

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НА МИКРОБИАЛНИ БИОСЪРФАКТАНТИ ОТ ПАТОГЕННИ МИКРООРГАНИЗМИ С АЛВЕОЛАРЕН СЪРФАКТАНТ

Е. Стоименова*, **Е. Василева - Тонкова****, **А. Йорданова***, **З. Лалчев*****

* СУ „Св. Кл. Охридски” Медицински факултет; 1407 София, България

** БАН Институт по микробиология „Стефан Ангелов”; 1113 София, България

*** СУ „Св. Кл. Охридски” Биологически факултет; 1164 София, България

INTERACTION OF MICROBIAL BIOSURFACTANTS FROM PATHOGENIC MICROORGANISMS WITH ALVEOLAR SURFACTANT

E. Stoimenova*, **E. Vasileva – Tonkova****, **A. Jordanova***, **Z. Lalchev*****

* St. Kliment Ohridsky University of Sofia, Faculty of Medicine, 1407 Sofia, Bulgaria,
emyks@abv.com

** BAS, Institute of Microbiology, 1113 Sofia, Bulgaria

*** St. Kliment Ohridsky University of Sofia, Faculty of Biology, 1164 Sofia, Bulgaria

ABSTRACT

The alveolar surfactant is a mixture of lipids and protein which cover tightly the lungs and lowers surface tension of the air/water interface. Changes in the composition of the alveolar surfactant lead to disturbances in gas exchange. *Pseudomonas sp.* includes variety of microorganisms widely distributed in nature. They secrete various exotoxins, including two types rhamnolipids for which is found that are virulence factors. *Ps.aeruginosa* frequently can be found in lungs of patients with compromised immune systems. It is important to clarify the mechanism of intercalation and reaction of these rhamnolipids with the exogenous surfactant preparation *Curosurf*, (used in clinical practice) which quality analogue of the alveolar surfactant.

Key words: rhamnolipids, surfactant preparation, *Pseudomonas*, surface properties

УВОД

Алвеоларният сърфактант (АС) е сложен липопротеинен комплекс, който покрива алвеолите на въздушно-водната фазова граница в белия дроб. Негова главна функция е да намалява повърхностното напрежение при издишване, предотвратявайки алвеоларния колапс, като има значение и за имунната защита на белия дроб [10, 11, 14]. Недостигът на АС, както и отклонения в оптималния му биохимичен състав водят до нарушения на респираторната дейност. Клиничното приложение на синтетични и естествени екзогенни сърфактантни препарати има животоспасяваща роля при терапията на някои респираторни проблеми, тъй като компенсират недостига на АС [2, 4, 5].

От друга страна бактериите от рода *Pseudomonas* са повсеместно разпространени микроорганизми и преди въвеждането на асептиката са били най-честия патоген, предизвикващ домашни и вътреболнични инфекции. Бактерии от вида *Ps. aeruginosa* се откриват в белите дробове на пациенти с потисната имунна система, например при муковисцидоза, пневмония и други белодробни заболявания, но не засягат здрави хора [1, 8, 15]. Механизмът на патогенезата не е напълно изяснен, но се предполага че се дължи на отделянето на вирулентни фактори [9].

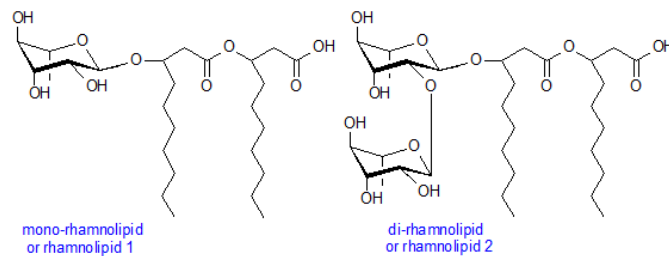
Ps. aeruginosa секретира различни екзотоксини, сред които са два класа рамнолипиди [12]. В научната литература има противоречиви данни за ролята и въздействието на рамнолипидите – според някои данни водят до сепсис и развитие на синдром на септичния шок, докато други изследвания показват, че рамнолипидите ограничават растежа на *Bacillus subtilis* и имат зооспорицидна активност, като вероятно механизмът на действие включва

интеркалация на рамнолипидите в плазмената мембрана и последващото ѝ разрушаване [6, 13, 7].

При всички докладвани в научната литература случаи се осъществява междумолекулно взаимодействие между секретирани от микроорганизмите рамнолипиди и компонентите на алвеоларния сурфактант. Ето защо е важно да се изясни биофизичния механизъм на взаимодействие на пречистени рамнолипиди от *Pseudomonas* с моделни алвеоларни системи, формирани от един от най-често използваните в клиничната практика екзогенен сурфактантен препарат *Curosurf*, който се явява аналог на нативния алвеоларен сурфактант.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Рамнолипиди: Сместа от R1 и R2 (фиг.1) в съотношение 3:7, са изолирани и пречистени в Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, БАН.



Фигура 1. Структурни формули на използваните рамнолипиди

Curosurf е естествен сурфактантен препарат, получен от свински бял дроб, който съдържа воден разтвор на фосфолипиди (ФЛ) с концентрация 80mg/ml, от които най-много е фосфатидилхолин (около 70% от общото фосфолипидно съдържание) и около 1% са специфични нискомолекулни хидрофобни протеини SP-B и SP-C.

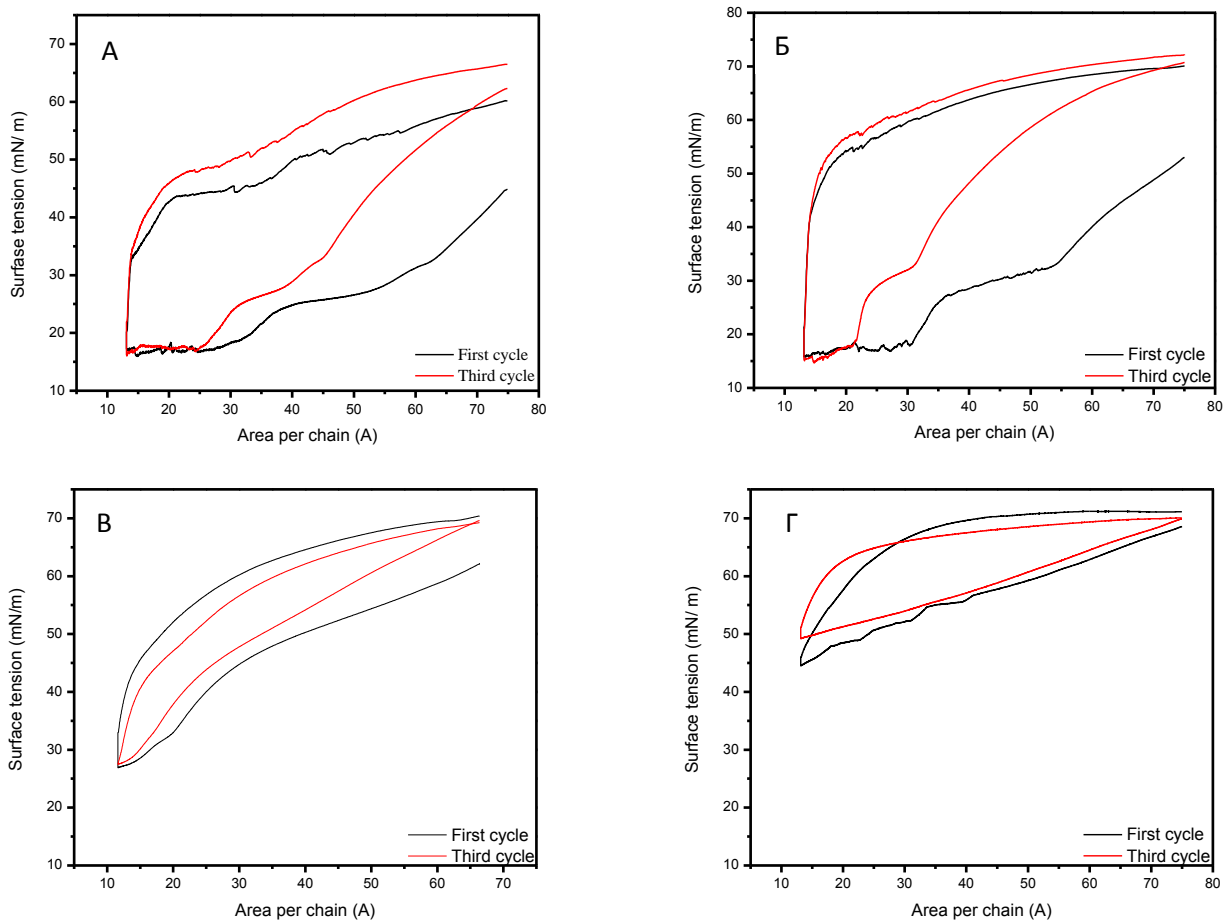
Тензиометрични измервания: Използвана е тензиометрична везна MicroTrough X, Kibron Inc., Finland и посредством метода на Wilhelmy е измерено повърхностното напрежение на чистите рамнолипиди, *Curosurf* и смесите им. Везната на Лангмюир се състои от вана, в която с помощта на микроспринцовка тип *Hamilton*, върху подложка от 0,15 M NaCl се формират монослое от чисти рамнолипиди, *Curosurf* и смеси между тях в различни съотношения, които се компресират/декомпресират 5-кратно (аналогично на дихателния процес). Направени са измервания на три цикъла компресия/декомпресия за всеки монослой. Повърхностното напрежение се измерва чрез платинена игла, потопена в обемната фаза и свързана с прецизна везна, която измерва силата на притегляне от субфазата.

Резултати и обсъждане

В настоящата работа е изследвано влиянието на рамнолипиди, секретирани от патогенни микроорганизми, върху повърхностното поведение и свойствата на алвеоларния сурфактант. Рамнолипидите са микробиални сурфактанти и са част от екзотоксините, отделяни от патогенни бактерии от род *Pseudomonas* при белодробни инфекции на хора с потисната имунна система. Като моделна система на АС е използван екзогенният сурфактантен препарат *Curosurf*, който съдържа висок процент фосфолипиди, по – голямата част от които е дипалмитоилфосфатидилхолин, както и специфични сурфактантни белтъци.

В съответствие с литературните данни [5] в проведените от нас експерименти *Curosurf* достига ниски минимални стойности на повърхностното напрежение, които се отчитат при компресия на монослоя до 20% от първоначалната площ (Таблица 1, фиг. 2А). Регистрирането на подобни ниски стойности е характерно за нативния АС – по този начин се предотвратява колапса на алвеолите при издишване. При динамичната компресия на монослое от *Curosurf* след третия цикъл се наблюдава загуба на повърхностно активни

вещества (ПАВ) в обема, което води до по - високи стойности на γ_{\max} , и запазване на ниските стойности на γ_{\min} (Таблица 1, фиг. 2А). В резултат на загубата на ПАВ от формирания монослой площта на хистерезисната бримка намалява значително след третия цикъл на компресия, в сравнение с първия (Фиг. 2А).



Фигура 2. Хистерезисни бримки, получени при първи и трети цикъл на компресия/декомпресия на монослоеве от: **А.** Curosurf; **Б.** Curosurf:рамнолипиди в съотношение 3:1; **В.** Curosurf:рамнолипиди в съотношение 1:3; **Г.** Рамнолипиди

При попадане на патогенни бактерии от рода *Pseudomonas* в белия дроб на хора с потисната имунна система бактериите отделят повърхностно активни рамнолипиди, които се смесват с компонентите на алвеоларния сурфактант и променят състава, структурата и съответно свойствата му. Тестваните от нас микробни рамнолипиди показват по - слабо разтичане на въздушно/водната фазова граница в сравнение с Curosurf (Таблица 1, фиг. 2Г) и достигане на значително по-високи стойности на равновесното повърхностно напрежение (68,6 mN/m), както и на динамичните параметри на формирания монослой, като максималните стойности се доближават до тези на чистата субфаза. В допълнение, формираните монослоеве само от рамнолипиди при повърхностна концентрация 150 \AA^2 начална площ на молекула не достигат до колапс, т.е. при компресия на монослоя до 20% от първоначалната площ молекулите на рамнолипидите не формират течно - кондензиран монослой при зададената им крайна повърхностна концентрация от 30 \AA^2 на молекула.

Таблица 1. Стойности на равновесни (γ_{eq}) и динамични (γ_{min} и γ_{max}) повърхностни характеристики на монослоеове от различни липиди и техни смеси при три последователни цикъла на компресия/декомпресия

	γ_{eq}	γ_{min} (cycle 1)	γ_{max} (cycle 1)	γ_{min} (cycle 2)	γ_{max} (cycle 2)	γ_{min} (cycle 3)	γ_{max} (cycle 3)
Curosurf	44.8	17	60.2	16.7	63.1	16.2	66.5
Curosurf: Рамнолипиди 3:1	53	16	70	16.8	71	15.3	72.1
Curosurf: Рамнолипиди 1:1	61	24.4	70.4	27	72.3	28.3	72.5
Curosurf: Рамнолипиди 1:3	62	27	70.4	27.1	69.7	27.5	69.2
Рамнолипиди	68.6	44.5	71.2	49.6	69.9	49.2	70.1

Смесените монослоеове от *Curosurf* и рамнолипиди (в различни съотношения 3:1, 1:1 и 1:3) показват междинни повърхностни характеристики, в сравнение с чистите сурфактанти (Таблица 1, фиг. 2Б и 2В). С увеличаване на количеството на рамнолипидите, спрямо количеството на *Curosurf*, се повишават значително стойностите на равновесното повърхностно напрежение (от 53 mN/ при съотношение 3:1 *Curosurf*:рамнолипиди до 62 mN/m за съотношение 1:3). Тези резултати са в съгласие с някои литературни данни [3], които потвърждават негативното влияние на рамнолипидите върху АС. При динамичните условия на компресия/декомпресия в продължение на три последователни цикъла се наблюдава и изменение в динамичните параметри на смесените монослоеове с изключение на γ_{min} , чиято стойност се запазва за всеки от изследваните смесени монослоеове. С увеличаване на количеството на рамнолипидите обаче, този параметър значително се повишава (от 16 mN/m при съотношение 3:1 до 27 mN/m при съотношение 1:3, фиг. 2Б и 2В). При смесените монослоеове се наблюдава и намаляване на площта на хистерезисните бримки (до 50% от първоначалната площ) при динамичните условия на трите цикъла компресия/декомпресия, като максималното повърхностно напрежение не се повлиява значително (фиг. 2Б и 2В).

Резултатите от нашето изследване показват, че добавянето и увеличаването на количеството рамнолипиди към аналога на нативния АС *Curosurf* води до промяна на повърхностните параметри на смесените монослоеове, в сравнение с тези, формирани от чист *Curosurf*. Това се потвърждава и от публикувани в литературата данни за предизвикани от рамнолипидите негативни изменения на свойствата и повърхностните характеристики на алвеоларния сурфактант, водещи до респираторни нарушения, особено при хора с потисната имунна система [1, 5, 15].

Получените предварителни резултати ще бъдат полезни както във фундаментален (за изясняване на ролята и въздействието на рамнолипидите върху белодробната функция в норма и патология), така и в приложно-клиничен аспект при терапия и лечение на пациенти с компрометирана имунна система.

Благодарности:

Тази работа е осъществена с финансовата подкрепа на Фонд "Научни изследвания" на Софийски Университет „Св.Климент Охридски“ по Договор за научни изследвания №046/18.04.2013 г.

Литература:

1. Cebular, S., S. Lee, P. Tolaney, L. Lutwick, 2003. Community-acquired pneumonia in immunocompromised patients. Opportunistic infections to consider in differential diagnosis, Postgrad. Med., 113:65–66.

2. Christova Y., E. Enchev, Z. Lalchev, 1998. Effects of pulmonary surfactant proteins SP-B and SP-C and calcium ions on the surface properties of hydrophobic fractions of lung surfactant, *Eur. Biophys. J.*, 28:59-66.
3. Cohen R., R. Todorov, G. Vladimirov, D. Exerowa, 2010. Effect of rhamnolipids on pulmonary surfactant foam films, *Langmuir*, 26:9423-9428.
4. Jordanova A., A. Tsanova, J. Doumanov, D. Chakarov, G. Georgiev, E. Christova, C. Vassilieff, Z. Lalchev, 2010. Effect of administration of surfactant therapy in newborns with neonatal respiratory distress syndrome, *Acta Medica Bulgarica*, 37:32-39.
5. Lalchev Z., G. Georgiev, A. Jordanova, R. Todorov., E. Christova, C. Vassilieff, 2004. A comparative study of exogenous surfactant preparations and tracheal aspirate: interfacial tensiometry and properties of foam films, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 33:227-234.
6. Lang, S., E. Katsiwela, F. Wagner, 1989. Antimicrobial effects of biosurfactants, *Fat Sci. Technol.* 91:363–366.
7. Lang, S., F. Wagner, In: Kosaric, N. (Ed.), *Biosurfactant Properties and Applications*, vol. 48. Marcel Dekker, New York, 251–261, 2003.
8. Martinez-Solano L., M. Macia, A. Fajardo, A. Oliver, J. Martinez, 2008. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease, *Clinical Infectious Diseases*, 47:1526–1533.
9. Moss, J., M.E. Ehrmantraut, B.D. Banwart, D.W. Frank, J.T. Barrieri, 2001. Sera from adult patients with cystic fibrosis contain antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* type III apparatus, *Infect. Immun.*, 69:1185–1188.
10. Pelerman, R., M. Engle, P. Farrell, 1981. Perspectives on fetal lung development. *Lung*, 159:53-59.
11. Pison, U., A. Neuendank, S. Weissbach, S. Pietschmann, 1994. High performance liquid chromatography of adult human bronchoalveolar lavage: assay for phospholipid lung profile, *Eur. J. Clin. Invest.*, 24:586-599.
12. Rendell N.B., G.W. Taylor, M. Somerville, H. Todd, R. Wilson, J. Cole, 1990. Characterisation of *Pseudomonas* rhamnolipids. *BBA*, 1045:189-193.
13. Stanghellini M.E., R.M. Miller, 1997. Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoospore plant pathogens, *Plant Dis.*, 81:4–12.
14. van Golde LM, 1995. Potential role of surfactant proteins A and D in innate lung defense against pathogens. *Biol Neonate*, 67:2-17.
15. Wang J, B. Yu, D. Tian, M. Ni, 2013. Rhamnolipid but not motility is associated with the initiation of biofilm seeding dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA17, *J. Biosci.*, 38:149–156.