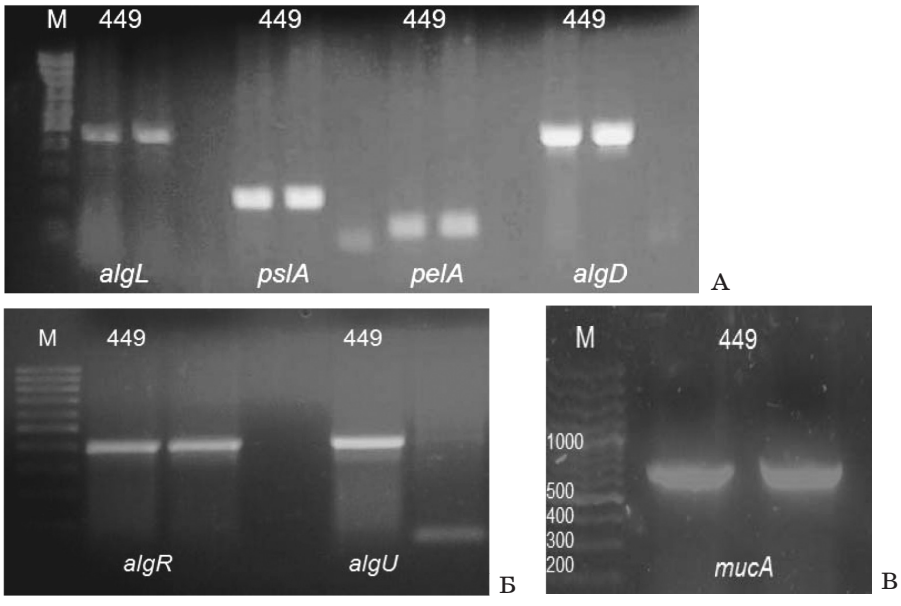

Рис. 2. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації з праймерами до генів: А – algL, pslA, pelA, algD; Б – algR, algU; В – mucA; М – ДНК-маркер молекулярних мас

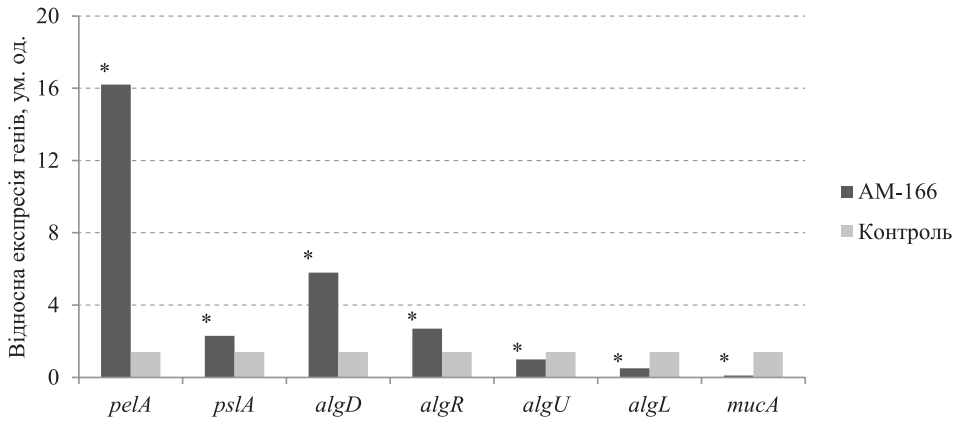

Рис. 3. Відносна експресія генів плівкоутворення ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) у P. aeruginosa 449 за дії АМ-166
*Примітка. *Статистично достовірні відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$).*

На нашу думку, підвищення рівня експресії генів *pelA, pslA, algD, algR* під впливом похідного адамантану пов'язане зі стимуляцією захисних механізмів *P. aeruginosa*. Низка досліджень показала, що полісахарид Psl здатний впливати на дигуанілатциклази SiaD і SadC, які, у свою чергу, продукують внутрішньоклітинні вторинні молекули-месенджери c-di-GMP. Підвищення концентрації c-di-GMP призводить до збільшення продукції Psl і свідчить про наявність унікального регуляторного ланцюга з позитивним зворотним зв'язком, й експресія позаклітинного полісахариду є адаптацією бактерій до дії стресорів [20].

Формування біоплівки включає декілька етапів: адгезію, агрегацію, дозрівання та формування архітектури біоплівки. Значну роль на початкових етапах плівкоутворення відіграють екзополісахариди Psl і Pel. Білки, ферменти та транспортні молекули, які є необхідними для синтезу Psl, Pel і формування біоплівки *P. aeruginosa*, кодуються генами *pslA-O* і *pelA-G* відповідно.

Екзополісахарид Pel *P. aeruginosa*, що синтезується в двох формах, декретованій і клітинно-асоційованій, бере участь в адгезії клітин до поверхні. Ген *pelA* генерує секретовану форму полісахариду Pel, продукція якого збільшується в штамів з порушеннями синтезу клітинно-асоційованого Pel-полісахариду. Збільшення експресії гена *pelA* за дії сполуки АМ-166 можливо пов'язане зі здатністю похідного аміноадамантану порушувати синтез клітинно-асоційованого полісахариду [21]. Саме збільшення його синтезу може призвести до порушення адгезії та плівкоутворення, що й реєструється за дії сполуки в субінгібуючій концентрації, біомаса утвореної біоплівки становить близько 50 % від такої в контролі.

За дії похідного адамантану реєструється підвищення експресії гена *pslA* оперону *pslAO* (15 генів оперону), що можливо пояснити участю екзополісахариду, опосередкованого опероном *psl*, у прикріпленні бактерії до поверхні. Збільшення синтезу полісахариду Psl на етапі адгезії підтверджено експериментами з делеційним мутантом *P. aeruginosa PAO1ΔpslA*.

На наступному етапі плівкоутворення – формування мікроколоній і моношару, експресія генів оперону

пригнічується [22]. Активація продукції Psl-полісахариду може свідчить про перехід *P. aeruginosa* в мукоїдну форму [23] зі збільшенням утворення клітинами синьогнійної палички альгінату.

Підтвердженням зміни продукції альгінату за дії сполуки АМ-166 є зміна експресії генів, що регулюють синтез цього полісахариду. Більшість генів, що регулюють синтез альгінату, розташовані у великому опероні *algACD*. Згідно з отриманими даними, за впливу похідного адамантану відмічено зниження рівня експресії регулятора синтезу альгінату гена *algU* та гена *algL*. Ці дані є важливими, оскільки ген *algU* і негативні регулятори *mucA* і *mucB* складають кластер генів, що контролює конверсію немукоїдних штамів *P. aeruginosa* в штами, здатні гіперпродукувати альгінат [24]. Перехід від немукоїдного до мукоїдного стану може бути наслідком інактивації *mucA*, що призводить до конститутивної експресії генів біосинтезу альгінату, залежних від *algU* (*algT*,σ^{22}), що контролює транскрипцію algD і синтез AlgD [25]. Згідно з [26], інактивація *mucA* пригнічує активність *algU* (*algT*). Транскрипція *algD* залежить і від AlgR у мукоїдних штамів *P. aeruginosa*, останній регулює синтез фосфогексомутази AlgC [27].

У мукоїдних штамів *P. aeruginosa* експресія *algR* є максимальною на ранній стаціонарній фазі, що збігається з експресією кількох генів біосинтезу альгінату, включаючи *algA*, *algC* і *algD*. Згідно з результатами дослідження, підвищення експресії гена *algR* (у 2,9 разу), генів *algD* (у 6,0 разу) і значне пригнічення експресії гена *mucA* за дії субінгібуючої концентрації похідного адамантану може свідчити про здатність сполуки стимулювати утворення альгінату. Такий ефект спостерігається й за дії іміпенему [28]. Оскільки похідне адамантану здатне підвищувати проникність ЦПМ, змінювати якісний і кількісний склад клітинної стінки грамнегативних бактерій, можливо цим і пояснюється його альгінат-стимулюючий ефект.

Проте за дії АМ-166 відмічено зменшення транскрипційної активності гена *algL* майже в 2,0 разу, що свідчить про здатність сполуки навпаки пригнічувати синтез альгінату *P. aeruginosa* 449. Але, враховуючи значне пригнічення *mucA*, підвищення експресії гена *algD* та *pslA*, можна припустити, що за дії сполуки спостерігаються мутації в гені *mucA*, які сприяють переходу немукоїдного фенотипу *P. aeruginosa* в мукоїдний. Такий ефект можливий за комплексоутворення сполуки АМ-166 з залізом, який є в клітинній стінці бактерій, дихальному ланцюгу тощо. Подібні результати отримані за дії на немукоїдний штам *P. aeruginosa* тобраміцину та хелатора заліза – дефераксаміну, їхнє сумісне застосування призводило до зменшення біомаси біоплівки [29]. Для детального аналізу отриманих результатів необхідно проведення поглиблених молекулярних досліджень, зокрема з використанням мутантних тест-штамів мікроорганізмів.

Висновки

Дослідження показали, що похідне адамантану 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил)бензол виявляє антимікробну активність щодо біоплівок *P. aeruginosa*, що підтверджується зниженням її біомаси. Встановлено, що за дії сполуки спостерігається зміна рівня експресії генів плівкоутворення, які регулюють синтез позаклітинних полісахаридів (альгінату, Pel і Psl).

1. *Moradali M. F, Ghods S., Rehm B. H. Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol. 2017.* V. 7. P. 39. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039.
2. *Pseudomonas aeruginosa* infections in cancer patients. P. Paprocka, B. Durnaś, A. Mańkowska et al. *Pathogens*. 2022. V. 11. № 6. P. 679. https://doi.org/10.3390/pathogens11060679.
3. Polysaccharides' structures and functions in biofilm architecture of antimicrobial-resistant (AMR) pathogens. E. Balducci, F. Papi, D. E. Capialbi, L. Del Bino. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 4030. https://doi.org/ 10.3390/ijms24044030.
4. The Pel polysaccharide is predominantly composed of a dimeric repeat of α-1,4 linked galactosamine and N-acetylgalactosamine. F. Le Mauff, E. Razvi, C. Reichhardt et al. *Commun. Biol.* 2022. V. 5 (1). P. 502. https://doi.org/10.1038/s42003-022-03453-2.
5. *Jones C. J., Wozniak D. J.* Psl produced by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* contributes to the establishment of biofilms and immune evasion. *mBio*. 2017. V. 8 (3). P. e00864-17. https://doi.org/10.1128/mBio.00864-17.
6. *Thi M. T. T., Wibowo D., Rehm B. H. A. Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int. J. Mol.* Sci. 2020. V. 21. № 22. P. 8671. https://doi.org/10.3390/ijms21228671.
7. PelX is a UDP-*N*-acetylglucosamine C4-epimerase involved in Pel polysaccharide–dependent biofilm formation. L. S. Marmont, G. B. Whitfield, R. Pfoh et al. *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295, № 34. P. 11949–11962. https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014555.
8. The role of RNA regulators, quorum sensing and c-di-GMPin bacterial biofilm formation. M. Condinho, B. Carvalho, A. Cruz et al. *FEBS Open Bio*. 2022. https://doi.org/10.1002/2211-5463.13389. URL: https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/2211-5463.13389.
9. The pyocin regulator PrtR regulates virulence expression of *Pseudomonas aeruginosa* by modulation of Gac/Rsm system and c-di-GMP signaling pathway. H. Jiao, F. Li, T. Wang et al. *Infect. Immun*. 2021. V. 89 (2). P. e00602–20. https://doi.org/10.1128/IAI.00602-20.
10. Pseudomonas methods and protocols. Methods in Molecular Biology. A. Filloux, J. L. Ramos [eds.]. *Humana Press*. 2014. V. 1149. 816 p. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0.
11. Polymorphonuclear leukocytes or hydrogen peroxide enhance biofilm development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Q. Tan, Q. Ai, Q. Xu et al. *Mediators of inflammation*. 2018. V. 2018. P. 8151362. https://doi.org/10.1155/2018/8151362.
12. Integron types, antimicrobial resistance genes, virulence gene profile, alginate production and biofilm formation in Iranian cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates. A. Pournajaf, S. Razavi, G. Irajian et al. *Infez. Med.* 2018. V. 26. № 3. P. 226–236.
13. Biofilm formation and expression of virulence genes of microorganisms grown in contact with a new bioactive glass. V. de C. Oliveira, M. T. Souza, E. D. Zanotto et al. *Pathogens*. 2020. V. 9 (11). P. 927. https://doi.org/10.3390/pathogens9110927.
14. *AL-Sheikhly M. A. R. H, Musleh L. N., Al-Mathkhury H. J. F.* Gene expression of *pelA* and *pslA* in *Pseudomonas aeruginosa* under gentamicin stress. *Iraqi J. Science*. 2020. V. 61. № 2. P. 295–305. https://doi.org/10.24996/ijs.2020.61.2.6.
15. Effects of ambroxol on alginate of mature *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. F. Li, J. Yu, H. Yang et al. *Curr. Microbiol*. 2008. V. 57, № 1. P. 1–7. https://doi.org/10.1007/s00284-008-9142-8.
16. Association of overexpression of efflux pump genes with antibiotic resistance in P*seudomonas aeruginosa* strains clinically isolated from urinary tract infection patients. K. Shigemura, K. Osawa, A. Kato et al. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2015. V. 68, № 9. P. 568–572. https://doi.org/10.1038/ja.2015.34.
17. Interference with *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and virulence by the mycobacterial *Pseudomonas* quinolone signal dioxygenase AqdC in combination with the N-Acylhomoserine lactone lactonase QsdA. F. S. Birmes, R. Säring, M. C. Hauke et al. *Infection and Immunity*. 2019. V. 87 (10). P. e00278-19. https://doi.org/10.1128/IAI.00278-19.
18. *Zelena L., Gretsky I., Gromozova E*. Influence of ultrahigh frequency irradiation on Photobacterium phosphoreum luxb gene expression. *Cent. Eur. J. Biol.* 2014. V. 9, № 10. P. 1004–1010. https://doi.org/10.2478/s11535-014-0347-5.
19. *Livak K. J., Schmittgen T. D*. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Method. Methods.* 2001. V. 25, № 4. P. 402–428. https://doi.org/10.1006/meth.2001.
20. Bacterial exo-polysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments. S. Singh, S. Datta, K. B. Narayanan, K. N. Rajnish. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2021. V.19 (1). P. 140. https://doi.org/10.1186/s43141-021-00242-y.
21. Glycoside hydrolase processing of the Pel polysaccharide alters biofilm biomechanics and *Pseudomonas aeruginosa* virulence. E. Razvi, G. B. Whitfield, R. C. Courtney et al. *npj Biofilms and Microbiomes*. 2023. V. 9. P. 7. https://doi.org/10.1038/s41522-023-00375-7.
22. Expression of the *psl* operon in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms: PslA performs an essential function in biofilm formation. J. Overhage, M. Schemionek, J. S. Webb, B. H. Rehm. *Appl. Environ. Microbiol*. 2005. V. 71, № 8. P. 4407–4413. https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4407-4413.2005.

23. *Pseudomonas aeruginosa* Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. M. Mishra, M. S. Byrd, S. Sergeant et al. *Cellular Microbiology*. 2012. V. 14, № 1. P. 95–106. https://doi.org/10.1111/ j.1462-5822.2011.01704.x.
24. *Martin D. W., Schurr M. J., Mudd M. H*. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1993.V. 90. P. 8377–8381.
25. *Laverty G., Gorman S. P., Gilmore B. F.* Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation. *Pathogens*. 2014. V. 3, № 3. P. 596–632. https://doi.org/10.3390/ pathogens3030596.
26. *Monday S. R., Schiller N. L*. Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: the role of AlgL (alginate lyase) and AlgX. *J. Bacteriology*. 1996. V. 178, № 3. P. 625–632. https://doi.org/10.1128/ jb.178.3.625-632.1996.
27. Regulation of ribonucleotide synthesis by the *Pseudomonas aeruginosa* two-component system AlgR in response to oxidative stress. A. Crespo, L. Pedraz, M. Van Der Hofstadt et al. *Sci. Rep*. 2017. V. 7. P. 17892. .
28. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and betalactamase and alginate production. N. Bagge, M. Schuster, M. Hentzer et al. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004. V. 48, № 4. P. 1175–1187.
29. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Z. Pang, R. Raudonis, B. R. Glick. *Biotechnology Advances*. 2019. V. 37, № 1. P. 177–192.

Н. І. Гуменюк, Н. О. Вринчану, Л. М. Іщенко

Вплив похідного адамантану на експресію генів плівкоутворення *P. Aeruginosa*

Значне поширення резистентних штамів *P. aeruginosa*, здатність до плівкоутворення, складні регуляторні мережі формування біоплівок і багаточисельні фактори вірулентності потребують пошуку нових сполук і розробки препаратів, які здатні порушувати формування біоплівок.

Мета дослідження – вивчити експресію генів, що регулюють формування біоплівки *P. aeruginosa* за дії похідного адамантану.

Антибіоплівкову активність похідного адамантану АМ-166 щодо клінічного ізоляту *P. aeruginosa* досліджували в концентраціях 0,15 МІК, 0,5 МІК і 2,0 МІК методом сорбції генціанвіолету на структурах біоплівки. Виявлення генів *algL, pslA, pelA, algD, algR, algU, mucA* у штаму *P. aeruginosa* 449 проводили методом ПЛР з наступним розділенням продуктів ампліфікації в агарозному гелі. Вплив сполуки АМ-166 на транскрипційну активність генів досліджували методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ за допомогою ПЛР у реальному часі.

Отримані результати дослідження свідчать, що сполука АМ-166 виявляє дозозалежний антибіоплівковий ефект щодо *P. aeruginosa* 449. Біомаса біоплівки за дії похідного адамантану в концентраціях 0,15 МІК, 0,5 МІК, 2,0 МІК зменшується на 22,8 %, 49,4 %, 62,9 % відповідно. За дії субінгібуючої концентрації АМ-166 відмічено збільшення рівня експресії генів плівкоутворення *pelA, pslA, algD, algR* і зниження експресії *algU, algL, mucA* ($p < 0,05$), що регулюють синтез альгінату, Pel- і Psl-полісахариду.

Таким чином, похідне адамантану 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил) бензол проявляє інгібуючу активність щодо біоплівок *P. aeruginosa*, за його дії відмічено як підвищення, так і зниження рівня експресії генів, що регулюють синтез компонентів матриксу.

Ключові слова: похідне адамантану, плівкоутворення, Pseudomonas aeruginosa, експресія генів

N. I. Humeniuk, N. O. Vrynchanu, L. M. Ishchenko

The effect of adamantane derivative on *P. Aeruginosa* biofilm formation genes expression

The widespread occurrence of resistant *P. aeruginosa* strains, the ability to form films, complex regulatory pathways of biofilm formation and the numerous virulence factors require the search for new compounds and the development of drugs capable of inhibiting biofilm formation.

The aim of the study was to investigate the genes expression that regulate *P. aeruginosa* biofilm formation after exposure to an adamantane-containing compound.

The antibiofilm activity of the adamantane derivative AM-166 against a clinical isolate of *P. aeruginosa* was studied at concentrations of 0.15 MIC, 0.5 MIC and 2.0 MIC by the method of adsorption of gentian violet on biofilm structures. Detection of the genes *algL, pslA, pelA, algD, algR, algU, mucA* in *P. aeruginosa* strain 449 was performed by classic PCR with subsequent gel electrophoresis. The effect of compound AM-166 on the transcriptional activity of genes was studied by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method using real-time PCR.

The results of the study indicate that compound AM-166 has a dose-dependent antibiofilm effect against *P. aeruginosa* 449. The biomass of the biofilm after exposure to the adamantane derivative at concentrations of 0.15 MIC, 0.5 MIC, 2.0 MIC decreased by 22.8 %, 49.4 %, 62.9 %, respectively. After exposure to the subinhibitory concentration of AM-166, an increase in the expression level of the biofilm formation

genes *pelA, pslA, algD, algR* and a decrease in the expression of *algU, algL, mucA* ($p < 0.05$), which regulate the synthesis of alginate, Pel- and Psl-polysaccharide, was observed.

Thus, the adamantane derivative 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl) benzol showed inhibitory activity against *P. aeruginosa* biofilms. Both an increase and a decrease in the expression of genes regulating the synthesis of matrix components was observed.

Key words: adamantane derivatives, biofilms, Pseudomonas aeruginosa, gene expression

Надійшла: 1 лютого 2023 р.

Прийнята до друку: 22 березня 2023 р.

Контактна особа: Гуменюк Наталія Ігорівна, молодший науковий співробітник, лабораторія фармакології протимікробних засобів, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 83 32.
Електронна пошта: natali72grynchuk@gmail.com