

**БІОЛОГІЧНІ НАУКИ****Дронова М.Л.**

*молодший науковий співробітник,  
Інститут фармакології та токсикології  
Національної академії медичних наук України*

**ФУНКЦІОНУВАННЯ ЕФЛЮКСНИХ СИСТЕМ  
STAPHYLOCOCCUS AUREUS В ПРИСУТНОСТІ  
ПОХІДНОГО АРИЛАЛІФАТИЧНИХ АМІНОСПИРТІВ КВМ-194**

*Staphylococcus aureus* вважається одним із основних збудників гнійно-запальних процесів вже більше століття [1; 2], незважаючи на впровадження у клінічну практику значної кількості антибактеріальних препаратів. Недостатня ефективність антимікробної хіміотерапії пояснюється швидким розвитком та поширенням антибіотикорезистентних штамів патогенів [1; 3]. З цієї причини останні десятиліття значна увага приділяється дослідженню механізмів виникнення стійкості мікроорганізмів та спробам її подолання.

Одним із найбільш поширених механізмів розвитку резистентності у бактерій є гіперпродукція та/або гіперактивація ефлюксних систем, які забезпечують активний викид антибіотиків з клітини та, відповідно, її виживання [3].

У золотистого стафілококу резистентність до антибактеріальних засобів може забезпечуватись помпами, що належать до чотирьох основних родин – MFS (major facilitator superfamily), ABC (ATP-binding cassette superfamily), MATE (multidrug and toxic compound extrusion family) та SMR (small multidrug resistance family). Дані літератури свідчать, що головну роль у виникненні стійкості *S. aureus* до антибіотиків (фторхінолонів, тетрациклінів, оксазолідинонів, амфеніколів та ін.) відіграють ефлюксні помпи родини MFS [4].

На даний час проводиться активний пошук інгібіторів ефлюксних помп (ІЕП) природного та синтетичного походження. Так, встановлено, що пригнічувати активність ефлюксних помп здатні фенотіазини, блокатори протонної помпи, інгібітори зворотного нейронального захвату серотоніну та антагоністи кальцію. Серед сполук, які раніше у медичній практиці не застосовувались, увагу привертають антисмислові РНК, аналоги антибіотиків, біологічноактивні речовини природного походження, а також їх напівсинтетичні похідні [3-5].

Новим перспективним класом сполук для розробки антимікробних засобів є похідні арилаліфатичних аміноспиртів. Попередніми дослідженнями встановлено виразну антистафілококову дію вперше синтезованих похідних арилаліфатичних аміноспиртів та їх мембранотропні властивості [6; 7].

Метою представленої роботи було вивчення впливу похідного арилаліфатичних аміноспиртів KBM-194 на функціонування ефлюксної системи *S. aureus*.

Дослідження активності ефлюксних систем проводили по відношенню до еталонного штаму *S. aureus* ATCC 25922 та резистентного до ципрофлоксацину *S. aureus* 449. Такий вибір обумовлений тим, що саме стійкість до фторхінолонів пояснюють переважно гіперпродукцією та/або гіперактивацією ефлюксних помп.

Антибактеріальну дію похідного арилаліфатичних аміноспиртів та ципрофлоксацину визначали за загальноприйнятою методикою з визначенням мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) [8].

Активність ефлюксної системи бактерій у присутності сполук оцінювали флюорометричним методом за накопиченням бромистого етидію [9]. Інтенсивність флюоресценції вимірювали з використанням спектрофотометра MPF-3 Hitachi Fluorescence Spectrophotometer (Японія) при довжині хвилі збудження 530 нм та довжині хвилі поглинання 585 нм.

В експериментах щодо впливу арилаліфатичних аміноспиртів на функціонування ефлюксних помп бактерій використана сполука KBM-194 в концентрації, що відповідала МІК (1,25 мкг/мл та 5,0 мкг/мл для *S. aureus* ATCC 25922 та *S. aureus* 449 відповідно).

Препаратом порівняння у дослідженнях слугував резерпін (субстанція), що за літературними даними є неселективним ІЕП, зокрема для родини MFS [3]. Концентрація резерпіну складала 20,0 мкг/мл. Розчини ІЕП та сполуки вносили через 10 хв від початку експерименту, результати реєстрували протягом 60 хв. Для перерахунку даних у показник відносної флюоресценції початкові значення флюоресценції кожної проби приймали за одиницю.

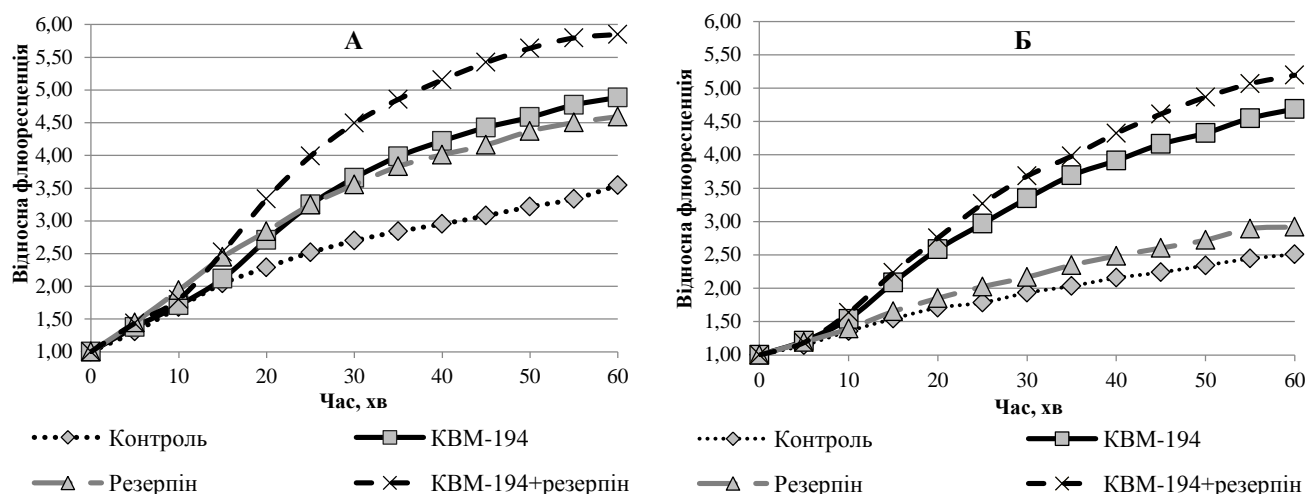
Статистичну обробку результатів експериментів проводили за допомогою програми «StatSoft Statistica 6.0» з використанням критерію Краскела-Уоліса [10].

Дані щодо впливу сполуки KBM-194 та препарату порівняння на накопичення бромистого етидію клітинами золотистого стафілококу наведено на рис. 1 та у табл. 1.

Отримані результати (рис. 1) свідчать, що клітини еталонного штаму стафілококу протягом усього терміну дослідження інтенсивно накопичують бромистий етидій. Присутність у інкубаційному середовищі сполуки KBM-194 призводить до збільшення накопичення бромистого етидію у клітинах у порівнянні з контролем, за блокуючим ефектом сполука не поступалась резерпіну. При сумісній дії сполуки та резерпіну на клітини золотистого стафілококу спостерігається виразне посилення флюоресценції, що свідчить про блокаду ефлюксних помп.

Експерименти з використанням стійкого до ципрофлоксацину *S. aureus* 449 (рис. 1) показали, що сполука KBM-194 проявляє більш виразний блокуючий вплив на ефлюксні помпи у порівнянні з резерпіном. Наявність у інкубаційному середовищі сполуки у комбінації з резерпіном призводить до значного збільшення накопичення бромистого етидію у клітинах. Слід зазначити, що у клітинах *S. aureus* 449 спостерігається більш слабе накопичення барвника у

порівнянні з еталонною культурою (табл. 1), що може пояснюватись гіперактивністю ефлюкських pomp у резистентного до ципрофлоксацину штаму.



**Рис. 1. Накопичення бромистого етидію в клітинах золотистого стафілококу в присутності КВМ-194 та резерпіну.**  
**А – *S. aureus* ATCC 25923 (чутливий до ципрофлоксацину);**  
**Б – *S. aureus* 449 (резистентний до ципрофлоксацину)**

Таблиця 1

**Вплив похідного арилаліфатичних аміноспиртів КВМ-194 на накопичення бромистого етидію у клітинах *S. aureus***

Умови експерименту	Зміна флуоресценції (через 60 хв)			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25922		<i>S. aureus</i> 449	
	ум. од.	%	ум. од.	%
Контроль	3,54±0,19	100,0	2,50±0,16	100,0
КВМ-194	4,88±0,73	137,9	4,69±0,61*	187,0*
Резерпін	4,59±0,30	129,6	2,92±0,16	116,4
КВМ-194 + резерпін	5,85±0,21*	165,1*	5,19±0,32*	207,2*

Примітка: «\*» –  $p < 0,05$  по відношенню до контролю

Проведеними дослідженнями (табл. 1) встановлено достовірне збільшення накопичення бромистого етидію у клітинах *S. aureus* ATCC 25922 та *S. aureus* 449 за умови сумісної дії резерпіну та КВМ-194 (на 65,1% та 107,2% відповідно у порівнянні з інтактною культурою). Зареєстроване також достовірне посилення флуоресценції (на 87,0%) при дії сполуки на *S. aureus* 449.

Таким чином, отримані результати свідчать про здатність похідного арилаліфатичних аміноспиртів впливати на активність ефлюкських pomp як еталонного, так і резистентного до ципрофлоксацину штаму золотистого стафілококу. Блокуюча дія КВМ-194 перевищує таку резерпіну, а найбільш виразний ефект спостерігається при їх сумісній дії. Здатність сполуки КВМ-194 та резерпіну до сумації може свідчити про їх вплив на ефлюкські помпи різних родин або здатність до зв'язування з різними сайтами pomp однієї родини.

**Список використаних джерел:**

1. Archer G. L. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen / G. L. Archer // Clin Infect Dis. – 1998, Vol. 26, № 5. – P. 1179–1181.
2. Чернякова Г. М. Умовно-патогенні мікроорганізми як етіологічні чинники інфекцій в умовах неінфекційного багатопрофільного стаціонару / Г. М. Чернякова, В. В. Мінухін // Аналі Мечниковського Інституту. – 2012. – № 4. – С. 114–118.
3. Kumar S. Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily [Електронний ресурс] / S. Kumar, M. M. Mukherjee, M. F. Varela // Int. J. Bacteriol. – 2013. – Vol. 2013. – Режим доступу до журн.: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4347946>
4. Handzlik J. Recent advances in multi-drug resistance (MDR) efflux pump inhibitors of Gram-positive bacteria *S. aureus* / J. Handzlik, A. Matys, K. Kieć-Kononowicz // Antibiotics – 2013. – № 2 – P. 28–45.
5. Microbial efflux pump inhibition: tactics and strategies / G. P. Tegos, M. Haynes, J. J. Strouse [et al.] // Curr. Pharm. Des. – 2011. – Vol. 17, № 13. – P. 1291–1302.
6. Дронова М. Л. Антимікробна активність 1- [4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси]-3-(N-бензилгексаметиленіміній)-2-пропанолу хлориду / М. Л. Дронова, З. С. Суворова // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – № 6(46). – С. 64–69.
7. Дронова М. Л. Дослідження впливу похідного арилаліфатичних аміноспиртів KBM-194 на проникність мембрани бактерій / М. Л. Дронова // Медичні та фармацевтичні науки: матеріали міжнародної науково-практичної конференції, м. Київ, 27-28 березня 2015 р. – Київ, 2015. – С. 86–89.
8. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания МУК 4.2.1890-04 // Клини. Микроб. Антимикроб. Химиотер. – 2004. – Т. 6, № 4. – С. 306–359.
9. Paixao L. Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli* [Електронний ресурс] / L. Paixao, L. Rodrigues, I. Couto // J. Biol. Eng. – 2009. – № 3. – Режим доступу до журн.: <http://www.jbioleng.org/content/3/1/18>
10. Халафян А. А. Statistica 6. Статистический анализ данных / Халафян А. А. – М.: Бином-Пресс, 2007. – 512 с.