

Application of polymeric amines as adjuvants to overcome resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to tetracycline

Annenkov V.V.*^{ORCID}, Pal'shin V.A.^{ORCID}, Zelinsky S.N.^{ORCID}, Suslova M.Yu.^{ORCID},
Lipko I.A.^{ORCID}, Danilovtseva E.N.^{ORCID}

Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 3 Ulan-Batorskaya Str., Irkutsk, 664033, Russia

ABSTRACT. Overcoming antibiotic resistance in pathogenic microorganisms is important due to the proliferation of initially resistant species whose resistance has increased over decades of antibiotic use. A significant danger is caused by *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter, 1872) Migula, 1900 (blue bacillus), which possesses a strong cell membrane and is capable of forming biofilms around colonies. We found that hydrophilic polyvinylamine, which does not contain any specific functional groups and binding centers, is able to significantly enhance the sensitivity of *Ps. aeruginosa* to tetracycline. The minimum inhibitory concentration was 0.26-1.16 µg/mL depending on the density of the initial culture of *Ps. aeruginosa*, which corresponds to the values for sensitive microorganisms.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, blue bacillus, tetracycline, polyvinylamine, adjuvant

For citation: Annenkov V.V., Pal'shin V.A., Zelinsky S.N., Suslova M.Yu., Lipko I.A., Danilovtseva E.N. Application of polymeric amines as adjuvants to overcome resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to tetracycline // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 1. - P. 178-186. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-1-178

1. Introduction

The progress in the fight against bacterial infections, primarily due to the use of antibiotics, has as a side effect not only the emergence of antibiotic-resistant strains, but also a greater spread of bacteria that originally had defense mechanisms against external influences. A significant danger is caused by *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter, 1872) Migula, 1900 (blue bacillus), which is responsible for infectious diseases of respiratory organs, gastrointestinal tract, urinary tract, circulatory system, etc. (Osmon et al., 2004). (Osmon et al., 2004; Wood et al., 2023). This bacterium actively infects organisms weakened by other diseases, which makes it playing an increasing role in hospital-acquired infections. Antibiotic resistance of *Ps. aeruginosa* is associated with both acquired genetically anchored mechanisms of resistance to certain classes of substances, as well as with the existing efflux system (active excretion of antibiotics from the cell) and poor permeability of the cell membrane, which is characteristic of Gram-negative bacteria (Jin, 2024). In addition, these bacteria can form biofilms that also prevent drug penetration (Thi et al., 2020).

The use of adjuvants, chemical compounds that weaken bacterial defenses, such as those that disrupt

biofilms and increase cell membrane permeability, is one strategy to overcome antibiotic resistance (Douafer et al., 2019). A number of adjuvants have been tested to enhance the activity of tetracycline and its derivatives against *Ps. aeruginosa* (Borselli et al., 2017; Troudi et al., 2020; 2021; Wang et al., 2021; Troïa et al., 2022). Polyaminofarnesyl and polyaminogeranyl derivatives containing 3-4 amino groups and a hydrophobic fragment showed sufficiently high activity (Troudi et al., 2020; 2021). The use of these substances made it possible to reduce the effective concentrations of tetracyclines to 2 µg/mL and below, which is within the range of values for tetracycline-sensitive Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) Cohn 1872 (Minzdrav RF, 2018).

While tetracycline was synthesized about 70 years ago (Stephens et al., 1952), it is still actively used in the control of anthrax (*Bacillus anthracis* Cohn 1872), rickettsioses (*Rickettsia species*), respiratory diseases (*Mycoplasma pneumoniae* Somerson et al. 1963), pneumonia (*Chlamydomphila pneumoniae* (Grayston et al. 1989) Everett et al. 1999), periodontitis, acne, rosacea (Roberts, 2003).

Tetracycline (Scheme 1) is an amphoteric compound with several ionizable functional groups responsible for their corresponding pKa values: a tricarbonyl-

*Corresponding author.

E-mail address: annenkov@lin.irk.ru, annenkov@yahoo.com (V.V. Annenkov)

Received: November 18, 2024; **Accepted:** December 04, 2024;
Available online: February 26, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



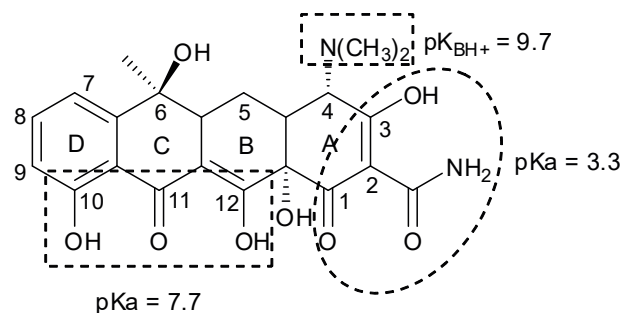
amide (C-1:C-2:C-3, $pK_a = 3.3$), a phenolic diketone (C-10:C-11:C-12, $pK_a = 7.7$) and a dimethyl amino group (C-4, $pK_{BH^+} = 9.7$). Therefore, under acidic, slightly acidic, neutral and alkaline conditions, tetracycline exists in cationic, zwitterionic and anionic forms, respectively (Gu and Karthikeyan, 2005). Problems in its use are related to the existing or developed resistance of several pathogens (Opal and Pop-Vicas, 2015; Grossman, 2016; Unemo et al., 2024). In addition, some difficulties are caused by the reduced solubility of tetracycline in the physiological pH range: about 22-27 $\mu\text{g/mL}$ in acetate/phosphate buffer solutions in the pH range of 5-7 (Ahmed and Jee, 1985; Meretoudi et al., 2020). In this regard, the common dosage form of tetracycline is its hydrochloride, and the efficacy of amine-containing adjuvants may be related to both their ability to disrupt bacterial membranes and biofilms and their interaction with the tetracycline molecule, increasing its solubility and bioavailability. In the study of low molecular weight compounds as adjuvants (Troudi et al., 2021), the need for a combination of hydrophobic and basic hydrophilic fragments in the molecules was noted. At the same time, the ability of polyamines to penetrate living cells is known, which makes them promising as nucleic acid delivery agents in gene therapy and genetic engineering (Boussif et al., 1995; Tian et al., 2022; 2024). Polyvinylamine (PVA) is one of the simplest in structure polymeric amines (Scheme 2), available in the form of fractions with a narrow molecular weight distribution when obtained by hydrolysis of fractionated polyvinylformamide (Annenkov et al., 2011).

This work is aimed at studying the adjuvant activity of PVA in relation to tetracycline when acting on *Ps. aeruginosa* bacteria. We also evaluated the adjuvant activity of oligopropylamine (Scheme 2), which is similar to compounds found in the valves of diatom algae (Sumper and Kröger, 2004).

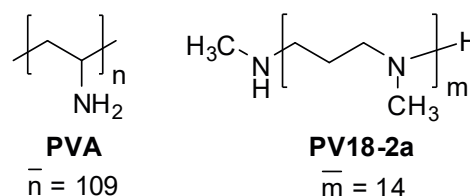
2. Materials and methods

PVA fraction of molecular mass 4.7 kDa obtained according to (Annenkov et al., 2011) was used in this work. Oligomeric polyamine PV18-2a, fraction 1.0. kDa, was synthesized according to the method of (Annenkov et al., 2018). Tetracycline was prepared from its hydrochloride (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., lot 38614) according to the method (Kardys and Conn, 1961). Solutions for testing antimicrobial activity were prepared by dissolving the components in physiological solution (150 mM NaCl), the pH value was adjusted to 7.4 by adding 0.1 M HCl or NaOH. The prepared solutions were sterilized by filtration through syringe filters (0.22 μm , Sartorius AG, Germany).

Antimicrobial activity was evaluated by the method of diffusion in agar on dense nutrient medium by comparing the size of the zones of growth suppression of the microorganism (Minzdrav RF, 2018). Sterile nutrient medium GMF-agar (LLC "NICF" series 1151221, valid till 12.2024), pre-seeded with test microorganism - *Pseudomonas aeruginosa* 27853, was poured into plastic disposable Petri dishes with diameter 90 mm



Scheme 1. Structure of tetracycline and ionization constants of its functional groups.



Scheme 2. Structures of PVA and oligopropylamine PV18-2a.

(JSC "Firma Medpolymer", Saint-Petersburg, series 011032024, valid till 03.2027). Culture suspension was prepared using turbidity standard SOP №1-98-15 BAK-10 (from 19.04.2024, valid until 19.04.2025) in sterile physiological solution, after which it was added to nutrient medium ($49 \pm 1^\circ\text{C}$) at the rate of 1 mL per 100 mL. To determine the number of bacterial cells in 1 mL of suspension, a series of dilutions were made followed by sowing on GMF-agar. Thus, the number of *Ps. aeruginosa* introduced into a Petri dish was $4.5 \cdot 10^9$ cl/mL.

After solidification of the nutrient medium in a Petri dish, 6 wells with a diameter of 8.1 mm and a height of 6.5 mm were made using a hollow tube. 150 μl of test solutions were added into the wells. Working solutions of the tested substances were prepared in different concentrations. Each experiment was carried out in three replicates. After the solutions were added, the dishes were left at room temperature for an hour, then incubated at $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ for 16-18 hours.

A typical view of a Petri dish after cultivation is shown in Fig. 1. The diameter and width of the zones of growth suppression of the test microorganism were measured using a digital caliper, with an accuracy of 0.1 mm. The values of minimum inhibitory concentration (MIC) were found similarly (Bonev et al., 2008) from the dependence $\ln(C)$ vs l^2 , where C is the concentration of the active substance, l is the width of the inhibition zone. The dependence was approximated by a linear equation with a free term equal to $\ln(\text{MIC})$.

3. Results and discussion

Tetracycline suppresses the growth of *Ps. aeruginosa* at rather high concentrations (Fig. 1), its MIC is 46.8 $\mu\text{g/mL}$, which is consistent with the data obtained using the dilution method of microbial suspension in a 96-well plate (Troudi et al., 2021). Experiments in the presence of 100 $\mu\text{g/mL}$ PVA showed (Fig. 2) a significant increase in tetracycline activity, its MIC decreased

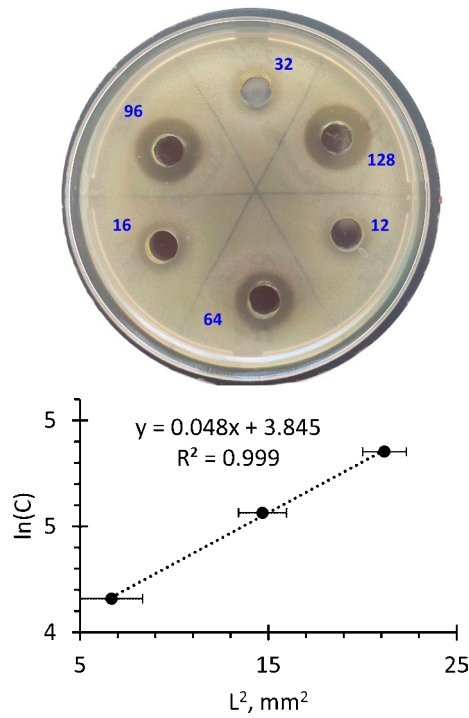


Fig.1. Photograph of a Petri dish after the action of tetracycline in different concentrations ($\mu\text{g/mL}$, indicated near the wells). At the bottom is the dependence of the logarithm of tetracycline concentration ($\mu\text{g/mL}$) on the square of the radius of the inhibition zone (mm). The MIC was $46.8 \mu\text{g/mL}$.

to 1.16 and $0.26 \mu\text{g/mL}$ depending on the density of the initial culture of *Ps. aeruginosa*. These values exceeded the best values of $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ for polyaminofarnesyl and polyaminogeranyl derivatives (Troudi et al., 2020; 2021). PVA in the absence of tetracycline begins to inhibit the growth of *Ps. aeruginosa* only at a concentration of $200 \mu\text{g/mL}$. When PVA and $12 \mu\text{g/mL}$ tetracycline were co-administered (Fig. 3), the MIC of PVA was $57 \mu\text{g/mL}$.

Polyamine PV18-2a (Scheme 2), which is an analog of biogenic polyamines from valves of diatom algae (Sumper and Kröger, 2004), was also tested as an adjuvant for tetracycline. PV18-2a is an oligomeric compound with an average molecular mass of 1.0 kDa . The elemental unit of PV18-2a contains a higher number of hydrocarbon groups compared to PVA and possesses certain hydrophobic properties, in particular the ability to associate in aqueous medium (Annenkov et al., 2024). It also enhances the antibacterial activity of

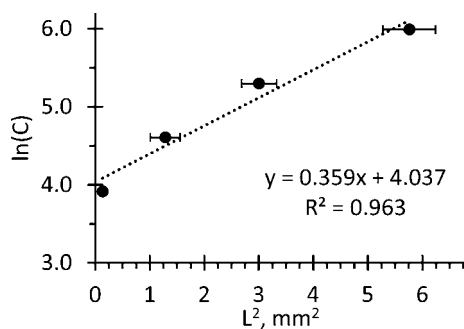


Fig.3. Dependence of the logarithm of the concentration of PVA (4.7 kDa) on the square of the radius of the inhibition zone (mm) in the presence of tetracycline ($12 \mu\text{g/mL}$). The MIC was $57 \mu\text{g/mL}$.

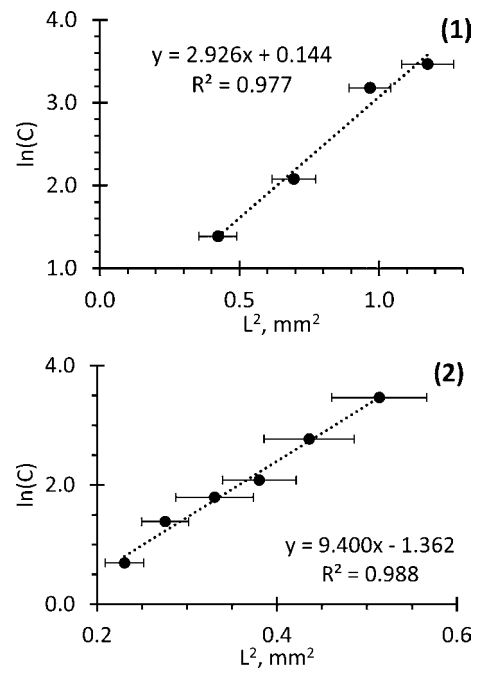


Fig.2. Dependence of the logarithm of tetracycline concentration ($\mu\text{g/mL}$) on the square of the radius of the inhibition zone (mm) in the presence of $100 \mu\text{g/mL}$ PVA. (1) - culture density of $4.5 \cdot 10^9 \text{ cl/mL}$, (2) - 10^5 cl/mL . MIC: 1.16 (1) and 0.26 (2) $\mu\text{g/mL}$.

tetracycline up to MIC $6.3 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 4), which is significantly lower than the MIC of free tetracycline.

4. Conclusions

Thus, we found that hydrophilic polyvinylamine, which does not contain any specific functional groups and binding centers, is able to significantly enhance the sensitivity of *Ps. aeruginosa* to tetracycline, reducing its active concentrations to the values characteristic of sensitive microorganisms. Taking into account the ability of polyamine PV18-2a to also act as an adjuvant to the *Ps. aeruginosa* - tetracycline system, the activity of polyvinylamine can be attributed to the presence of multiple amino groups capable of association with cell membranes and biofilms. It can be assumed that varying the structure and molecular weight of polymeric amines will yield more effective adjuvants capable of inhibiting antibiotic resistance of microorganisms.

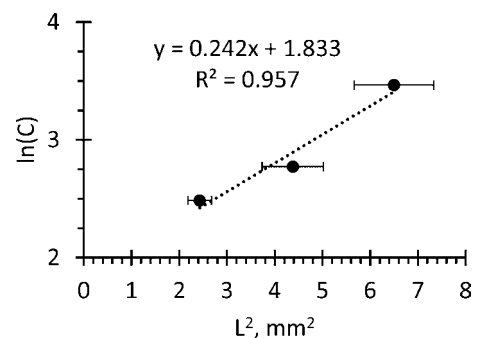


Fig.4. Dependence of the logarithm of tetracycline concentration ($\mu\text{g/mL}$) on the square of the radius of the inhibition zone (mm) in the presence of $100 \mu\text{g/mL}$ PV18-2a. The MIC was $6.25 \mu\text{g/mL}$.

Acknowledgements

This research was funded by the Russian Science Foundation, grant number 22-15-00268, <https://rscf.ru/en/project/22-15-00268/>.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Ahmed B.M., Jee R.D. 1985. The acidity and solubility constants of tetracyclines in aqueous solutions. *Analytica Chimica Acta* 166: 329-333. DOI: [10.1016/S0003-2670\(00\)84886-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)84886-2)
- Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Pal'shin V.A. et al. 2011. Poly (vinyl amine) – silica composite nanoparticles: models of the silicic acid cytoplasmic pool and as a silica precursor for composite materials formation. *Biomacromolecules* 12: 1772–1780. DOI: [10.1021/bm2001457](https://doi.org/10.1021/bm2001457)
- Annenkov V.V., Maheswari K.U., Pal'shin V.A. et al. 2018. Design of oligonucleotide carriers: importance of polyamine chain length. *Polymers* 10(12): 1297. DOI: [10.3390/polym10121297](https://doi.org/10.3390/polym10121297)
- Annenkov V.V., Zelinskiy S.N., Palshin V.A. et al. 2024. Polyamines: association in aqueous medium and promising transport vesicles. *Journal of Molecular Liquids* 396: 1-13. DOI: [10.1016/j.molliq.2024.124038](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124038)
- Bonev B., Hooper J., Parisot J. 2008. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61(6): 1295-301. DOI: [10.1093/jac/dkn090](https://doi.org/10.1093/jac/dkn090)
- Borselli D., Blanchet M., Bolla J.M. et al. 2017. Motuporamine derivatives as antimicrobial agents and antibiotic enhancers against resistant gram-negative bacteria. *Chembiochem* 18: 276–283. DOI: [10.1002/cbic.201600532](https://doi.org/10.1002/cbic.201600532)
- Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A. et al. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *PNAS* 92: 7297-7301. DOI: [10.1073/pnas.92.16.7297](https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297)
- Douafer H., Andrieu V., Phanstiel O. et al. 2019. Antibiotic adjuvants: make antibiotics great again! *Journal of Medicinal Chemistry* 62(19): 8665-8681. DOI: [10.1021/acs.jmedchem.8b01781](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01781)
- Grossman T.H. 2016. Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6(4): a025387. DOI: [10.1101/cshperspect.a025387](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387)
- Gu C., Karthikeyan K.G. 2005. Interaction of tetracycline with aluminum and iron hydrous oxides. *Environmental Science & Technology* 39(8): 2660-2667. DOI: [10.1021/es048603o](https://doi.org/10.1021/es048603o)
- Jin S. 2024. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Tang Y.W., Hindiyeh M.Y., Liu D et al. (Eds.), *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier Ltd. 3 ed, ch 39, pp. 811-826. DOI: [10.1016/B978-0-12-818619-0.00064-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818619-0.00064-2)
- Kardys J.A., Conn G. 1961. Tetracycline purification process. US Patent No. 3,013,074
- Meretoudi A., Banti C.N., Sifarika P. et al. 2020. Tetracycline water soluble formulations with enhanced antimicrobial activity. *Antibiotics* 9: 845. DOI: [10.3390/antibiotics9120845](https://doi.org/10.3390/antibiotics9120845)
- Minzdrav RF, Farmakopejnyj komitet. 2018. Opređenje antimikrobnoj aktivnosti antibiotikov metodom difuzii v agar. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii XIV izdaniya. Obshchaya farmakopejnaya stat'ya OFS.1.2.4.0010.18
- Opal S.M., Pop-Vicas A. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Bennett J.E., Dolin R., Blaser M.J. (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Elsevier Inc, 8 ed, pp. 235-251. DOI: [10.1016/B978-1-4557-4801-3.00018-7](https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00018-7)
- Osmon S., Ward S., Fraser V.J. et al. 2004. Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 125(2): 607-616. DOI: [10.1378/chest.125.2.607](https://doi.org/10.1378/chest.125.2.607)
- Roberts M.C. 2003. Tetracycline therapy: update. *Clinical Infectious Diseases* 36(4): 462-467. DOI: [10.1086/367622](https://doi.org/10.1086/367622)
- Stephens C.R., Conover L.H., Hochstein F.A. et al. 1952. Terramycin. VIII. structure of aureomycin and terramycin. *Journal of the American Chemical Society* 74(19): 4976-4977. DOI: [10.1021/ja01139a533](https://doi.org/10.1021/ja01139a533)
- Sumper M., Kröger N. 2004. Silica formation in diatoms: the function of long-chain polyamines and silaffins. *Journal of Materials Chemistry* 14: 2059-2065. DOI: [10.1039/B401028K](https://doi.org/10.1039/B401028K)
- Thi M.T.T., Wibowo D., Rehm B.H.A. 2020. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences* 21(22): 8671. DOI: [10.3390/ijms21228671](https://doi.org/10.3390/ijms21228671)
- Tian Y., Patil S., Deng X. 2024. Polyvinylamine and its derivative as effective carrier for targeted delivery of small RNAs. *Methods in Molecular Biology* 2822: 353-365. DOI: [10.1007/978-1-0716-3918-4_22](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3918-4_22)
- Tian Y., Zhao Y., Yin C. et al. 2022. Polyvinylamine with moderate binding affinity as a highly effective vehicle for RNA delivery. *Journal of Controlled Release* 345: 20-37. DOI: [10.1016/j.jconrel.2022.03.003](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.03.003)
- Troudi A., Douafer H., Bolla J.M. et al. 2021. Antibiotic adjuvants to rescue *Pseudomonas aeruginosa* from tetracycline antibiotics resistance. *Anti-Infective Agents* 19(1): 110-116. DOI: [10.2174/2211352518999200629164624](https://doi.org/10.2174/2211352518999200629164624)
- Troudi A., Fethi M., Selim E.I. et al. 2020. Efficiency of a tetracycline-adjuvant combination against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* Tunisian clinical isolates. *Antibiotics (Basel)* 9(12): 919. DOI: [10.3390/antibiotics9120919](https://doi.org/10.3390/antibiotics9120919)
- Troia T., Siad J., Di Giorgio C. et al. 2022. Design and synthesis of new polyamine quinoline antibiotic enhancers to fight resistant gram-negative *P. aeruginosa* bacteria. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports* 5: 100054. DOI: [10.1016/j.ejmcr.2022.100054](https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2022.100054)
- Unemo M., Cole M.J., Kodmon C. et al. 2024. High tetracycline resistance percentages in *Neisseria gonorrhoeae* in Europe: is doxycycline post-exposure prophylaxis unlikely to reduce the incident gonorrhoea cases? *The Lancet Regional Health – Europe* 38: 100871. DOI: [10.1016/j.lanepe.2024.100871](https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2024.100871)
- Wang G., Brunel J.M., Bolla J.M. et al. 2021. The polyaminoisoprenyl potentiator NV716 revives old disused antibiotics against intracellular forms of infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 65: e02028-20. DOI: [10.1128/AAC.02028-20](https://doi.org/10.1128/AAC.02028-20)
- Wood S.J., Kuzel T.M., Shafikhani S.H. 2023. *Pseudomonas aeruginosa*: infections, animal modeling, and therapeutics. *Cells* 12:199. DOI: [10.3390/cells12010199](https://doi.org/10.3390/cells12010199)

Применение полимерных аминов в качестве адъювантов для преодоления устойчивости *Pseudomonas aeruginosa* к тетрациклину

Анненков В.В.*^{ORCID}, Пальшин В.А.^{ORCID}, Зелинский С.Н.^{ORCID}, Сулова М.Ю.^{ORCID}, Липко И.А.^{ORCID}, Даниловцева Е.Н.^{ORCID}

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, 3 ул. Улан-Баторская, Иркутск, 664033, Россия

АННОТАЦИЯ. Преодоление устойчивости болезнетворных организмов к действию антибиотиков актуально в связи с распространением видов, изначально обладающих устойчивостью к внешним воздействиям, и которая усилилась за десятилетия применения антибиотиков. Существенную опасность представляет *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter, 1872) Migula, 1900 (синегнойная палочка), обладающая прочной клеточной мембраной и способная образовывать биоплёнки вокруг колоний. Нами установлено, что гидрофильный поливиниламин, не содержащий никаких специфических функциональных групп и центров связывания, способен существенно усилить чувствительность *Ps. aeruginosa* к тетрациклину. Минимальная ингибирующая концентрация составила 0.26-1.16 мкг/мл в зависимости от плотности начальной культуры *Ps. aeruginosa*, что соответствует показателям для чувствительных микроорганизмов.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, синегнойная палочка, тетрациклин, поливиниламин, адъювант

Для цитирования: Анненков В.В., Пальшин В.А., Зелинский С.Н., Сулова М.Ю., Липко И.А., Даниловцева Е.Н. Применение полимерных аминов в качестве адъювантов для преодоления устойчивости *Pseudomonas aeruginosa* к тетрациклину // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 1. - С. 178-186. DOI: [10.31951/2658-3518-2025-A-1-178](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2025-A-1-178)

1. Введение

Успехи в борьбе с бактериальными инфекциями, прежде всего за счёт применения антибиотиков, в качестве побочного эффекта имеют не только появление антибиотикоустойчивых штаммов, но и большее распространение бактерий, изначально имевших механизмы защиты от внешнего воздействия. Существенную опасность представляет *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter, 1872) Migula, 1900 (синегнойная палочка), вызывающая инфекционные заболевания органов дыхания, желудочно-кишечного тракта, мочевыводящих путей, кровеносной системы и пр. (Osmon et al., 2004; Wood et al., 2023). Данная бактерия активно поражает организм, ослабленный другими заболеваниями, что обуславливает её возрастающую роль во внутрибольничных инфекциях. Антибиотикоустойчивость *Ps. aeruginosa* связана как с приобретёнными генетически закреплёнными механизмами устойчивости к определённым классам веществ, так и с имеющейся системой эффлюкса (активное выведение антибиотиков из клетки) и плохой проницаемостью клеточной мембраны, характерной для грамотрицательных бак-

терий (Jin, 2024). Кроме того, эти бактерии могут образовывать биоплёнки, также препятствующие проникновению к ним лекарственных препаратов (Thi et al., 2020).

Одной из стратегий преодоления антибиотикоустойчивости является использование адъювантов – химических соединений, ослабляющих защиту бактерий, например, разрушающих биоплёнки и повышающих проницаемость клеточных мембран (Douafer et al., 2019). Для повышения активности тетрациклина и его производных по отношению к *Ps. aeruginosa* испытан ряд адъювантов (Borselli et al., 2017; Troudi et al., 2020; 2021; Wang et al., 2021; Troia et al., 2022). Достаточно высокую активность показали производные полиаминофарнезила и полиаминогеранила, содержащие 3-4 аминогруппы и гидрофобный фрагмент (Troudi et al., 2020; 2021). Использование данных веществ позволило понизить действующие концентрации тетрациклинов до 2 мкг/мл и ниже, что находится в области показателей для чувствительной к тетрациклину грамположительной бактерии *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) Cohn 1872 (Минздрав РФ, 2018).

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: annenkov@lin.irk.ru, annenkov@yahoo.com (В.В. Анненков)

Поступила: 18 ноября 2024; Принята: 04 декабря 2024;
Опубликована online: 26 февраля 2025

© Автор(ы) 2025. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



Тетрациклин синтезирован около 70 лет назад (Stephens et al., 1952), но он по-прежнему активно используется в борьбе, в частности, с сибирской язвой (*Bacillus anthracis* Cohn 1872), риккетсиозами (*Rickettsia species*), заболеваниями дыхательных путей (*Mycoplasma pneumoniae* Somerson et al. 1963), пневмонией (*Chlamydomphila pneumoniae* (Grayston et al. 1989) Everett et al. 1999), пародонтитом, акне, розацеа (Roberts, 2003).

Тетрациклин (Схема 1) представляет собой амфотерное соединение с несколькими ионизируемыми функциональными группами, отвечающими за соответствующие величины pK_a : трикарбониламидная (C-1:C-2:C-3, $pK_a = 3.3$), фенольная дикетонная (C-10:C-11:C-12, $pK_a = 7.7$) и диметильная аминогруппа (C-4, $pK_{BH^+} = 9.7$). В связи с этим в кислых, умеренно кислых, нейтральных и щелочных условиях тетрациклин существует в катионной, цвиттерийной и анионной форме, соответственно (Gu and Karthikeyan, 2005). Проблемы при его применении связаны с имеющейся или развившейся устойчивостью ряда возбудителей (Opal and Pop-Vicas, 2015; Grossman, 2016; Unemo et al., 2024). Кроме того, определённые затруднения вызывает пониженная растворимость тетрациклина в физиологической области pH: около 22-27 мкг/мл в ацетатных/фосфатных буферных растворах в диапазоне pH 5-7 (Ahmed and Jee, 1985; Meretoudi et al., 2020). В этой связи распространённой лекарственной формой тетрациклина является его гидрохлорид, а эффективность аминоксодержащих адъювантов может быть связана как с их способностью нарушать мембраны и биоплёнки бактерий, так и со взаимодействием с молекулой тетрациклина, повышающим его растворимость и биодоступность. При исследовании низкомолекулярных соединений в качестве адъювантов (Troudi et al., 2021) отмечалась необходимость сочетания гидрофобных и основных гидрофильных фрагментов в молекулах. В то же время, известна способность полиаминов проникать в живые клетки, обуславливающая их перспективность в качестве агентов доставки нуклеиновых кислот в генной терапии и генной инженерии (Boussif et al., 1995; Tian et al., 2022; 2024). Поливиниламин (ПВА) представляет собой один из простейших по структуре полимерных аминов (Схема 2), доступный в виде фракций с узким молекулярно-массовым распределением при получении гидролизом фракционированного поливинилформамида (Annenkov et al., 2011).

Данная работа посвящена изучению адъювантной активности ПВА по отношению к тетрациклину при действии на бактерии *Ps. aeruginosa*. Также оценена адъювантная активность олигопропиламина (Схема 2), аналогичного соединениям, обнаруженным в створках диатомовых водорослей (Sumper and Kröger, 2004).

2. Материалы и методы

В работе использовали фракцию ПВА молекулярной массы 4.7 кДа, полученную в соответствии с (Annenkov et al., 2011). Олигомерный полиамин

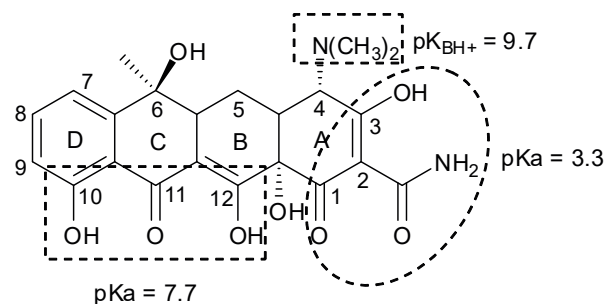


Схема 1. Структура тетрациклина и константы ионизации его функциональных групп.

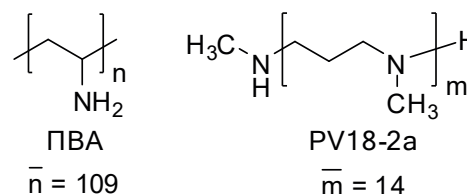


Схема 2. Структурные формулы ПВА и олигопропиламина PV18-2а.

PV18-2а, фракция 1.0. кДа, синтезировали по методу (Annenkov et al., 2018). Тетрациклин получали из его гидрохлорида (Sisco Research Laboratories Pvt. Ltd., лот 38614) по методу (Kardys and Conn, 1961)). Растворы для тестирования антимикробной активности готовили растворением компонентов в физиологическом растворе (150 мМ NaCl), величину pH доводили до 7.4 добавлением 0.1 М HCl или NaOH. Готовые растворы стерилизовали фильтрованием через шприцевые фильтры (0.22 мкм, Sartorius AG, Германия).

Определение антимикробной активности проводили методом диффузии в агар на плотной питательной среде путем сравнения размеров зон угнетения роста микроорганизма (Минздрав РФ, 2018). В пластмассовые одноразовые чашки Петри диаметром 90 мм (АО «Фирма Медполимер», Санкт-Петербург, серия 011032024 годен до 03.2027), разливали стерильную питательную среду ГМФ-агар (ООО «НИЦФ» серия 1151221, годен до 12.2024), предварительно засеянную тест-микроорганизмом – *Pseudomonas aeruginosa* 27853. Суспензию культуры готовили, используя стандарт мутности СОП №1-98-15 БАК-10 (от 19.04.2024 годен до 19.04.2025), в стерильном физиологическом растворе, после чего добавляли в питательную среду ($49 \pm 1^\circ\text{C}$) из расчета 1 мл на 100 мл. Для определения численности бактериальных клеток в 1 мл суспензии делали серию разведений с последующим посевом на ГМФ-агар. Таким образом, численность *Ps. aeruginosa* внесимой в чашку Петри составила $4.5 \cdot 10^9$ кл/мл.

После застывания питательной среды в чашке Петри с помощью полой трубки делали 6 лунок диаметром 8.1 мм и высотой 6.5 мм. В лунки вносили по 150 мкл испытуемых растворов. Рабочие растворы исследуемых веществ готовили в разных концентрациях. Каждый эксперимент проводили в трёх повторностях. После внесения растворов чашки на час оставляли при комнатной температуре, затем инкубировали при температуре ($36 \pm 1^\circ\text{C}$) в течение 16–18 ч.

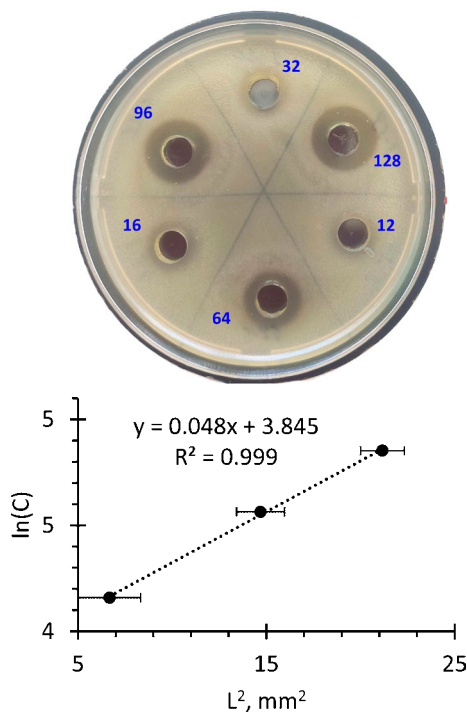


Рис.1. Фотография чашки Петри после действия тетрациклина в различных концентрациях (мкг/мл, указаны около лунок). Внизу - зависимость логарифма концентрации тетрациклина (мкг/мл) от квадрата радиуса зоны ингибирования (мм). МИК составила 46.8 мкг/мл.

Типичный вид чашки Петри после культивирования представлен на Рисунке 1. Диаметр и ширину зон угнетения роста тест-микроорганизма измеряли при помощи цифрового штангенциркуля, с точностью до 0,1 мм. Значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) находили аналогично (Bonev et al., 2008) из зависимости $\ln(C)$ vs l^2 , где C – концентрация действующего вещества, l – ширина зоны ингибирования. Зависимость аппроксимировали линейным уравнением, свободный член которого равнялся $\ln(\text{МИК})$.

3. Результаты и обсуждение

Тетрациклин подавляет рост *Ps. aeruginosa* при довольно высоких концентрациях (Рис. 1), его МИК составляет 46.8 мкг/мл, что соответствует данным, полученным с использованием метода разбавления микробной суспензии в 96-луночной планшете (Troudi et al., 2021). Эксперименты в присутствии 100 мкг/мл ПВА показали (Рис. 2) существенное увеличение активности тетрациклина, его МИК понизилась до 1.16 и 0.26 мкг/мл в зависимости от плотности начальной культуры *Ps. aeruginosa*. Данные величины превышают лучшие показатели для производных полиаминофарнезила и полиаминогеранила, составляющие ≥ 2 мкг/мл (Troudi et al., 2020; 2021). ПВА в отсутствие тетрациклина начинает подавлять рост *Ps. aeruginosa* лишь при концентрации 200 мкг/мл. При совместном введении ПВА и 12 мкг/мл тетрациклина (Рис. 3) МИК по ПВА составила 57 мкг/мл.

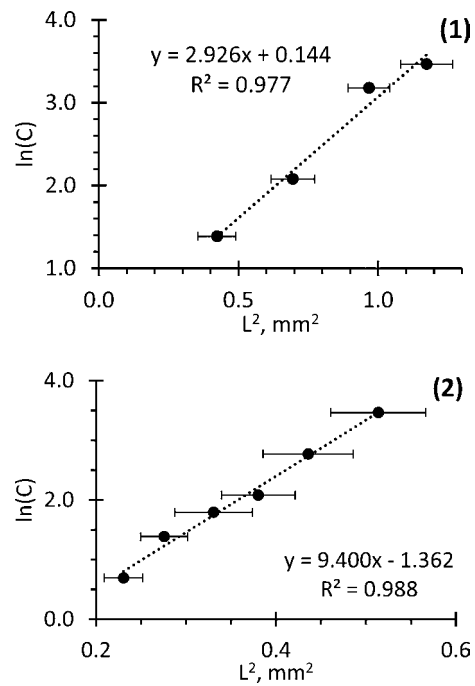


Рис.2. Зависимость логарифма концентрации тетрациклина (мкг/мл) от квадрата радиуса зоны ингибирования (мм) в присутствии 100 мкг/мл ПВА. (1) - плотность культуры $4.5 \cdot 10^9$ кл/мл, (2) – 10^5 кл/мл. МИК: 1.16 (1) и 0.26 (2) мкг/мл.

В качестве адьюванта для тетрациклина был также испытан полиамин PV18-2a (Схема 2), представляющий собой аналог биогенных полиаминов из створок диатомовых водорослей (Sumper and Kröger, 2004). PV18-2a представляет собой олигомерную смесь со средней молекулярной массой 1.0 кДа. Элементарное звено PV18-2a содержит большее количество углеводородных групп по сравнению с ПВА и обладает определёнными гидрофобными свойствами, в частности, способностью к ассоциации в водной среде (Annenkov et al., 2024). Он также усиливает антибактериальную активность тетрациклина до МИК 6.3 мкг/мл (Рис. 4), что существенно ниже МИК свободного тетрациклина.

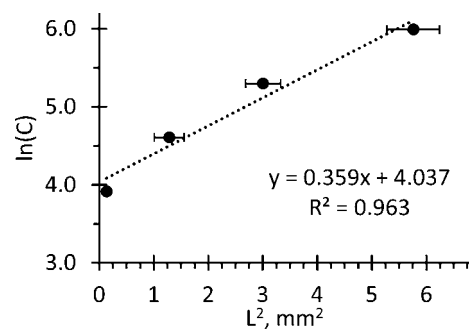


Рис.3. Зависимость логарифма концентрации ПВА (4.7 кДа) от квадрата радиуса зоны ингибирования (мм) в присутствии тетрациклина (12 мкг/мл). МИК составила 57 мкг/мл.

4. Выводы

Таким образом, нами установлено, что гидрофильный поливиниламин, не содержащий никаких специфических функциональных групп и центров связывания, способен существенно усиливать чувствительность *Ps. aeruginosa* к тетрациклину, снижая его действующие концентрации до показателей, характерных для чувствительных к нему микроорганизмов. Учитывая способность полиамина PV18-2a также выступать в качестве адъюванта по отношению к системе *Ps. aeruginosa* – тетрациклин, активность поливиниламина можно связать с наличием множественных аминогрупп, способных к ассоциации с клеточными мембранами и биоплёнками. Можно предположить, что варьирование структуры и молекулярной массы полимерных аминов приведёт к созданию более эффективных адъювантов, способных подавлять устойчивость микроорганизмов к антибиотикам.

Благодарности

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-15-00268, <https://rscf.ru/project/22-15-00268/>.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Ahmed B.M., Jee R.D. 1985. The acidity and solubility constants of tetracyclines in aqueous solutions. *Analytica Chimica Acta* 166: 329-333. DOI: [10.1016/S0003-2670\(00\)84886-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)84886-2)
- Annenkov V.V., Danilovtseva E.N., Pal'shin V.A. et al. 2011. Poly (vinyl amine) – silica composite nanoparticles: models of the silicic acid cytoplasmic pool and as a silica precursor for composite materials formation. *Biomacromolecules* 12: 1772–1780. DOI: [10.1021/bm2001457](https://doi.org/10.1021/bm2001457)
- Annenkov V.V., Maheswari K.U., Pal'shin V.A. et al. 2018. Design of oligonucleotide carriers: importance of polyamine chain length. *Polymers* 10(12): 1297. DOI: [10.3390/polym10121297](https://doi.org/10.3390/polym10121297)
- Annenkov V.V., Zelinskiy S.N., Palshin V.A. et al. 2024. Polyamines: association in aqueous medium and promising transport vesicles. *Journal of Molecular Liquids* 396: 1-13. DOI: [10.1016/j.molliq.2024.124038](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124038)
- Bonev B., Hooper J., Parisot J. 2008. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61(6): 1295-301. DOI: [10.1093/jac/dkn090](https://doi.org/10.1093/jac/dkn090)
- Borselli D., Blanchet M., Bolla J.M. et al. 2017. Motuporamine derivatives as antimicrobial agents and antibiotic enhancers against resistant gram-negative bacteria. *Chembiochem* 18: 276–283. DOI: [10.1002/cbic.201600532](https://doi.org/10.1002/cbic.201600532)
- Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A. et al. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *PNAS* 92: 7297-7301. DOI: [10.1073/pnas.92.16.7297](https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297)
- Douafer H., Andrieu V., Phanstiel O. et al. 2019. Antibiotic adjuvants: make antibiotics great again! *Journal of*

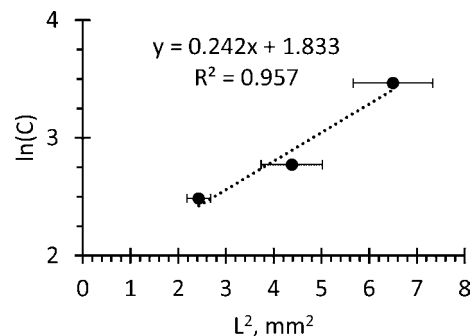


Рис.4. Зависимость логарифма концентрации тетрациклина (мкг/мл) от квадрата радиуса зоны ингибирования (мм) в присутствии 100 мкг/мл PV18-2a. МИК составила 6.25 мкг/мл.

Medicinal Chemistry 62(19): 8665-8681. DOI: [10.1021/acs.jmedchem.8b01781](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01781)

Grossman T.H. 2016. Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6(4): a025387. DOI: [10.1101/cshperspect.a025387](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387)

Gu C., Karthikeyan K.G. 2005. Interaction of tetracycline with aluminum and iron hydrous oxides. *Environmental Science & Technology* 39(8):2660–2667. DOI: [10.1021/es048603o](https://doi.org/10.1021/es048603o)

Jin S. 2024. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Tang Y.W., Hindiyeh M.Y., Liu D et al. (Eds.), *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier Ltd. 3 ed, ch 39, pp. 811-826. DOI: [10.1016/B978-0-12-818619-0.00064-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818619-0.00064-2)

Kardys J.A., Conn G. 1961. Tetracycline purification process. US Patent No. 3,013,074

Meretoudi A., Banti C.N., Siafarika P. et al. 2020. Tetracycline water soluble formulations with enhanced antimicrobial activity. *Antibiotics* 9: 845. DOI: [10.3390/antibiotics9120845](https://doi.org/10.3390/antibiotics9120845)

Opal S.M., Pop-Vicas A. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Bennett J.E., Dolin R., Blaser M.J. (Eds), *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Elsevier Inc, 8 ed, pp. 235-251. DOI: [10.1016/B978-1-4557-4801-3.00018-7](https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00018-7)

Osmon S., Ward S., Fraser V.J. et al. 2004. Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 125(2): 607-616. DOI: [10.1378/chest.125.2.607](https://doi.org/10.1378/chest.125.2.607)

Roberts M.C. 2003. Tetracycline therapy: update. *Clinical Infectious Diseases* 36(4): 462-467. DOI: [10.1086/367622](https://doi.org/10.1086/367622)

Sumper M., Kröger N. 2004. Silica formation in diatoms: the function of long-chain polyamines and silaffins. *Journal of Materials Chemistry* 14: 2059-2065. DOI: [10.1039/B401028K](https://doi.org/10.1039/B401028K)

Stephens C.R., Conover L.H., Hochstein F.A. et al. 1952. Terramycin. VIII. structure of aureomycin and terramycin. *Journal of the American Chemical Society* 74(19): 4976-4977. DOI: [10.1021/ja01139a533](https://doi.org/10.1021/ja01139a533)

Thi M.T.T., Wibowo D., Rehm B.H.A. 2020. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences* 21(22): 8671. DOI: [10.3390/ijms21228671](https://doi.org/10.3390/ijms21228671)

Tian Y., Zhao Y., Yin C. et al. 2022. Polyvinylamine with moderate binding affinity as a highly effective vehicle for RNA delivery. *Journal of Controlled Release* 345: 20-37. DOI: [10.1016/j.jconrel.2022.03.003](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.03.003)

Tian Y., Patil S., Deng X. 2024. Polyvinylamine and its derivative as effective carrier for targeted delivery of small RNAs. *Methods in Molecular Biology* 2822: 353-365. DOI: [10.1007/978-1-0716-3918-4_22](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3918-4_22)

Troia T., Siad J., Di Giorgio C. et al. 2022. Design and synthesis of new polyamine quinoline antibiotic enhancers to fight resistant gram-negative *P. aeruginosa* bacteria. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports* 5: 100054. DOI: [10.1016/j.ejmcr.2022.100054](https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2022.100054)

Troudi A., Fethi M., Selim E.I. et al. 2020. Efficiency of a tetracycline-adjuvant combination against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* Tunisian clinical isolates. *Antibiotics (Basel)* 9(12): 919. DOI: [10.3390/antibiotics9120919](https://doi.org/10.3390/antibiotics9120919)

Troudi A., Douafer H., Bolla J.M. et al. 2021. Antibiotic adjuvants to rescue *Pseudomonas aeruginosa* from tetracycline antibiotics resistance. *Anti-Infective Agents* 19(1): 110-116. DOI: [10.2174/2211352518999200629164624](https://doi.org/10.2174/2211352518999200629164624)

Unemo M., Cole M.J., Kodmon C. et al. 2024. High tetracycline resistance percentages in *Neisseria gonorrhoeae* in Europe: is doxycycline post-exposure prophylaxis unlikely

to reduce the incident gonorrhoea cases? *The Lancet Regional Health – Europe* 38: 100871. DOI: [10.1016/j.lanepe.2024.100871](https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2024.100871)

Wang G., Brunel J.M., Bolla J.M. et al. 2021. The polyaminoisoprenyl potentiator NV716 revives old disused antibiotics against intracellular forms of infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 65: e02028-20. DOI: [10.1128/AAC.02028-20](https://doi.org/10.1128/AAC.02028-20)

Wood S.J., Kuzel T.M., Shafikhani S.H. 2023. *Pseudomonas aeruginosa*: infections, animal modeling, and therapeutics. *Cells* 12:199. DOI: [10.3390/cells12010199](https://doi.org/10.3390/cells12010199)

Минздрав РФ, Фармакопейный комитет. 2018. Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Общая фармакопейная статья ОФС.1.2.4.0010.18