

ГЕОМЕТРИЧЕСКАЯ И ПРИКЛАДНАЯ ОПТИКА

УДК 535.37; 539.19; 57.013; 579.61

ПИОВЕРДИН КАК ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЙ МАРКЕР ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ КУЛЬТУРЫ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

© 2014 г. Э. А. Соснин*, ***, О. С. Жданова***, Э. Р. Кашапова****, В. Я. Артюхов*

* Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050 Томск, Россия

** Институт сильноточной электроники Сибирского отделения РАН, 634055 Томск, Россия

*** Сибирский государственный медицинский университет, 634050 Томск, Россия

**** ООО «СИИМ-Инжиниринг», 634003 Томск, Россия

E-mail: badik@loi.hcei.tsc.ru

Поступила в редакцию 02.04.2014 г.

Исследованы электронное строение и физико-химические характеристики молекулы пиовердина методами квантовой химии. Проведена оптимизация геометрии поглощающего и флуоресцирующего конформеров фрагментов молекулы пиовердина. Получены характеристики электронного спектра поглощения и флуоресценции методом нестационарной теории функционала плотности. Проведены экспериментальные исследования спектров поглощения и флуоресценции пиовердина, выделенного от клинических изолятов *P. aeruginosa*. Предложен оптический метод определения чувствительности синегнойной палочки к антибиотикам с помощью ХеВг-эксилампы.

DOI: 10.7868/S0030403414110208

ВВЕДЕНИЕ

Актуальной темой современной медицины остаются внутрибольничные инфекции. Одним из возбудителей, занимающих ведущее место в общей структуре нозокомиальных инфекций, является синегнойная палочка (*P. aeruginosa*). Так, в последние десять лет прослеживается тенденция к увеличению удельного веса заболеваний, вызванных этим микроорганизмом [1].

Инфекции, вызванные *P. aeruginosa*, нередко характеризуются тяжелым течением и сопровождаются высокой летальностью. Широкое применение антибиотиков приводит к формированию резистентных к ним штаммов, что значительно затрудняет проведение этиотропной терапии [2].

Цель настоящей работы — создание оптической методики определения чувствительности к антибиотикам штаммов *P. aeruginosa*. Рабочая гипотеза — оптические свойства пигментов культуры синегнойной палочки зависят от антибиотикорезистентности культуры. Задача — изучить теоретически и экспериментально спектрально-люминесцентные свойства пигментов, синтезируемых культурами и проверить справедливость предложенной гипотезы.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕХНИКА И МЕТОДЫ РАСЧЕТА

Пигментообразующую способность определяли у 100 клинических изолятов *P. aeruginosa*, для

которых предварительно была определена чувствительность к антибиотикам первого ряда (цефтазидим, ципрофлоксацин, левофлоксацин, гентамицин, амикацин, меропенем, имипенем) и дополнительным препаратам (карбенициллин, цефоперазон, полимиксин) [3, 4]. Штаммы предоставлены бактериологической лабораторией Томской областной клинической больницы.

Выделение и идентификацию пиоцианина проводили следующим образом: изоляты выращивали на среде, стимулирующей синтез пиоцианина в течение 1 сут. Затем чашки Петри с культурой заливали стерильной дистиллированной водой и культивировали еще 2–3 сут. После чего собирали жидкость и пропускали через бактериальные фильтры.

Наличие пиовердина определяли в жидкой среде, в составе которой в качестве единственного источника углевода содержался сукцинат (0.4%). Культивирование проводили в течение 3–5 сут, после чего отделяли взвесь бактерий с помощью центрифугирования и фильтрования через бактериальные фильтры.

Идентификацию пигментов определяли в фильтрате супернатанта спектрофотометрически по характерным пикам поглощения. Спектр поглощения регистрировали на спектрофотометре StellaNetEPP2000-C25 на основе многоканальной ПЗС-линейки (рабочий диапазон 200–850 нм), совмещенном с опорным источником излучения SL5 UV-VIS на основе дейтеревой и накаливающей

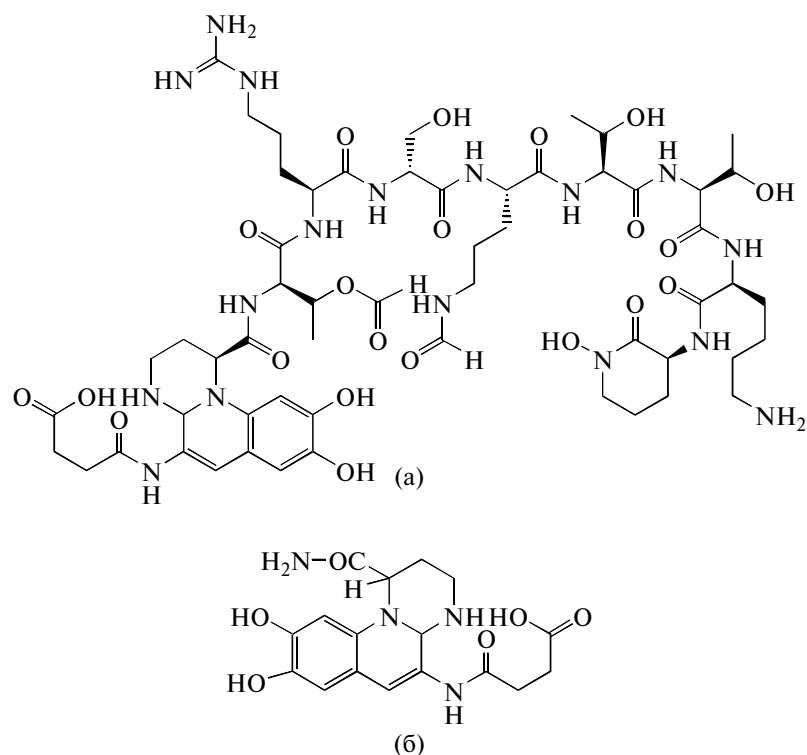


Рис. 1. Структура молекулы пиовердина (а), структура исследованного фрагмента молекулы (б).

ламп. Спектрофотометром регистрировали и спектры флуоресценции.

Для теоретического исследования электронного строения и физико-химических характеристик электронного спектра поглощения и флуоресценции пигментов применялись методы квантовой химии. А именно для расчета энергий

основного и электронных возбужденных состояний применяют приближенные методы решения уравнений Хартри–Фока и методы DFT, в которых вместо волновых функций при расчетах используют электронные плотности, что позволяет рассчитывать системы с большим числом электронов, чем при использовании традиционных методов Хартри–Фока.

Таблица 1. Расчитанные характеристики электронного спектра поглощения фрагмента молекулы пиовердина, полученные методом TDDFT/B3LYP(6-31G(d, p))

Состояние	E , эВ	E , см ⁻¹	f	Конфигурация электронного перехода
S_1	3.438	27729.53	0.203	B → H (0.98)
S_2	3.567	28770	0.029	B → H+1
S_3	4.288	34585.29	0.016	B → H+2(0.87), B → H+3(0.35), B-1 → H (0.3)
S_4	4.34	35004.7	0.016	B → H+3(0.87), B-1 → H(0.4), B → H+2 (0.18)
S_5	4.618	37246.94	0.096	B-1 → H (0.65), B-1 → H+1(0.7), B → H+2(0.22), B → H+3(0.17)
S_6	4.711	37997.04	0.249	B-1 → H+1(0.7), B-1 → H(0.4), B → H+2(0.3), B → H+3, H+4(0.2)
S_7	4.907	39577.9	0.026	B-2 → H (0.7), B-3 → H(0.4), B-4 → H(0.3), B → H+4(0.3), B-2 → H+1(0.2)
S_8	4.953	39948.92	0.014	B-3 → H(0.5), B → H+4(0.5), B-2, B-4 → H(0.4)
S_9	5.112	41231.35	0.235	B → H+4(0.7), B-2 → H(0.4), B-3 → H(0.3), B-2 → H(0.2)
S_{10}	5.316	42876.73	0.002	B-2 → H+1(0.9), B-2 → H(0.3)

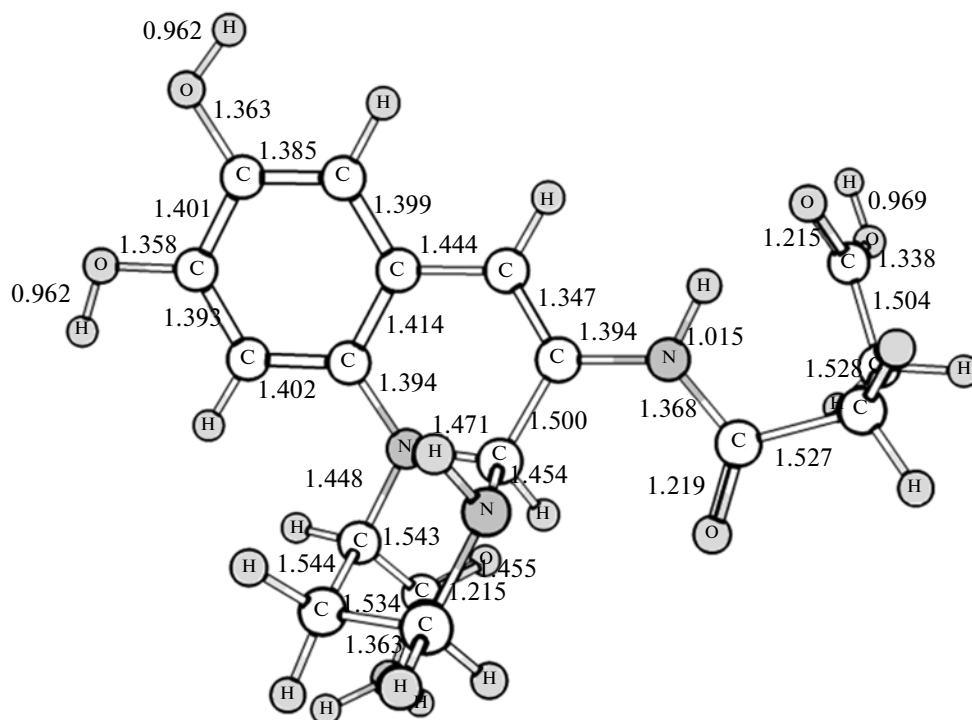


Рис. 2. Структурные параметры оптимизированной структуры поглощающего конформера молекулы пиовердина. Оптимизация проводилась методом DFT.

В настоящей работе с помощью пакета программ GAMESS-US [5, 6] в газовой фазе в базисе 6-31G(d, p) [6] методами функционала плотности DFT и TDDFT [7, 8] с гибридным обменно-корреляционным функционалом B3LYP [9] выполнены квантово-химические расчеты электронного строения, проведена интерпретация электронного спектра поглощения и флуоресценции фрагмента молекулы пиовердина. При расчете спектра флуоресценции была учтена перестройка геометрии молекулы в возбужденном синглетном состоянии S_1 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Видоспецифическим признаком синегнойной палочки является ее способность продуцировать ряд пигментов: пиоцианин, пиовердин, пиорубин и пиомеланин. Наибольшее значение из них имеют пиоцианин и пиовердин, которые синтезируются большинством штаммов (80–100%) [10]. Чаще всего в научной литературе встречаются сведения о пиоцианине, как о дифференциально-диагностическом признаке, на который обращают внимание при микробиологической диагностике синегнойной инфекции. Пиоцианин — водорастворимый пигмент, относящийся к феназиновым соединениям, обладающий антибиотической активностью и проявляющий свойства

фактора вирулентности. В литературе имеются сведения о наличии прямой корреляции между способностью синегнойной палочки к синтезу пиоцианина и степенью ее патогенности. Показано, что инфекция, вызванная беспигментными штаммами, протекает легче и возбудитель быстро элиминируется из организма хозяина [10].

Другой водорастворимый пигмент *P. aeruginosa* — пиовердин является сидерофором и жизненно необходим для обеспечения синегнойной палочки ионами железа. Этот пигмент проявляет свойства антиоксиданта, а также обладает антибиотической активностью и рассматривается исследователями как фактор агрессии [10, 11]. Молекула пиовердина имеет сложную структуру, состоящую из диоксихинолинового ядра, дикарбоновой кислоты и пептидной цепи [12].

Таблица 2. Результаты расчета методом TDDFT (B3LYP/6-31G(d,p)) характеристик полосы флуоресценции

	TDDFT (B3LYP/6-31G(d,p))		
	E , эВ	E , см ⁻¹	f
S_1	2.722	21954.56	0.169
S_2	3.149	25398.57	0.007

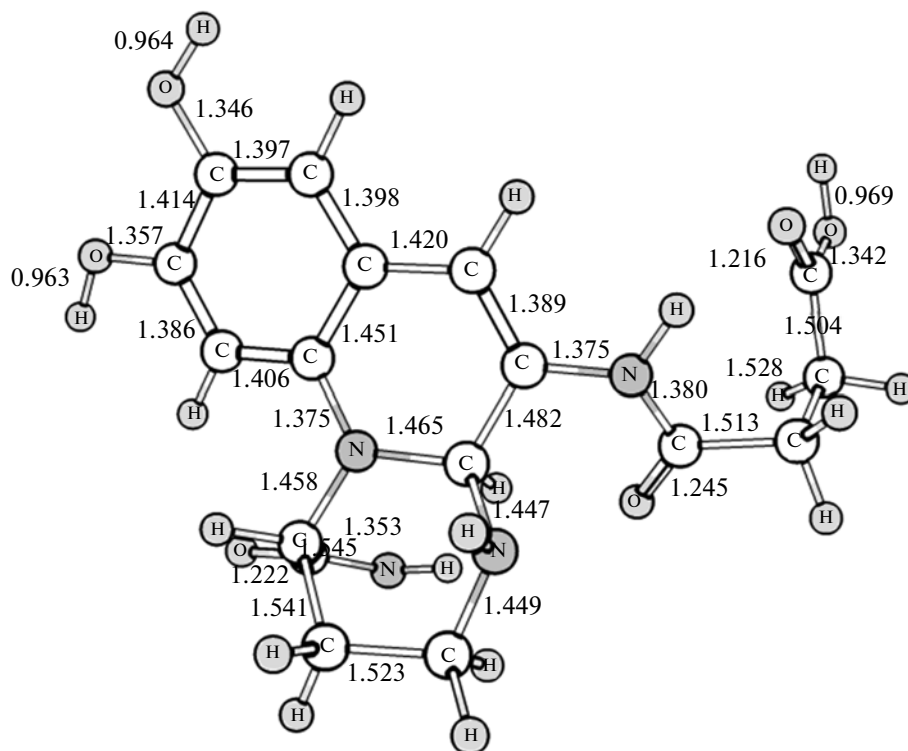


Рис. 3. Структурные параметры оптимизированной структуры флуоресцирующего конформера молекулы пиовердина. Оптимизация проводилась методом DFT.

Высокая частота встречаемости этих пигментов у *P. aeruginosa* послужила основным критерием выбора их в качестве оптических маркеров антибиотикорезистентности.

В наших предыдущих работах [13–16] мы обратили внимание на спектры поглощения пигментов, выделенных от штаммов *P. aeruginosa* различного происхождения. Характер этих спектров указывал на наличие связи между антибиотикорезистентностью и продукцией пиоцинина. Но эта связь не всегда была стабильной. В некоторых случаях у поли- и панрезистентных штаммов наблюдалось полное угнетение синтеза этого пигмента, в других эта способность сохранялась. Поэтому главным кандидатом на роль оптического маркера стал пиовердин, так как он синтезируется 95–100% штаммов *P. aeruginosa* [10].

Были проведены квантово-химические расчеты спектрально-люминесцентных свойств конформеров фрагментов молекулы пиовердина, ответственных за основные процессы поглощения и флуоресценции (рис. 1).

Определение равновесных геометрий пиовердинового фрагмента молекулы в состояниях S_0 и S_1 проводилось в газовой фазе на DFT-уровне. Структурные параметры оптимизированных структур приведены на рис. 2, 3.

Согласно квантово-химическим расчетам методом DFT дипольный момент молекулярной системы фрагмента молекулы пиовердина в равновесной геометрии поглощающего конформера равен 1.28 Д. Для изучения возбужденных состояний комплексов проведен анализ состава граничных молекулярных орбиталей (МО) (рис. 4).

Установлено, что верхняя занятая МО (ВЗМО) с энергией $\varepsilon = -4.177$ эВ является π -МО, локализована в основном на диоксихинолиновом фрагменте и карбоксильной группе. Нижняя вакантная МО (НВМО) с энергией -0.278 эВ является π^* -МО, локализована на атомах углерода ароматического кольца хинолинового фрагмента и карбоксильной группе. Методом TDDFT/B3LYP/6-311G** проведены квантово-химические расчеты 10 возбужденных синглетных состояний, смоделированы их спектры поглощения и флуоресценции.

Анализ электронных синглетных переходов данного соединения показал, что синглетное возбуждение молекулы в области $\lambda_{\text{полг}} = 360.7$ нм на 98% обусловлено переходами валентных электронов с ВЗМО на нижние вакантные π^* -МО π -систем ароматического колец хинолинового фрагмента и карбоксильной группы. Рассчитанный электронный спектр поглощения содержит три интенсивных перехода на длинах волн 360.7, 263.1

и 242.6 нм, соответствующие состояниям S_1 , S_6 и S_9 соответственно (табл. 1).

Учет релаксации молекулярных систем в возбужденном синглетном состоянии дает снижение энергии возбужденного состояния для молекулы на 0.716 эВ (табл. 2) и соответственно увеличение длины волны максимума электронного спектра на 94.86 нм.

Таким образом, наиболее вероятные центры электронного возбуждения при переходе комплексов в возбужденные состояния локализованы на π -системах хинолинового фрагмента и карбоксильной группы. На основании этого можно предположить, что широкая полоса с максимальной интенсивностью экспериментальных спектров поглощения данного соединения обусловлена электронными переходами в указанных π -системах.

Из расчетов, в частности, следовало следующее.

1. Молекула пиовердина не является фотоактивной, т.е. после фотовозбуждения плохо вступает в химические связи. С практической точки зрения это означает, что эта молекула может выступать флуоресцирующим маркером. После освещения вероятность ее химической связи с остатками органических веществ, попавшими в суспензию после центрифугирования и фильтрации, мала.

2. Расчетные пики, соответствующие самому сильному поглощению в состоянии S_1 (3.438 эВ), S_6 (4.711 эВ) и S_9 (5.112 эВ) молекулы пиовердина (табл. 1), расположены близко к пикам спектров поглощения (рис. 5), полученным экспериментально на суспензиях, полученных от штаммов *P. aeruginosa* на питательных средах, стимулирующих синтез пиовердина. Это пики, соответствующие энергиям 3.407, 4.032 и 5 эВ. Неполное совпадение пиков объясняется как допущениями, принятыми при моделировании, так и тем, что выделенные суспензии содержат не только пиовердин, но и ряд других органических веществ, продуцируемых штаммами.

3. Расчетный максимум первой полосы флуоресценции соответствовал распаду состояния S_1 с $\lambda \sim 456$ нм с силой осциллятора $f = 0.169$. То есть передача энергии в этот канал флуоресценции эффективна (в сравнении с распадом состояния S_2 , для которого сила осциллятора была примерно на два порядка меньше, $f = 0.007$).

С учетом сказанного в пп. 1–3 было предложено использовать в качестве источника для возбуждения флуоресценции молекулы пиовердина K₂Cr₂O₇-, XeBr- и XeCl-эксилампы. Для спектров люминесценции этих источников ультрафиоле-

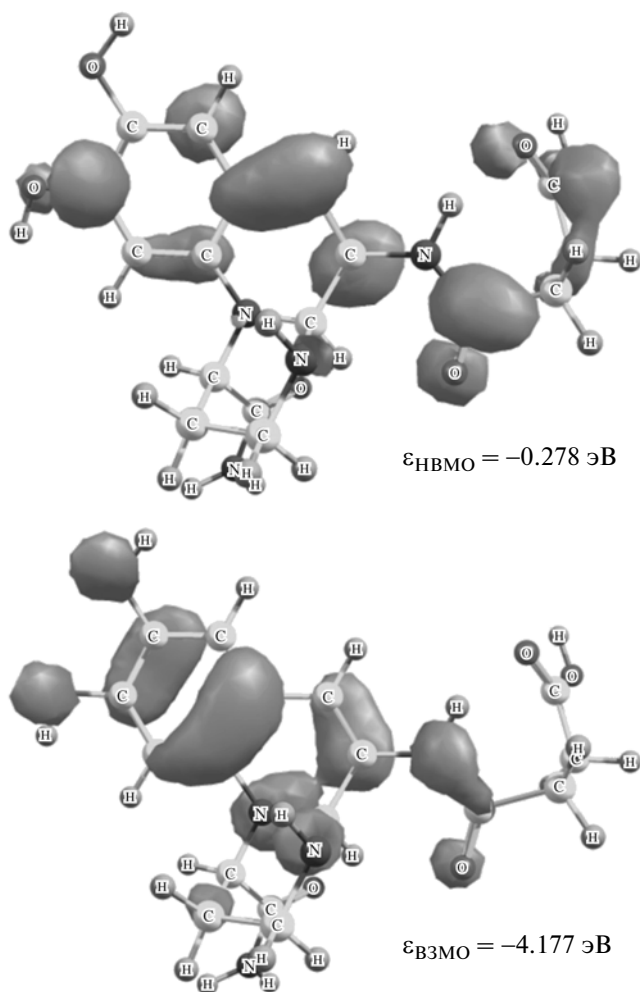


Рис. 4. Энергии и вид граничных МО (TDDFT/V3LYP/6-31G**).

тового излучения характерно наличие в спектре узкой полосы излучения $B \rightarrow X$ (рис. 6). Кроме того, спектры излучения далеко отстоят от расчетного максимума флуоресценции из состояния S_1 (п. 2). В этом случае, используя полосовые светофильтры УФС для отсеки ультрафиолетового излучения лампы от спектрофотометра согласно расчетам, можно наблюдать спектр флуоресценции, соответствующий состоянию S_1 .

Экспериментально были получены спектры флуоресценции суспензий, облученных XeBr-, XeCl- и K₂Cr₂O₇-эксилампами барьерного разряда (разработка лаборатории оптических излучений ИСЭ СО РАН) [17, 18]), обеспечивающих плотности излучения на поверхности кюветы с суспензиями до 10 мВт/см². Наибольшая интенсивность флуоресценции полосы, соответствующей состоянию S_1 , была достигнута при использовании XeBr-эксилампы.

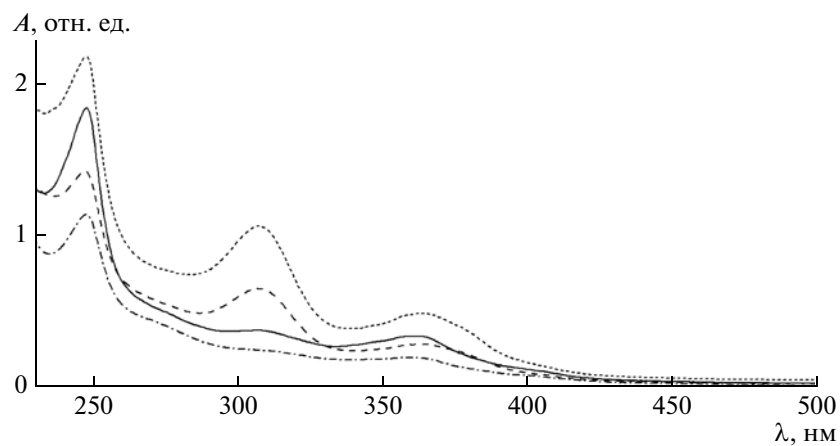


Рис. 5. Примеры спектров поглощения суспензий от нескольких штаммов *P. aeruginosa*, продуцирующих пиовердин.

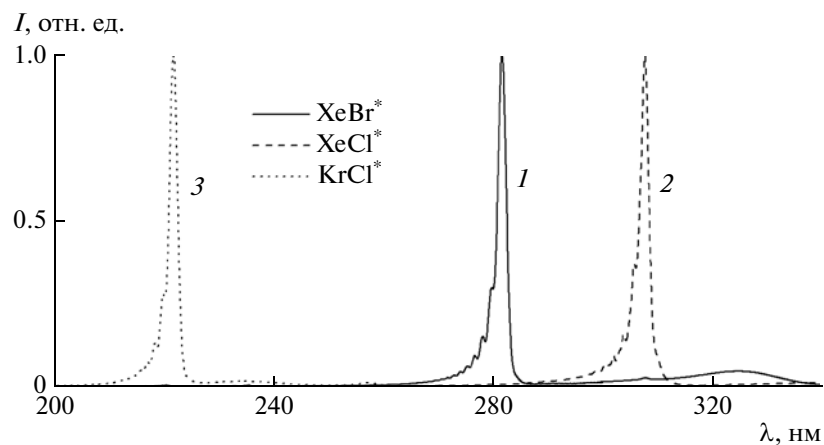


Рис. 6. Спектры излучения XeBr- (1), XeCl- (2) и KrCl-эксилламп (3) барьерного разряда.

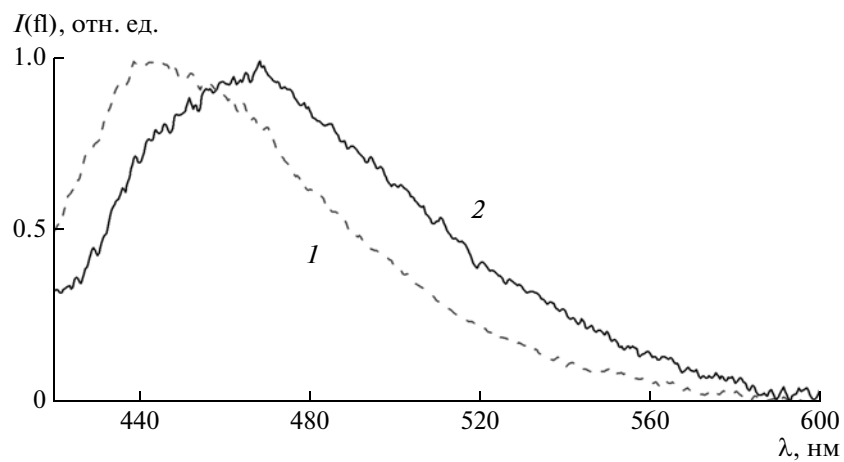


Рис. 7. Типичные спектры флуоресценции двух различных групп штаммов *P. aeruginosa*.

Далее экспериментальные исследования с помощью ХеВг-эксилампы выявили два вида спектров флуоресценции во всех исследованных штаммах *P. aeruginosa* (рис. 7). Спектр 1 соответствует типичному образцу, полученному от штамма *P. aeruginosa*, показавшему резистентность к семи антибиотикам (карбеницилин, цефтазедим, цефоперазон, меропенем, имипенем, ципрофлоксацин, левофлоксацин), а спектр 2 соответствует типичному образцу, полученному от штамма *P. aeruginosa*, чувствительного ко всем использованным антибиотикам (карбеницилин, цефтазедим, цефоперазон, меропенем, имипенем, ципрофлоксацин, левофлоксацин, гентамицин, амикацин).

В нашем исследовании флуоресценция с максимумом в диапазоне длин волн 435–445 нм была получена в 10 случаях. Среднее значение для количества антибиотиков, к которым эти штаммы проявляют резистентность, составляет 5.9. Флуоресценция с максимумом в диапазоне длин волн 455–470 нм была получена в 7 случаях. Среднее значение для количества антибиотиков, к которым эти штаммы проявляют резистентность, составляет 0.4.

Заметим, что теоретически полученный максимум полосы флуоресценции из состояния S_1 больше соответствует спектрам флуоресценции “классических” штаммов, чувствительных к антибиотикам (рис. 7, 2). Естественно предположить, что структура молекулы пиовердина у штаммов, ставших резистентными, меняется, что сдвигает положение максимума флуоресценции (рис. 7, 1). Это и наблюдается экспериментально.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методами функционала плотности DFT и TDDFT с гибридным обменно-корреляционным функционалом B3LYP в базисе 6-31G(d, p) выполнены квантово-химические расчеты электронного строения и физико-химических свойств фрагмента молекулы пиовердина в основном и возбужденных состояниях. Для энергетически наиболее выгодных конфигураций была учтена релаксация молекулярной системы при переходе в возбужденное синглетное состояние. На основе квантово-химического моделирования дана интерпретация особенностей возбужденных электронных состояний фрагмента молекулы пиовердина.

На основе теоретических и экспериментальных исследований выявлено, что оптическим (флуоресцентным) маркером резистентности штамма к антибиотикам служит наличие в полосе флуоресценции молекул пиовердина максимума

в диапазоне длин волн 435–445 нм. Напротив, маркером чувствительности штамма к антибиотикам служит наличие в полосе флуоресценции максимума в диапазоне длин волн 455–470 нм. Полученные результаты легли в основу нового оптического метода определения чувствительности штаммов *P. aeruginosa* к антибиотикам [19].

Авторы благодарят Л.В. Гудкову за предоставленные штаммы *P. aeruginosa*, С.М. Авдеева и А.В. Грицуту за помощь в проведении экспериментов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИСЭ СО РАН по теме № 13.1.3 и при поддержке гранта Президента РФ, НШ-1305.2014.2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Veesenmeyer J.L., Hauser A.R., Lisboa T.* // J. Crit. Care Med. 2009. № 37(5). P. 1777.
2. *Сидоренко С.В., Резван С.П., Стерхова Г.А., Грудина С.А.* // Антибиотики и химиотерапия. 1999. № 3. С. 25.
3. МУК 4.2.2602-10. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков. Методические указания (утв. Роспотребнадзором 21.04.2010). М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.
4. *Скала Л.З., Сидоренко С.В., Нехорошева А.Г. и др.* Практические аспекты современной клинической микробиологии. Тверь: ООО «Издательство “Три-ада”», 2004. 312 с.
5. *Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A. et al.* // J. Comp. Chem. 1993. V. 14. P. 1347.
6. *Jensen F.* // WIREs Comput Mol Sci. 2013. V. 3. P. 273.
7. *Tozer David J., Hand Nicholas C.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2000. V. 2. P. 2117.
8. *Dreuw A., Head-Gordon M.* // Chem. Rev. 2005. V. 105. P. 4009.
9. *Becke A.D.* // J. Chem. Phys. 1993. V. 98. P. 5648.
10. *Пыж А.Э., Никандров В.Н.* // Здравоохранение. 2008. № 11. С. 41.
11. *Кулешова Ю.М., Максимова Н.П.* // Вестник БГУ. Сер. 2. 2006. № 1. С. 57.
12. *Максимова Н.П., Блажевич О.В., Лысак В.В., Фоми-чев Ю.К.* // Микробиология. 1994. Вып. 6. Т. 63. С. 1038.
13. *Жданова О.С., Красноженов Е.П., Соснин Э.А. и др.* // Альманах клинической медицины. 2013. № 1. С. 13.
14. *Жданова О.С., Соснин Э.А., Гадиров Р.М. и др.* // Вестник сибирской науки. 2013. № 2(8). С. 199.

15. *Zhdanova O.S., Sosnin E.A., Gadirov R.M. et al.* // Abstracts of the 11-th International Conference "Atomic and Molecular Pulsed Lasers". Tomsk (16.09–20.09.2013), 2013. F-15. P. 105.
16. *Sosnin E.A., Zhdanova O.S., Gudkova L.V. et al.* // Abstracts of the 11-th International Conference "Atomic and Molecular Pulsed Lasers", Tomsk (16.09–20.09.2013), 2013. F-4. P. 102.
17. *Sosnin E.A., Tarasenko V.F., Lomaev M.I.* UV and VUV Excilamps. Saarbrücken, Deutschland, Germany: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. 318 p.
18. *Автаева С.В., Жданова О.С., Пикулев А.А. и др.* Новые направления в научных исследованиях и применении эксиламп. Томск: STT, 2013. 246 с.
19. *Соснин Э.А., Тарасенко В.Ф., Жданова О.С., Грицута А.В.* Заявка на патент № 2013151236 (RU).

Сдано в набор 31.07.2014 г.	Подписано к печати 20.10.2014 г.	Дата выхода в свет 13 еж.	Формат $60 \times 88^{1/8}$
Цифровая печать	Усл. печ. л. 22.0	Усл. кр.-отт. 2.4 тыс.	Уч.-изд. л. 22.0
	Тираж 108 экз.	Зак. 788	Бум. л. 11.0
		Цена свободная	

Учредители: Российская академия наук, Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН

Издатель: Российская академия наук. Санкт-Петербургская издательская фирма "Наука" РАН
 199034, С-Петербург, В-34, Менделеевская линия, 1
 Оригинал-макет подготовлен МАИК "Наука/Интерпериодика"
 Отпечатано в ППП «Типография "Наука"», 121099 Москва, Шубинский пер., 6