



## Медикаментозное управление диспергированием биопленки за счет регуляции активности бактериального циклического дигуанозинмонофосфата (часть 2)

For citation: Zdorov'e Rebenka. 2020;15(2):145-154. doi: 10.22141/2224-0551.15.1.2020.200340

**Резюме.** Инфекционный процесс, вызванный патогенными бактериями, может сопровождаться формированием биопленки, что предопределяет сохранность бактерий и снижение эффективности действия антибактериальных средств. Разработка препаратов, которые способствуют диспергированию бактериальной биопленки, является одним из важнейших терапевтических направлений, способствующих решению проблемы лечения бактериальных инфекций, вызванных микроорганизмами, резистентными к действию антибактериальных средств. Одной из целевых, участвующих в формировании биопленок бактериальных молекул, которые могут быть подвергнуты медикаментозной регуляции, является вторичная мессенджерная нуклеозидная молекула — циклический дигуанозинмонофосфат (ц-ди-ГМФ). Медикаментозное подавление внутрибактериальной концентрации мессенджерной молекулы ц-ди-ГМФ или блокирование ее активности позволяет предотвратить формирование и вызвать разрушение бактериальной биопленки, что сопровождается повышением эффективности лечения бактериальных инфекций. Снижение уровня внутрибактериальной концентрации ц-ди-ГМФ может быть достигнуто ингибированием процессов синтеза за счет 1) подавления активности DGC; 2) ограничения доступности субстратов, необходимых для синтеза ц-ди-ГМФ; 3) усиления деградации молекулы ц-ди-ГМФ за счет усиления активности PDE. Терапия инфекционных заболеваний, которые сопровождаются формированием биопленок, требует медикаментозной индукции диспергирования бактерий из биопленок и применения целенаправленных антибиотических лекарственных средств, вызывающих гибель высвобожденных из биопленок бактерий. Использование аналогов ц-ди-ГМФ, нарушающих функционирование нативного ц-ди-ГМФ, и блокирование таргетных рецепторов и других молекулярных структур также может приводить к диспергированию бактериальной биопленки. Лекарственные средства, модулирующие активность ц-ди-ГМФ, позволяют повысить эффективность лечения бактериальных инфекций, которые сопровождаются формированием биопленок.

**Ключевые слова:** бактериальные биопленки; диспергирование; ц-ди-ГМФ; антибиопленочная терапия

### 2. Медикаментозная активация диспергирования бактериальной биопленки за счет снижения концентрации или активности циклического дигуанозинмонофосфата

Снижение уровня внутрибактериальной концентрации циклического дигуанозинмонофосфата (ц-ди-ГМФ) может быть достигнуто ингибированием процессов синтеза за счет 1) подавления

активности DGC; 2) ограничения доступности субстратов, необходимых для синтеза ц-ди-ГМФ; 3) усиления деградации молекулы ц-ди-ГМФ за счет усиления активности PDE. Использование аналогов ц-ди-ГМФ, нарушающих функционирование нативного ц-ди-ГМФ, и блокирование таргетных рецепторов и других молекулярных структур также может приводить к диспергированию бактериальной биопленки.

© 2020. The Authors. This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International License, CC BY](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which allows others to freely distribute the published article, with the obligatory reference to the authors of original works and original publication in this journal.

Для корреспонденции: Абатуров Александр Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой педиатрии 1 и медицинской генетики, ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», ул. Вернадского, 9, г. Днепр, 49044, Украина; e-mail: alexabaturov@i.ua

For correspondence: Oleksandr Abaturov, MD, PhD, Professor, Head of the Department of pediatrics 1 and medical genetics, State Institution "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine", Vernadsky st., 9, Dnipro, 49044, Ukraine; e-mail: alexabaturov@i.ua

Full list of author information is available at the end of the article.

**2.1. Подавление синтеза циклического дигуанозинмонофосфата**

Неспецифические ингибиторы DGC представляют собой класс наиболее эффективных лекарственных средств, подавляющих образование и способствующих диспергированию бактериальных биопленок.

**Гликозилированный тритерпеноидный сапонин**

Одним из первых идентифицированных ингибиторов DGC был гликозилированный тритерпеноидный сапонин (рис. 5), полученный из экстракта гороха садового (*Pisum sativum*) [34].

Однако данная молекула не получила развития и не стала лекарственным средством.

**Папулакандин В**

Антибиотик папулакандин В (Papulacandin В) (рис. 6) также обладает ингибирующей активностью в отношении DGC со значением IC50 70 мкМ [34].

**N-(4-анилинофенил) бензамид**

N-(4-анилинофенил) бензамид (N-(4-anilinophenyl) benzamide) (рис. 7), ингибируя активность DGC, суще-

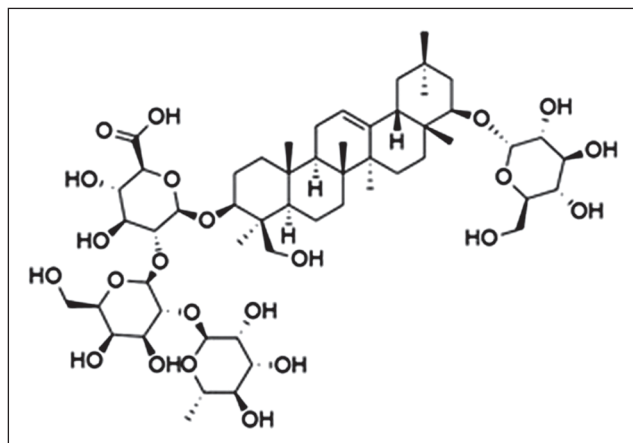


Рисунок 5. Структура молекулы тритерпеноидного сапонины [34]

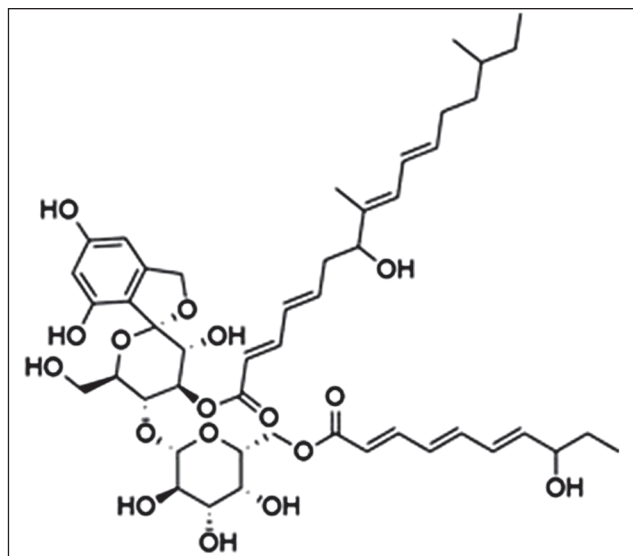


Рисунок 6. Структура молекулы папулакандина В [34]

ственно подавляет образование биопленки бактериями *Pseudomonas aeruginosa* [43].

**Соединения Amb2250085 27a и Amb379455 27b**

Соединения Amb2250085 27a и Amb379455 27b (рис. 8) связываются с активным сайтом PleD бактериальных дигуанилатциклаз DGC и подавляют их активность [47].

**Соединения LP 3134, LP 3145, LP 4010 и LP 1062**

Karthik Sambanthamoorthy и соавт. [42] идентифицировали четыре малые молекулы LP 3134, LP 3145, LP 4010 и LP 1062 (рис. 9), которые непосредственно взаимодействуют с DGC бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и подавляют активность данных ферментов, обуславливая диспергирование биопленки.

Малые молекулы LP непосредственно связываются с ферментами DGC. Так, соединения LP 3145, LP 4010 и LP 1062 образуют две водородные связи, а LP 3134 — три водородные связи с N335 домена PleD молекул DGC. Авторы полагают, что модификация данных соединений будет способствовать разработке мощных ингибиторов бактериальных DGC, которые найдут место в клинической практике [42].

Необходимо отметить наличие подобия молекулярных структур соединений LP 3134 и Amb379455. Молекулы данных ингибиторов DGC характеризуются присутствием N-бензилиденбензогидразидного фрагмента, который, вероятно, и взаимодействует с аминокислотной группой (Asn335 остаток) активного сайта DGC. Также эти молекулы содержат пирогаллольный фрагмент, ко-

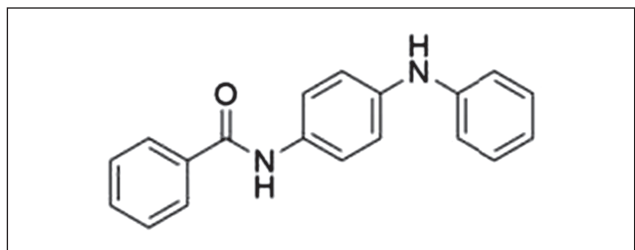


Рисунок 7. Структура молекулы N-(4-анилинофенил) бензамида [43]

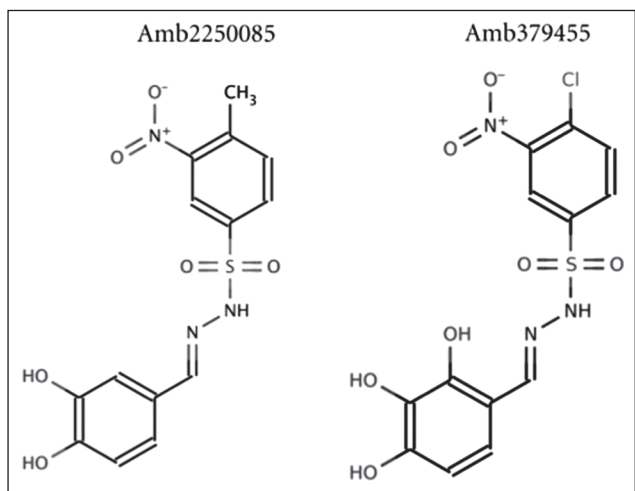


Рисунок 8. Структура молекул Amb2250085 27a и Amb379455 27b [17]

торый может блокировать AHL-опосредованную передачу сигналов между бактериями [36].

## 2.2. Снижение доступности субстрата для синтеза циклического дигуанозинмонофосфата Сульфатиазол

Молекула сульфатиазола (Sulfathiazole) состоит из свободного анилина, ароматического сульфонида и тиазольного кольца, образующих двустороннюю структуру, которая изогнута вокруг сульфонида фрагмента (рис. 10).

Сульфатиазол представляет собой первый пример лекарственного средства, способного влиять на образование биопленки, нарушая метаболизм ц-ди-ГМФ не за счет ингибирования активности DGC, а за счет изменения соотношения пулов нуклеотидов, тем самым ограничивая доступность субстрата ц-ди-ГМФ [9].

### Азатиоприн

Азатиоприн оказывает влияние на концентрацию ц-ди-ГМФ подобно сульфатиазолу [9].

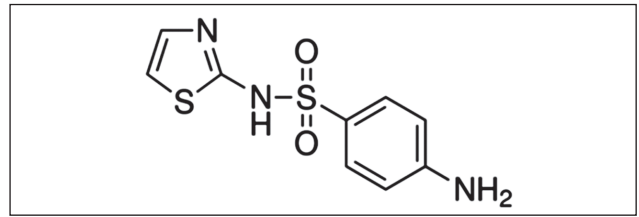


Рисунок 10. Строение молекулы сульфатиазола [9]

## 2.3. Усиление деградации циклического дигуанозинмонофосфата NO-доноры

Лекарственные средства, которые являются NO-донорами, оказывают выраженное ингибирующее действие на бактериальную биопленку. Продемонстрировано, что низкие нетоксичные концентрации оксида азота (NO) индуцируют диспергирование бактериальных биопленок. Также NO повышает подвижность бактерий и их восприимчивость к действию антибактериальных средств. Оксид азота стимулирует генера-

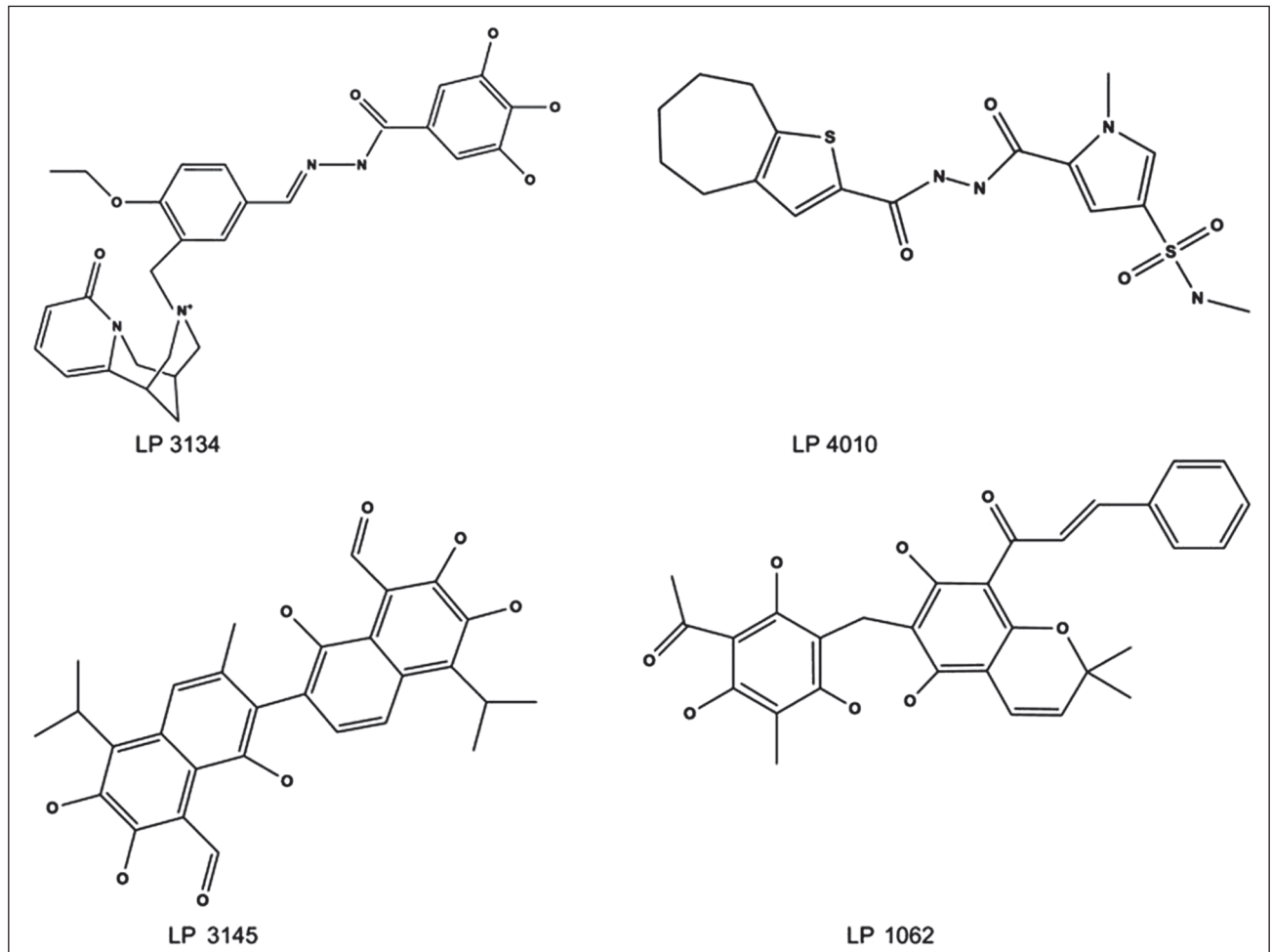


Рисунок 9. Строение молекул LP 3134, LP 3145, LP 4010 и LP 1062 [42]

Примечания: LP 3134 – N'-((1E)-{4-этоксифенил}метил)метилфенилметиленил-3,4,5-тригидроксибензогидразид; LP 3145 – 1,1',6,6',7,7'-гексагидрокси-5,5'-диизопропил-3,3'-диметил-2,2'-бинафталин-8,8'-дикарбальдегид; LP 4010 – бензолсульфонамид, 4-амино-N-метил-N-[3-(3,4,7,8-тетрагидро-2,4-диоксо-2H-тиопирано[4,3-d]пиримидин-1(5H)-ил)пропил]; LP 1062 – (E)-1-[6-[(3-ацетил-2,4,6-тригидрокси-5-метилфенил)метил]-5,7-дигидрокси-2,2-диметил-2H-1-бензопиран-8-ил]-3-фенил-2-пропен-1-он.

цию PDE, что приводит к снижению внутриклеточных уровней ц-ди-ГМФ в бактериях. Помимо снижения внутриклеточного уровня ц-ди-ГМФ, NO-доноры вызывают подавление синтеза пиовердина, который является сидерофором, ответственным за рекрутирование железа, необходимого для формирования биопленки [14, 23, 24].

Для оказания антибактериального эффекта наиболее часто используются два типа NO-доноров: диолат диазения (N-диазениумдиолат) (NONOate) и S-нитрозотиол (RSNO), которые могут высвобождать NO в определенных условиях. Одна молекула NONOate спонтанно высвобождает две молекулы NO, в то время как одна молекула RSNO высвобождает одну молекулу NO. Необходимо отметить, что молекула NONOate высвобождает молекулы NO в физиологических условиях, а RSNO выделяют NO после воздействия ультрафиолетового излучения, высокой температуры, ионов металлов, кислот или ферментов [2, 55].

Использование газообразного NO или спонтанных NO-доноров сопряжено с побочными эффектами из-за потенциальной цитотоксичности NO в результате его системного действия, отсутствия специфичности его действия на бактериальные биопленки.

Для разрешения данной проблемы также разработаны стерически затрудненные аналоги NO — нитроксиды, которые проявляют биологическое действие как NO-миметики. Нитроксиды, или аминоксилы, представляют собой класс стабильных долгоживущих радикалов, содержащих дизамещенный атом азота, связанный с одновалентным атомом кислорода [33]. Поскольку нитроксидные структуры обладают неспаренным электроном, который делокализован по азотно-кислородной связи, нитроксиды представляют собой стерически затрудненную версию оксида азота. Нитроксиды — карбокси-TEMPO (4-карбокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-илоксил), СТМЮ (5-карбокси-1,1,3,3-тетраметилизоиндолин-2-илоксил) и DCTEIO (5,6-дикарбокси-1,1,3,3-тетраэтилизоиндолин-2-илоксил) (рис. 11) — индуцируют диспергирование биопленки бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* [26].

Новыми лекарственными NO-донорами, которые удовлетворяют клиническим требованиям, являются полимерные NO-доноры, образованные путем ковалентного конъюгирования или физического инкапсулирования малых молекул NO-доноров на полимерные платформы (хитозана, целлюлозы и альгината).

Данные формы NO-доноров демонстрируют стабильность депонирования NO, пролонгированное высвобождение NO и хороший профиль фармакокинетики. В настоящее время разработаны различные полимеры, высвобождающие NO, такие как наночастицы, нановолокна и гидрогели для покрытия поверхностей катетеров [6, 40].

Показана возможность ингаляционного применения альгинат-полимерных NO-доноров при лечении больных с муковисцидозом. Продемонстрировано, что применение альгинат-полимерных NO-доноров способствует диспергированию биопленок основных бактериальных агентов, инфицирующих респираторный тракт больных муковисцидозом (*Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus*). Показано, что для индукции диспергирования биопленки аэробных бактерий требуют большей концентрации начальных доз NO, чем биопленки анаэробных бактерий [5].

Также разработаны препараты, молекула которых представляет собой соединение антибиотика и NO-донора. В частности, представлены цефалоспорин-3'-диазениумдиолаты (cephalosporin-3'-diazeniumdiolates — C3D), состоящие из цефалоспорина и присоединенного к 3'-положению его β-лактаманного кольца стабилизированного N-диазениумдиолатного NO-донора. Пролекарства C3D обеспечивают селективную доставку NO к бактериальным биопленкам, так как высвобождение NO происходит при расщеплении β-лактаманного кольца, которое выполняют бактериальные β-лактамазы [11].

Samuel A. Collins и соавт. [13] показали, что применение репрезентативного C3D, содержащего диазениумдиолат NO, донор PYRRO-NO (PYRRO-C3D), против биопленок нетипируемых бактерий *Haemophilus influenzae* (NTHi), выращенных на первичном реснитчатом эпителии на границе воздух — жидкость, значительно увеличивает восприимчивость биопленок NTHi к действию азитромицина, вызывая снижение жизнеспособности бактерий в 10 раз *in vitro*.

Также PYRRO-C3D значительно снижает жизнеспособность планктонных и биопленочных пневмококков. Так, установлено, что по отношению к биопленкам, сформированным бактериями *Streptococcus pneumoniae*, PYRRO-C3D обладает более высокой эффективностью, чем азитромицин [7].

Продемонстрировано, что пролонгированное пролекарство диэтиламин-цефалоспорин-3'-диазениумдиолат (DEA-C3D) инициирует диспер-

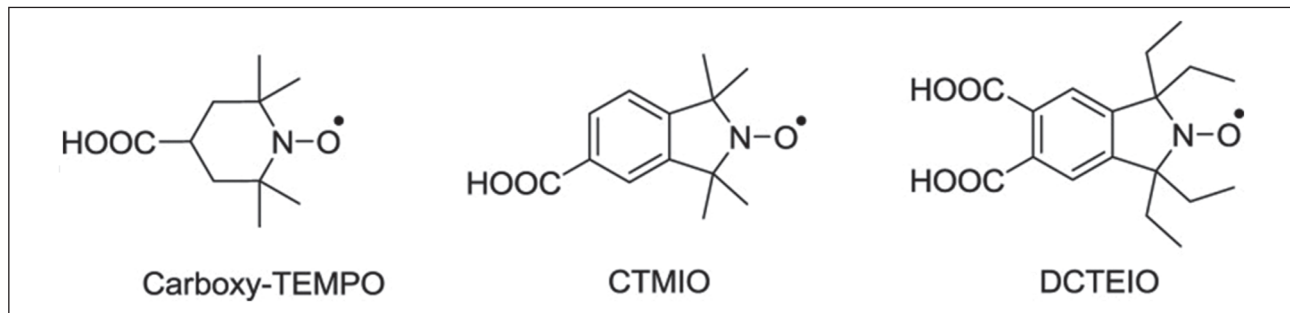


Рисунок 11. Строение молекул карбокси-TEMPO, CTMIO и DCTEIO [15]

гирование биопленок, образованных лабораторным штаммом бактерий *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Препарат DEA-C3D селективно высвобождает NO в ответ на контакт с бактериальной β-лактамазой. Конфокальная микроскопия показала, что DEA-C3D в сочетании с тобрамицином дает такое же снижение массы биопленки, что и моноиспользование DEA-C3D, в то время как его комбинация с колистином вызывает практически полное уничтожение биопленок, сформированных бактериями *Pseudomonas aeruginosa in vitro* [46].

#### 2.4. Модуляция ц-ди-ГМФ-ассоциированными эффектами при помощи синтетических аналогов ц-ди-ГМФ

Аналоги ц-ди-ГМФ, которые селективно связываются с молекулами определенного класса ц-ди-ГМФ-связывающих протеинов, могут быть использованы в качестве антибиопленочных агентов. С учетом того, что и DGC, и PDE активно взаимодействуют с ц-ди-ГМФ, молекулы различных классов ц-ди-ГМФ-связывающих протеинов могут индуцировать развитие противоположных фенотипов у бактерий, так как DGC способствуют формированию, а PDE — диспергированию биопленки. Продемонстрировано, что в присутствии катионов молекулы ц-ди-ГМФ легко образуют димеры, тетраплексы и агрегаты высшего по-

рядка. Так, двухвалентные катионы, такие как магний, способствуют образованию димеров ц-ди-ГМФ, а одновалентные катионы, такие как калий, способствуют образованию тетраплексов и октаплексов ц-ди-ГМФ. Было сделано предположение о том, что модификация структуры молекулы ц-ди-ГМФ, которая сопровождается изменением ее агрегационной способности, может привести к индукции определенных эффектов. В 2011 году Jingxin Wang и соавт. [50] создали аналог ц-ди-ГМФ — эндо-S-ц-ди-ГМФ, у которого один из атомов кислорода в 50-мостиковой фосфодиэфирной связи был заменен на атом серы, что обусловило склонность его молекулы находиться в открытой конформации и не образовывать димерные формы. Молекула ц-ди-ГМФ в открытой конформации имеет мономерную форму и связывается с PDE, а в закрытой конформации принимает димерную форму и взаимодействует с DGC (рис. 12).

Низкая склонность эндо-S-ц-ди-ГМФ к формированию агрегатов (по сравнению с ц-ди-ГМФ), вероятно, обусловлена затруднением преобразования открытого конформера (где два гуаниновых основания находятся на противоположных сторонах молекулы) в закрытый конформер (где два гуаниновых основания находятся со стороны молекулы). Следовательно, эндо-S-ц-ди-ГМФ обладает селек-

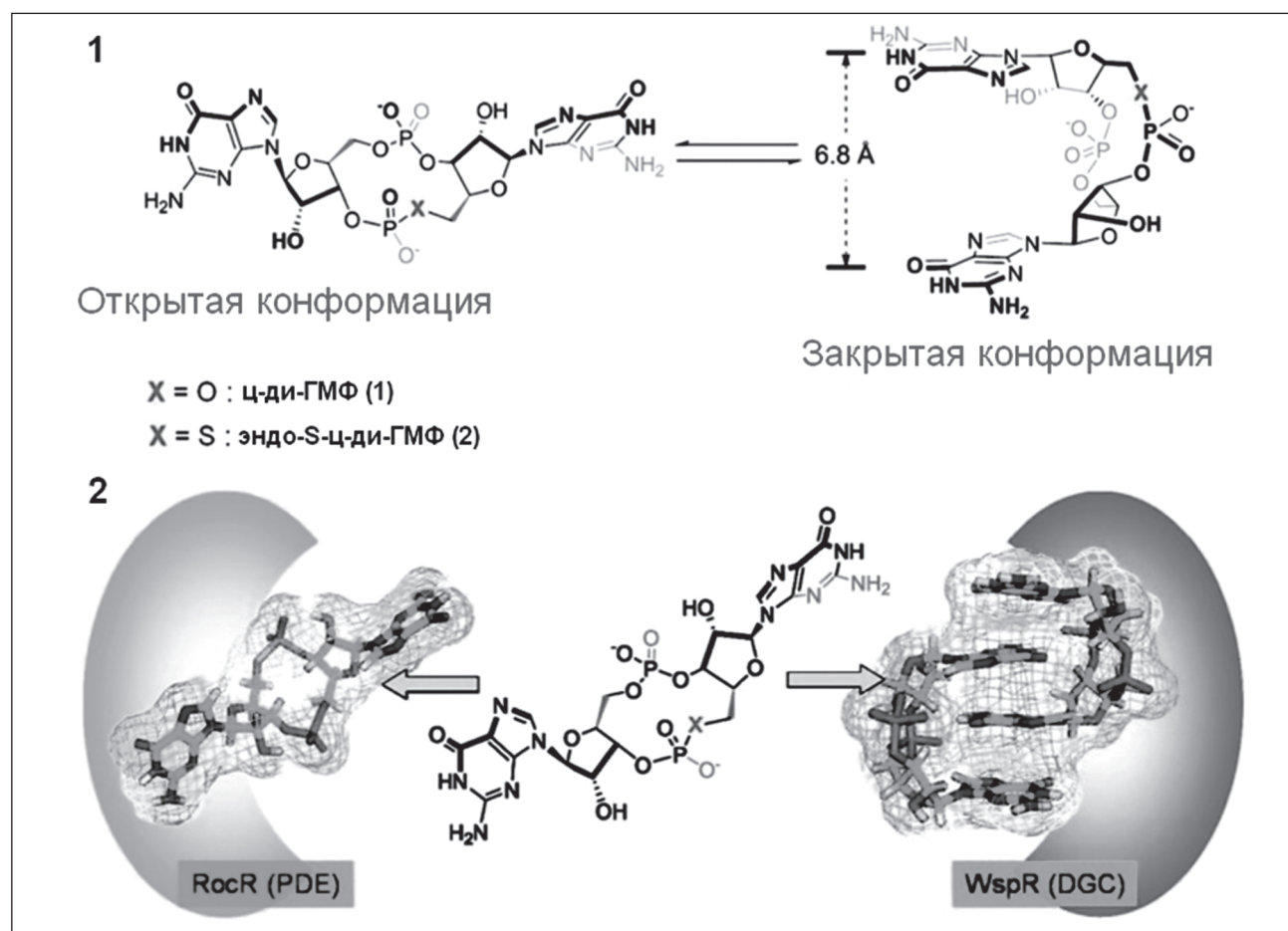


Рисунок 12. Открытая и закрытая конформации молекулы ц-ди-ГМФ [36]

Примечания: 1 — конформации молекулы ц-ди-ГМФ и эндо-S-ц-ди-ГМФ; 2 — взаимодействие молекулы ц-ди-ГМФ с PDE и эндо-S-ц-ди-ГМФ с DGC.

тивностью взаимодействия с протеинами, которые связывают мономерный, но не димерный ц-ди-ГМФ, который формируется из молекул с закрытой конформацией. Например, эндо-S-ц-ди-ГМФ взаимодействует с ферментом PDE — RocR, который связывается с мономерным ц-ди-ГМФ, подавляет гидролиз ц-ди-ГМФ и не взаимодействует с Alg44 (протеин семейства PilZ) и WspR — ферментом DGC, который связывается с димерным ц-ди-ГМФ. Авторы полагают, что будущие исследования позволят создавать аналоги ц-ди-ГМФ, которые будут селективно ингибировать продукцию протеинов, участвующих в формировании биопленки [50].

Silvia Farnicola и соавт. [18] исследовали аналоги ц-ди-ГМФ для выявления аллостерических ингибиторов DGC, которые не влияют на активность PDE. Они синтезировали массив новых молекул, синтезированных путем упрощения нативной структуры молекулы ц-ди-ГМФ и замены заряженного фосфоэфирного остова изостерическим негидролизующим 1,2,3-триазольным фрагментом. Одним из самых клинически перспективных аналогов ц-ди-ГМФ данного массива авторы считают нейтральную малую молекулу — DCI 061, способную селективно взаимодействовать как с DGC, различая ее I-сайт, так и с PDE, связываясь с ее активным сайтом (рис. 13).

## 2.5. Блокирование взаимодействия ц-ди-ГМФ с молекулярными мишенями

Нарушение связывания ц-ди-ГМФ с молекулярными мишенями предотвращает развитие биопленки и способствует диспергированию. В настоящее время выделено несколько молекул, которые блокируют связывание ц-ди-ГМФ с протеинами, содержащими домен PilZ, RxxD и др.

### 2.5.1. Блокирование взаимодействия с протеинами, содержащими домен PilZ

Мессенджер ц-ди-ГМФ, связываясь с рецепторным протеином Alg44, активирует продукцию альгината бактериями *Pseudomonas aeruginosa*. Eric Zhou и соавт. [58] идентифицировали класс соединений тиолбензотриазолохиназолинона, которые ингибируют связывание ц-ди-ГМФ с Alg44 и подавляют способность бактерий *Pseudomonas aeruginosa* продуцировать экзополисахаридный полимер альгинат. Тиолбензотриазолохиназолиноны H19 и 925 (рис. 14) специфически ингибируют взаимодействие ц-ди-ГМФ с Alg44 за счет образования дисульфидной связи с остатком цистеина домена PilZ протеина Alg44. Соединения H19 и 925 на две трети подавляют продукцию альгината бактериями *Pseudomonas aeruginosa* [58].

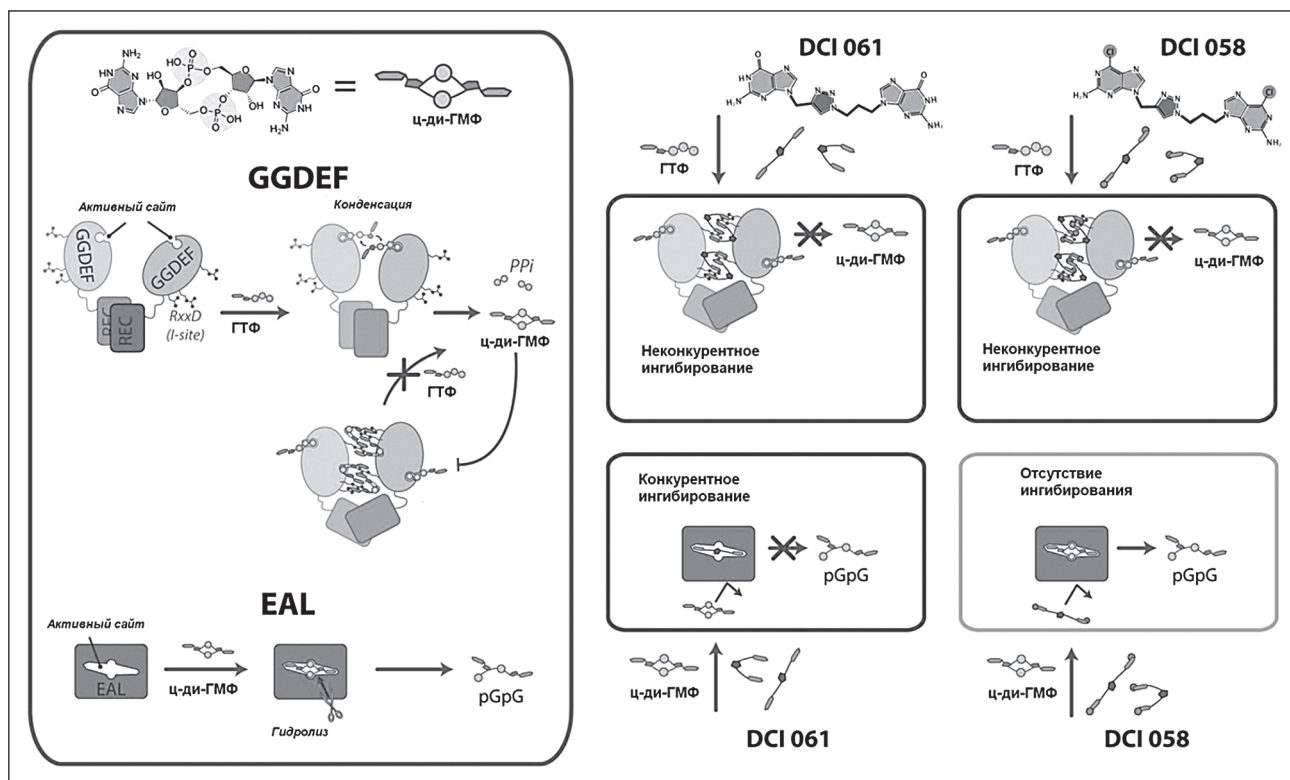


Рисунок 13. Механизм действия ингибитора DGC — DCI 061 [18]

Примечание: слева (в рамке) изображен общий каталитический механизм GGDEF- и EAL-домена, а также конформационная перегруппировка, происходящая во время неконкурентного ингибирования продукта протеинов, содержащих GGDEF-домен. Справа показано влияние и сайт связывания ингибиторов DCI 061 и DCI 058 с протеинами, GGDEF- и EAL-домен (т.е. PleD и RocR). Соединение DCI 061 ингибирует как PleD, так и RocR, а DCI 058 не способно ингибировать RocR, но может связываться с I-сайтом GGDEF-домена. Однако авторы не сообщили о влиянии этого ингибитора на бактериальный фенотип [18].

### 2.5.2. Блокирование взаимодействия с протеинами, содержащими домен RxxD

Установлено, что эбселен (ebselen) является ингибитором аллостерического связывания ц-ди-ГМФ с рецепторами, содержащими домен RxxD, включая WspR и PelD бактерий *Pseudomonas aeruginosa* [27].

Также эбселен подавляет активность DGC, модифицируя строение ее молекулы за счет образования связи между своим ионом селена и тиолом цистеинового остатка ингибирующего сайта DGC (рис. 15) [27].

Эбселен способен как ингибировать образование биопленки, так и разрушать зрелую биопленку. Продемонстрировано, что применение эбселена у мышей, инфицированных энтерококками, резистентными к ванкомицину (enterococci resistance to vancomycin — VRE), столь же эффективно, как и применение рамoplanina. При сравнительной оценке уровня антибактериального действия против широкого спектра энтерококковых изолятов *in vitro* было обнаружено, что эбселен обладает такой же эффективностью, как и линезолид (минимальная ингибирующая концентрация в отношении 90 % протестированных клинических изолятов составляет 2 мкг/мл) [4].

Shankar Thangaman и соавт. [48] продемонстрировали, что эбселен обладает выраженной бактерицидной активностью по отношению к мультирезистентным изолятам золотистого стафилококка, включая устойчивые к метициллину и ванкомицину бактерии *Staphylococcus aureus* (MRSA и VRSA). Эбселен достоверно способствует уменьшению массы стафилококковых биопленок. Применение эбселена значительно снижает бактериальную нагрузку и уровни провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) и хемокина (протеина-1 хемоаттрактанта моноцитов CCL2) при поражении кожи бактериями. Авторы полагают, что

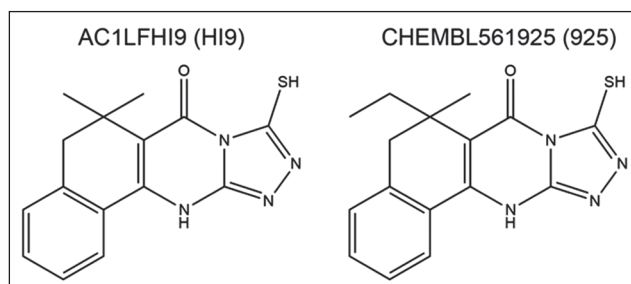


Рисунок 14. Строение молекул H19 и 925 [58]

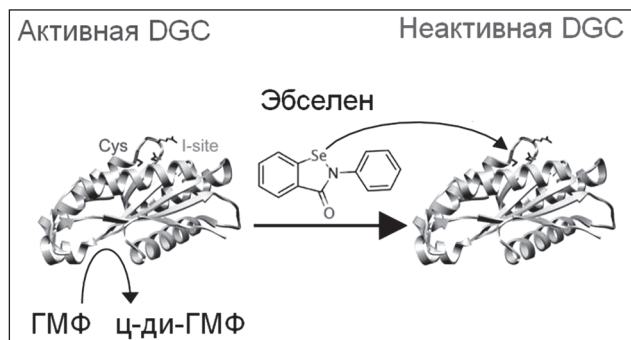


Рисунок 15. Механизм ингибирования активности DGC эбселеном [58]

эбселен обладает терапевтическим потенциалом для местного лечения MRSA-ассоциированных инфекций кожи.

### 2.6. Селективное ингибирование бактериальной motility

#### Бензоизотиазолиноны

Yue Zheng и соавт. [58] идентифицировали производное бензоизотиазолинона Соединение 1 (рис. 16) в качестве специфического ингибитора активности RocR PDE бактерии *Pseudomonas aeruginosa*.

Данное соединение не подавляет активность других PDE, включая PA4108, PvrR и DipA. Соединение 1 также дозозависимым образом снижает подвижность бактерии *Pseudomonas aeruginosa*. Представляет интерес, что данный ингибитор RocR не препятствовал формированию биопленки, но подавлял подвижность планктонных бактерий [58].

### Заключение

Уровень внутрибактериальной концентрации ц-ди-ГМФ определяет форму жизнедеятельности бактерий. При высокой концентрации ц-ди-ГМФ происходит трансформация бактерий от планктонной формы к биопленочной форме жизнедеятельности. Под влиянием ц-ди-ГМФ усиливается биосинтез полисахаридов (альгината, альгинатного и пленочного полисахарида Pel). При низкой концентрации ц-ди-ГМФ усиливается развитие жгутиков, что способствует бактериальной подвижности, и активируется диспергирование [45]. Медикаментозное подавление уровня внутрибактериальной концентрации мессенджерной молекулы ц-ди-ГМФ или блокирование ее активности позволяет повысить эффективность лечения бактериальных инфекций, развитие которых сопровождается формированием биопленки.

Лечение инфекций, которые сопровождаются формированием биопленок, требует индукции активного диспергирования бактерий из биопленок и применения антибиотиков, вызывающих гибель высвобожденных бактерий.

Основным направлением в разработке препаратов, влияющих на концентрацию ц-ди-ГМФ, является создание лекарственных средств, ингибирующих синтез ц-ди-ГМФ за счет подавления активности DGC или усиливающих деградацию ц-ди-ГМФ за счет стимуляции активности PDE. Однако разработка лекарственных средств, снижающих концентрацию ц-ди-ГМФ, связана с определенной сложностью, которая обусловлена тем, что геномы большинства бактерий кодируют многочисленные протеины, содержащие GGDEF-,

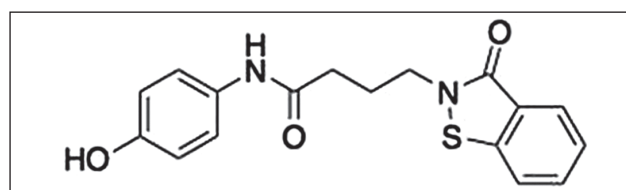


Рисунок 16. Строение молекулы Соединения 1 [58]

EAL- и HD-GYP-домены с различной геометрией активного сайта, и поэтому ингибирование активности данных ферментов невозможно выполнить одним соединением. Например, бактерии *Pseudomonas aeruginosa* продуцируют 18 протеинов с доменом GGDEF, 16 протеинов с доменом GGDEF-EAL, 5 протеинов с доменом EAL и 3 протеина с доменом HD-GYP, а бактерии *Salmonella enterica serovar Typhimurium* синтезируют 12 протеинов с доменом GGDEF и 14 протеинов с доменом EAL. Также продемонстрировано, что ингибирование одного типа молекул DGC не является эффективной стратегией подавления формирования бактериальной биопленки [34].

Дальнейшие разработки лекарственных средств, нацеленных на конкретные DGC и PDE, позволят проводить эффективное лечение бактериальных инфекций, которые сопровождаются формированием биопленок, в зависимости от особенностей причинно-значимого возбудителя.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии какого-либо конфликта интересов и собственной финансовой заинтересованности при подготовке данной статьи.

## References

1. Abaturov AE, Kryuchko TA. Dispersion of bacterial biofilm and chronization of respiratory tract infection. *Zdorov'e rebenka*. 2019;14(5):337-342. doi: 10.22141/2224-0551.14.5.2019.177411. (in Russian).
2. Abaturov AE, Kryuchko TA. Pharmaceutical effect on the biofilm dispersion. Nitric oxide donors. *Zdorov'e rebenka*. 2019;14(7):450-457. doi: 10.22141/2224-0551.14.7.2019.184626. (in Russian).
3. Abaturov AE, Yulish EI. The role of interferons in the protection of the respiratory tract, part 1: Cascade of excitation of the system of interferons. *Zdorov'e rebenka*. 2007;(5):136-144. (in Russian).
4. AbdelKhalek A, Abutaleb NS, Mohammad H, Seleem MN. Repurposing ebselen for decolonization of vancomycin-resistant enterococci (VRE). *PLoS One*. 2018;13(6):e0199710. doi: 10.1371/journal.pone.0199710.
5. Ahonen MJR, Dorrier JM, Schoenfish MH. Antibiofilm Efficacy of Nitric Oxide-Releasing Alginates against Cystic Fibrosis Bacterial Pathogens. *ACS Infect Dis*. 2019;5(8):1327-1335. doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00016.
6. Ahonen MJR, Suchyta DJ, Zhu H, Schoenfish MH. Nitric Oxide-Releasing Alginates. *Biomacromolecules*. 2018;19(4):1189-1197. doi: 10.1021/acs.biomac.8b00063.
7. Allan RN, Kelso MJ, Rineh A, et al. Cephalosporin-NO-donor prodrug PYRRO-C3D shows  $\beta$ -lactam-mediated activity against *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Nitric Oxide*. 2017;65:43-49. doi: 10.1016/j.niox.2017.02.006.
8. Almlad H, Harrison JJ, Rybke M, et al. The Cyclic AMP-Vfr Signaling Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Is Inhibited by Cyclic Di-GMP. *J Bacteriol*. 2015;197(13):2190-2200. doi:10.1128/JB.00193-15.
9. Antoniani D, Bocci P, Maciag A, Raffaelli N, Landini P. Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;85(4):1095-1104. doi: 10.1007/s00253-009-2199-x.
10. Antoniani D, Rossi E, Rinaldo S, et al. The immunosuppressive drug azathioprine inhibits biosynthesis of the bacterial signal molecule cyclic-di-GMP by interfering with intracellular nucleotide pool availability. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(16):7325-7336. doi: 10.1007/s00253-013-4875-0.
11. Barraud N, Kardak BG, Yepuri NR, et al. Cephalosporin-3'-diazoniumdiolates: targeted NO-donor prodrugs for dispersing bacterial biofilms. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2012;51(36):9057-9060. doi: 10.1002/anie.201202414.
12. Chou SH, Galperin MY. Diversity of Cyclic Di-GMP-Binding Proteins and Mechanisms. *J Bacteriol*. 2016;198(1):32-46. doi:10.1128/JB.00333-15.
13. Collins SA, Kelso MJ, Rineh A, et al. Cephalosporin-3'-Diazoniumdiolate NO Donor Prodrug PYRRO-C3D Enhances Azithromycin Susceptibility of Nontypeable *Haemophilus influenzae* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(2):e02086-16. doi: 10.1128/AAC.02086-16.
14. Cutruzzola F, Frankenberger-Dinkel N. Origin and Impact of Nitric Oxide in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J Bacteriol*. 2016;198(1):55-65. doi:10.1128/JB.00371-15.
15. de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Fairfull-Smith KE, Hancock RE. Effect of nitroxides on swarming motility and biofilm formation, multicellular behaviors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(10):4877-4881. doi: 10.1128/AAC.01381-13.
16. Düvel J, Bense S, Möller S, et al. Application of Synthetic Peptide Arrays To Uncover Cyclic Di-GMP Binding Motifs. *J Bacteriol*. 2015;198(1):138-146. Published 2015 Aug 31. doi:10.1128/JB.00377-15.
17. Fernicola S, Paiardini A, Giardina G, et al. In Silico Discovery and In Vitro Validation of Catechol-Containing Sulfonohydrazide Compounds as Potent Inhibitors of the Diguanylate Cyclase PleD. *J Bacteriol*. 2015;198(1):147-156. doi: 10.1128/JB.00742-15.
18. Fernicola S, Torquati I, Paiardini A, et al. Synthesis of Triazole-Linked Analogues of c-di-GMP and Their Interactions with Diguanylate Cyclase. *J Med Chem*. 2015;58(20):8269-8284. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01184.
19. Hasan N, Cao J, Lee J, et al. PEI/NONOates-doped PLGA nanoparticles for eradicating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm in diabetic wounds via binding to the biofilm matrix. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;103:109741. doi: 10.1016/j.msec.2019.109741.
20. Hengge R. Trigger phosphodiesterases as a novel class of c-di-GMP effector proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2016;371(1707):20150498. doi:10.1098/rstb.2015.0498.
21. Jenal U, Reinders A, Lori C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(5):271-284. doi:10.1038/nrmicro.2016.190.
22. Kalia D, Mery G, Nakayama S, et al. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem Soc Rev*. 2013;42(1):305-341. doi:10.1039/c2cs35206k.
23. Kang D, Kirienko NV. High-Throughput Genetic Screen Reveals that Early Attachment and Biofilm Formation Are Necessary for Full Pyoverdine Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2017;8:1707. doi:10.3389/fmicb.2017.01707.
24. Kang D, Turner KE, Kirienko NV. PqsA Promotes Pyoverdine Production via Biofilm Formation. *Pathogens*. 2017;7(1):3. doi:10.3390/pathogens7010003.
25. Karaolis DK, Means TK, Yang D, et al. Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule. *J Immunol*. 2007;178(4):2171-2181. doi:10.4049/jimmunol.178.4.2171.
26. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(12):740-755. doi:10.1038/nrmicro.2017.99.
27. Lieberman OJ, Orr MW, Wang Y, Lee VT. High-throughput screening using the differential radial capillary action of ligand assay identifies ebselen as an inhibitor of diguanylate



- cyclases. *ACS Chem Biol.* 2014;9(1):183–192. doi:10.1021/cb400485k.
28. Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(4):893–916. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x.
29. Matsuyama BY, Krasteva PV, Baraquet C, Harwood CS, Sondermann H, Navarro MV. Mechanistic insights into *c*-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(2):E209–E218. doi:10.1073/pnas.1523148113.
30. McCarthy RR, Valentini M, Filloux A. Contribution of Cyclic di-GMP in the Control of Type III and Type VI Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Mol Biol.* 2017;1657:213–224. doi:10.1007/978-1-4939-7240-1\_17.
31. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. Activation Mechanism and Cellular Localization of Membrane-Anchored Alginate Polymerase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(9):e03499-16. doi:10.1128/AEM.03499-16.
32. O'Connor JR, Kuwada NJ, Huangyutitham V, Wiggins PA, Harwood CS. Surface sensing and lateral subcellular localization of WspA, the receptor in a chemosensory-like system leading to *c*-di-GMP production. *Mol Microbiol.* 2012;86(3):720–729. doi:10.1111/mmi.12013.
33. Oliveira C, Benfeito S, Fernandes C, Cagide F, Silva T, Borges F. NO and HNO donors, nitrones, and nitroxides: Past, present, and future. *Med Res Rev.* 2018;38(4):1159–1187. doi:10.1002/med.21461.
34. Opoku-Temeng C, Sintim HO. Targeting *c*-di-GMP Signaling, Biofilm Formation, and Bacterial Motility with Small Molecules. *Methods Mol Biol.* 2017;1657:419–430. doi:10.1007/978-1-4939-7240-1\_31.
35. Orr MW, Lee VT. A PilZ domain protein for chemotaxis adds another layer to *c*-di-GMP-mediated regulation of flagellar motility. *Sci Signal.* 2016;9(450):fs16. doi:10.1126/scisignal.aai8859.
36. Qvortrup K, Hultqvist LD, Nilsson M, et al. Small Molecule Anti-biofilm Agents Developed on the Basis of Mechanistic Understanding of Biofilm Formation. *Front Chem.* 2019;7:742. doi:10.3389/fchem.2019.00742.
37. Ravichandran A, Ramachandran M, Suriyanarayanan T, Wong CC, Swarup S. Global Regulator MorA Affects Virulence-Associated Protease Secretion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123805. doi:10.1371/journal.pone.0123805.
38. Römling U, Galperin MY. Discovery of the Second Messenger Cyclic di-GMP. *Methods Mol Biol.* 2017;1657:1–8. doi:10.1007/978-1-4939-7240-1\_1.
39. Römling U, Galperin MY, Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013;77(1):1–52. doi:10.1128/MMBR.00043-12.
40. Rong F, Tang Y, Wang T, et al. Nitric Oxide-Releasing Polymeric Materials for Antimicrobial Applications: A Review. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(11):556. doi:10.3390/antiox8110556.
41. Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, et al. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature.* 1987;325(6101):279–281. doi:10.1038/325279a0.
42. Sambanthamoorthy K, Luo C, Pattabiraman N, et al. Identification of small molecules inhibiting diguanylate cyclases to control bacterial biofilm development. *Biofouling.* 2014;30(1):17–28. doi:10.1080/08927014.2013.832224.
43. Sambanthamoorthy K, Sloup RE, Parashar V, et al. Identification of small molecules that antagonize diguanylate cyclase enzymes to inhibit biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(10):5202–5211. doi:10.1128/AAC.01396-12.
44. Schirmer T. *C-di-GMP Synthesis: Structural Aspects of Evolution, Catalysis and Regulation.* *J Mol Biol.* 2016;428(19):3683–3701. doi:10.1016/j.jmb.2016.07.023.
45. Skariyachan S, Sridhar VS, Packirisamy S, Kumargowda ST, Challapilli SB. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiol (Praha).* 2018;63(4):413–432. doi:10.1007/s12223-018-0585-4.
46. Soren O, Rineh A, Silva DG, et al. Cephalosporin nitric oxide-donor prodrug DEA-C3D disperses biofilms formed by clinical cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(1):117–125. doi:10.1093/jac/dkz378.
47. Sortino S. Light-controlled nitric oxide delivering molecular assemblies. *Chem Soc Rev.* 2010;39(8):2903–2913. doi:10.1039/b908663n.
48. Thangamani S, Younis W, Seleem MN. Repurposing ebselen for treatment of multidrug-resistant staphylococcal infections. *Sci Rep.* 2015;5:11596. doi:10.1038/srep11596.
49. Valentini M, Filloux A. Biofilms and Cyclic di-GMP (*c*-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. *Biol Chem.* 2016; 291(24): 12547–12555. doi:10.1074/115.711507.
50. Wang J, Zhou J, Donaldson GP, et al. Conservative change to the phosphate moiety of cyclic diguanylic monophosphate remarkably affects its polymorphism and ability to bind DGC, PDE, and PilZ proteins. *J Am Chem Soc.* 2011;133(24):9320–9330. doi:10.1021/ja1112029.
51. Wang T, Cai Z, Shao X, et al. Pleiotropic Effects of *c*-di-GMP Content in *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol.* 2019;85(10):e00152-19. doi:10.1128/AEM.00152-19.
52. Wei Q, Leclercq S, Bhasme P, et al. Diguanylate Cyclases and Phosphodiesterases Required for Basal-Level *c*-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa* as Revealed by Systematic Phylogenetic and Transcriptomic Analyses. *Appl Environ Microbiol.* 2019;85(21):e01194-19. doi:10.1128/AEM.01194-19.
53. Wo Y, Li Z, Brisbois EJ, et al. Origin of Long-Term Storage Stability and Nitric Oxide Release Behavior of CarboSil Polymer Doped with *S*-Nitroso-*N*-acetyl-*D*-penicillamine. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(40):22218–22227. doi:10.1021/acsami.5b07501.
54. Yan J, Deforet M, Boyle KE, et al. Bow-tie signaling in *c*-di-GMP: Machine learning in a simple biochemical network. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(8):e1005677. doi:10.1371/journal.pcbi.1005677.
55. Yang L, Feura ES, Ahonen MJR, Schoenfisch MH. Nitric Oxide-Releasing Macromolecular Scaffolds for Antibacterial Applications. *Adv Healthc Mater.* 2018;7(13):e1800155. doi:10.1002/adhm.201800155.
56. Yin W, Wang Y, Liu L, He J. Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments. *Int J Mol Sci.* 2019;20(14):3423. doi:10.3390/ijms20143423.
57. Zheng Y, Tsuji G, Opoku-Temeng C, Sintim HO. Inhibition of *P. aeruginosa* *c*-di-GMP phosphodiesterase RocR and swarming motility by a benzoisothiazolinone derivative. *Chem Sci.* 2016;7(9):6238–6244. doi:10.1039/c6sc02103d.
58. Zhou E, Seminara AB, Kim SK, Hall CL, Wang Y, Lee VT. Thiol-benzo-triazolo-quinazolinone Inhibits Alg44 Binding to *c*-di-GMP and Reduces Alginate Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chem Biol.* 2017;12(12):3076–3085. doi:10.1021/acscchembio.7b00826.

Получено/Received 23.12.2019

Рецензировано/Revised 14.01.2020

Принято в печать/Accepted 23.01.2020 ■

**Information about author**

A.E. Abatur, MD, PhD, Professor, Head of the Department of pediatrics 1 and medical genetics, State Institution "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine", Dnipro, Ukraine; e-mail: alexabatur@i.ua; ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-6291-5386>

Абатур О.Є.

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро, Україна

### Медикаментозне управління диспергуванням біоплівки за рахунок регуляції активності бактеріального циклічного дигуанозинмонофосфату (частина 2)

**Резюме.** Інфекційний процес, викликаний патогенними бактеріями, може супроводжуватися формуванням біоплівки, що зумовлює збереження бактерій і зниження ефективності дії антибактеріальних засобів. Розробка препаратів, що сприяють диспергуванню бактеріальної біоплівки, є одним з найважливіших терапевтичних напрямків, що сприяють вирішенню проблеми лікування бактеріальних інфекцій, викликаних мікроорганізмами, резистентними до дії антибактеріальних засобів. Однією з цільових молекул, що беруть участь у формуванні бактеріальних біоплівок і можуть бути піддані медикаментозній регуляції, є вторинна месенджерна нуклеозидна молекула — циклічний дигуанозинмонофосфат (ц-ди-ГМФ). Медикаментозне пригнічення внутрішньобактеріальної концентрації месенджерної молекули ц-ди-ГМФ або блокування її активності дозволяє запобігти формуванню і викликати руйнування бактеріальної біоплівки, що супроводжується збільшенням ефективності лікування бактеріальних інфекцій. Зниження рівня внутрішньобактеріальної

концентрації ц-ди-ГМФ може бути досягнуто інгібуванням процесів синтезу за рахунок 1) пригнічення активності DGC; 2) обмеження доступності субстратів, необхідних для синтезу ц-ди-ГМФ; 3) посилення деградації молекули ц-ди-ГМФ за рахунок підвищення активності PDE. Терапія інфекційних захворювань, які супроводжуються формуванням біоплівок, вимагає медикаментозної індукції диспергування бактерій із біоплівок і застосування цілеспрямованих антибіотичних лікарських засобів, що викликають загибель вивільнених із біоплівок бактерій. Використання аналогів ц-ди-ГМФ, що порушують функціонування нативного ц-ди-ГМФ, і блокування таргетних рецепторів та інших молекулярних структур також може призводити до диспергування бактеріальної біоплівки. Лікарські засоби, що модулюють активність ц-ди-ГМФ, дозволять підвищити ефективність лікування бактеріальних інфекцій, що супроводжуються формуванням біоплівок.

**Ключові слова:** бактеріальні біоплівки; диспергування; ц-ди-ГМФ; антибіоплівкова терапія

A.E. Abatur

State Institution "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine", Dnipro, Ukraine

### Drug control of biofilm dispersion due to regulation of the activity of bacterial cyclic guanosine monophosphate (part 2)

**Abstract.** The infectious process caused by pathogenic bacteria can be accompanied by the formation of a biofilm, which determines the safety of bacteria and a decrease in the effectiveness of antibacterial agents. The development of drugs that contribute to the dispersion of bacterial biofilms is one of the most important therapeutic areas that contribute to solving the problem of treating bacterial infections caused by microorganisms that are resistant to antibacterial agents. One of the target bacterial molecules involved in biofilm formation, which can be subjected to drug regulation, is a secondary messenger nucleoside molecule — cyclic dinucleotide GMP (c-di-GMP). Drug suppression of the level of intra-bacterial concentration of the messenger molecule of c-di-GMP or blocking its activity helps prevent the formation and causes the destruction of the bacterial biofilm, which is accompanied by an increase in the level of effectiveness of treatment of bacterial infections. A decrease in the level of intra-bacterial concentration of c-di-GMP can be

achieved by inhibiting the synthesis processes due to: 1) suppression of diguanylate cyclase activity; 2) restrictions on the availability of substrates required for the synthesis of c-di-GMP; 3) increased degradation of the c-di-GMP molecule due to activation of phosphodiesterase activity. The treatment of infectious diseases, which are accompanied by the formation of biofilms, requires the medical induction of the dispersion of bacteria from biofilms and the use of targeted antibiotic drugs that cause the death of bacteria released from biofilms. The use of analogues of c-di-GMP, which disrupt the functioning of native c-di-GMP, and the blocking of targeted receptors and other molecular structures can also lead to dispersion of the bacterial biofilm. Medicines that modulate the activity of c-di-GMP will increase the effectiveness of the treatment of bacterial infections, which are accompanied by the formation of biofilms.

**Keywords:** bacterial biofilms; dispersion; c-di-GMP; antibiofilm therapy