

УДК 579.262:579.8: 579.861.2:547.435:615.281

ВПЛИВ ПОХІДНИХ АМІНОПРОПАНОЛУ З N-АЛКІЛАРИЛЬНИМ РАДИКАЛОМ НА БІОПЛІВКИ *STAPHYLOCOCCUS*

Гринчук Н.І.

Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України

На сьогодні в клінічну практику не впроваджено жодного препарату, який би в нетоксичних для людини дозах, проявляв активність відносно біоплівки. Дослідження впливу нових похідних амінопропанолу з N-алкіларильним радикалом на біоплівки *S. aureus* показало, що сполуки виявляють виразну антибіоплівкову активність. Відносно сформованих біоплівок найбільш активною виявилась сполука КВМ-194 у субінгібуючій концентрації, яка за ступенем інгібуючого ефекту переважає або не поступається препаратам порівняння ципрофлоксацину, азитроміцину, гентаміцину та рифампіцину. Отже, вперше синтезовані похідні амінопропанолу з N-алкіларильним радикалом можуть бути перспективними для розробки на їх основі лікарських засобів з антибіоплівковою активністю.

Ключові слова: біоплівки, мікроорганізми, *Staphylococcus aureus*, похідні амінопропанолу, антибіотики.

Постановка проблеми. Золотистий стафілокок був відкритий в 1880 р. як потенційний збудник урогенітальних інфекцій, сепсису, інфекційних захворювань шкіри, м'яких тканин, очей, дихальних шляхів та ЛОР-органів, суглобів та кісток, ЦНС, та післяопераційних ранових ускладнень, летальність при таких захворюваннях складала близько 80% до початку клінічного застосування пеніциліну [1].

Стафілококи як збудники різних типів інфекцій, можуть знаходитися в планктонному, біоплівковому чи обох станах. Планктонні форми мікроорганізмів є причиною, наприклад, пневмонії і сепсису, в той час як цілий ряд хронічних захворювань, а саме: ендoftальміт, остеомієліт, ендокардит, хронічні шкірні інфекції, інфекції, які передаються через медичні пристрої, хронічний риносинусит і стоматологічні захворювання викликані біоплівковими формами бактерій [1]. За даними літератури більше 65% інфекційних захворювань викликані мікроорганізмами, що існують у формі біоплівки.

Після доведення можливості існування мікроорганізмів у стані біоплівки виникла потреба у встановленні базових механізмів процесу їх розвитку, практичних підходів до лікування і профілактики захворювань, обумовлених мікробними спільнотами. Відомо, що серед клінічних ізолятів *S. aureus* формувати біоплівки здатні до 78%, серед метицилін-резистентних штамів золотистого стафілокока (MRSA) – до 96% культур. Характерною особливістю біоплівкових мікроорганізмів є нечутливість до сучасних антимікробних препаратів. Так, на сьогоднішній день доведено, що клітини у складі біоплівки у 1000 раз більш стійкі до дії антибіотиків ніж планктонні мікроорганізми [2, 3].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Згідно з даними літератури, деякі антимікробні препарати не лише не проявляють специфічної дії відносно біоплівок, але можуть і стимулювати їх утворення. Так, гентаміцин не проявляє інгібуючої активності відносно сформованих біоплівок MSSA (метицилін-чутливий *S. aureus*) та MRSA, незалежно від дози, проте стимулював плівкоутворення. Амоксицилін/клавуланат в інгібуючих та субінгібуючих дозах також не виявляв значної антибіоплівкової активності проти сформованих біоплівок стафілококів [4].

Наші попередні дослідження свідчать про наявність виразної антимікробної активності амінопропанолів з N-алкіларильним радикалом відносно біоплівок *Candida albicans* та *Escherichia coli* [5].

Дане дослідження є фрагментом планової науково-дослідної роботи лабораторії фармакології протимікробних засобів відділу фармакології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»: «Дослідження впливу аміноспиртів з адамантильним та N-алкіларильним радикалом на процеси плівкоутворення монокультур бактерій, грибів та мікробних асоціацій» (№ державної реєстрації 0115U002442), співвидавцем яких є автор.

Мета дослідження – встановити вплив сполук з N-алкіларильним радикалом на формування біоплівок *Staphylococcus aureus* у порівнянні з офіційними препаратами.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Визначити вплив похідних амінопропанолів з N-алкіларильним радикалом на плівкоутворення клінічного штаму *S. aureus* 222.
2. Дослідити антимікробну активність похідних амінопропанолів з N-алкіларильним радикалом проти сформованих 1- та 2-добових біоплівок *S. aureus* 222.

Матеріали та методи. У експериментах використовували клінічний штаму *Staphylococcus aureus* 222, чутливий до дії амікацину, кліндамицину, резистентний до оксациліну і ципрофлоксацину, помірночутливий – до еритроміцину.

Антибіоплівкову активність сполук визначали за здатністю впливати на плівкоутворення та сформовані 1-добові та 2-добові біоплівки бактерій, використовуючи 96-лунокові полістиролові планшети [7]. Дослідження проводили методом сорбції молекул барвника на структурах біоплівки, з подальшою їх десорбцією в органічні розчинники [6]. При дослідженні впливу сполук на плівкоутворення внесення розчинів досліджуваних речовин та культур проводили одночасно, на сформовані біоплівки – на 1-у та 2-у добу експерименту.

Для отримання біоплівок використана 1-дובהва культура *S. aureus*, вирощена на рідкому поживному середовищі № 8. Для приготування інкуляту нічну культуру розводили у поживному середовищі у 100 разів (1:100). Термін ін-

кубації складав 24 год при 37° С. Після закінчення терміну інкубації вміст планшетів видаляли, промивали тричі дистильованою водою, вносили 0,1% розчин генціанвіолету та витримували 10–15 хв. Для виявлення сформованої біоплівки барвник екстрагували етанолом протягом 15 хв. Вимірювання оптичної щільності проводили на Adsorbance Microplate Reader ELx800 (BioTek, США) при довжині хвилі 630 нм. Контролем слугували інтактні культури мікроорганізмів, вирощені за тих самих умов.

В експериментах були використані сполуки: КВМ-194, КВМ-204, КВМ-261, КВМ-262 та КВМ-263 у концентрації 5,0 та 0,5 МІК. Сполуки синтезовані в Інституті органічної хімії к. фарм. н. Ю. В. Коротким.

Препаратами порівняння в експериментах слугували ципрофлоксацин, азитроміцин, гентаміцин та рифампіцин.

Виклад основного матеріалу. За результатами проведених експериментів щодо впливу сполук та препаратів порівняння на плівкоутворення було показано, що сполуки з N-алкіларильним радикалом дозозалежно пригнічують формування біоплівок *S. aureus* 222 (рис. 1). Так, інгібуюча дія сполук КВМ-194, КВМ-204, КВМ-261 та КВМ-262 у концентрації 5,0 МІК становила (67,8–83,7)%, а у субінгібуючій концентрації – (7,3–37,8)%, в залежності від сполуки. Сполука КВМ-263 проявила виразну інгібуючу активність в обох досліджуваних концентраціях: 82,5% та 75,6% (5,0 та 0,5 МІК відповідно).

Пригнічуюча дія препаратів порівняння також залежала від їх концентрації та становила: для ципрофлоксацину – 93,2% та 47,1%, азитроміцину – 97,6% та 29,8%, гентаміцину – 93,2% та 47,5% (5,0 та 0,5 МІК відповідно). Рифампіцин у концентрації 5,0 МІК порушував формування біоплівок на 68,9%, у субінгібуючій концентрації не тільки не проявляв інгібуючої активності, але й стимулював плівкоутворення золотистого стафілокока.

Сполуки КВМ-204 та КВМ-262 за своєю антибіоплівковою активністю не поступалися препаратам порівняння ципрофлоксацину, азитроміцину та гентаміцину у концентрації 5,0 МІК, сполука КВМ-263 у субінгібуючій концентрації вірогідно переважала усі препарати порівняння.

Отримані дані щодо вивчення здатності сполук та препаратів порівняння впливати на сформовану 1-добову біоплівку *S. aureus* 222 наведені на рис. 2.

Дослідженнями встановлено, що сполука КВМ-194 у концентрації 0,5 МІК руйнувала сформовану біоплівку на 45,9%, підвищення її концентрації до 5,0 МІК супроводжувалось зменшенням інгібуючої дії до 33,9%.

Визначено, що сполуки КВМ-261 та КВМ-263 дозозалежно руйнували 1-добову біоплівку: у концентрації 5,0 МІК антибіоплівкова дія складала 16,5% та 32,1% відповідно, у концентрації 0,5 МІК деструкція біоплівок менш виразна – 2,8% та 19,9% відповідно.

Сполука КВМ-204 у досліджених концентраціях відносно 1-добової біоплівки

S. aureus 222 активності не виявляла, сполука КВМ-262 була активною тільки при концентрації 5,0 МІК: біомаса біоплівки зменшувалась на 16,4%.

Серед препаратів порівняння найактивнішим виявився ципрофлоксацин, для якого характерна дозозалежна дія. У концентрації 5,0 МІК інгібуюча дія складала 72,2%, а при 0,5 МІК – 27,3%. Дозозалежна дія також характерна для азитроміцину, який руйнував біоплівку на 50,2% та 16,1% (при 5,0 та 0,5 МІК відповідно). Антибіоплівкова

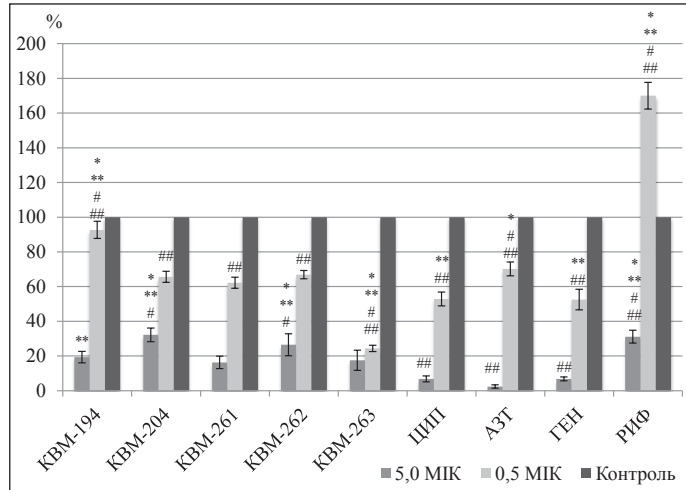


Рис. 1. Вплив сполук та препаратів порівняння на плівкоутворення *S. aureus* 222 (% утворення біоплівки)

Примітка. * – $p < 0,05$ вірогідне зниження по відношенню до відповідної концентрації ципрофлоксацину, ** – $p < 0,05$ вірогідне зниження по відношенню до відповідної концентрації азитроміцину, # – $p < 0,05$ вірогідне зниження по відношенню до відповідної концентрації гентаміцину, ## – $p < 0,05$ вірогідне зниження по відношенню до відповідної концентрації рифампіцину, ЦИП – ципрофлоксацин, АЗТ – азитроміцин, ГЕН – гентаміцин, РИФ – рифампіцин.

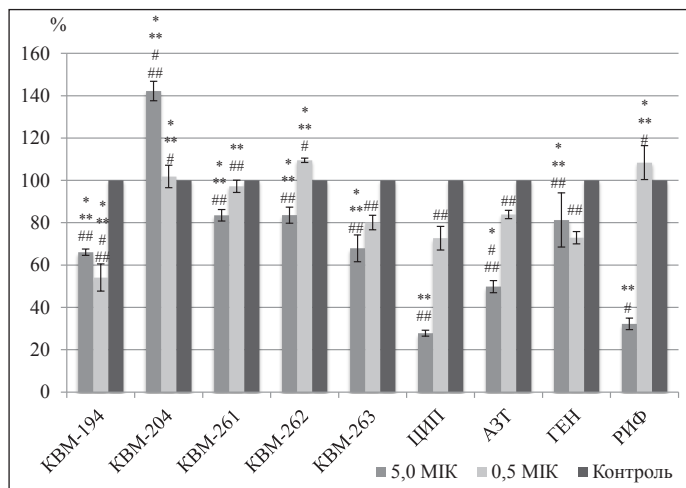


Рис. 2. Вплив сполук та препаратів порівняння на 1-добову біоплівку *S. aureus* 222 (% біоплівки у порівнянні з інтактним контролем)

Примітка. * – $p < 0,05$ вірогідне зниження по відношенню до відповідної концентрації ципрофлоксацину, ** – $p < 0,05$ вірогідне зниження по відношенню до відповідної концентрації азитроміцину, # – $p < 0,05$ вірогідне зниження по відношенню до відповідної концентрації гентаміцину, ## – $p < 0,05$ вірогідне зниження по відношенню до відповідної концентрації рифампіцину, ЦИП – ципрофлоксацин, АЗТ – азитроміцин, ГЕН – гентаміцин, РИФ – рифампіцин.

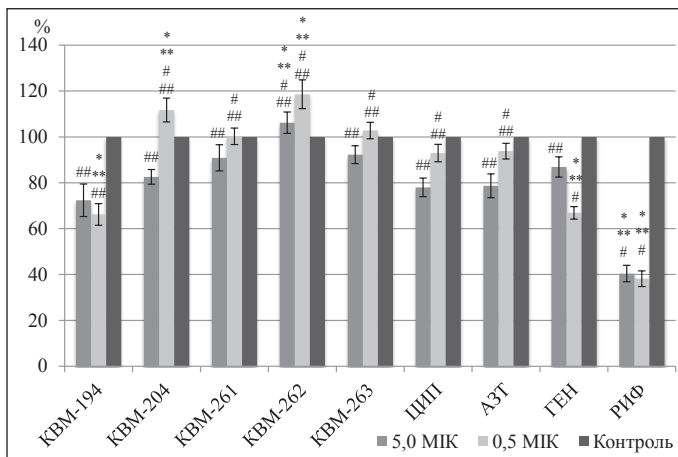


Рис. 3. Вплив сполук та препаратів порівняння на 2-добові біоплівки *S. aureus* 222 (% біоплівки у порівнянні з інтактним контролем)

Примітка. * – $p < 0,05$ вірогідне зниження по відношенню до відповідної концентрації ципрофлоксацину, ** – $p < 0,05$ вірогідне зниження по відношенню до відповідної концентрації азитроміцину, # – $p < 0,05$ вірогідне зниження по відношенню до відповідної концентрації гентаміцину, ## – $p < 0,05$ вірогідне зниження по відношенню до відповідної концентрації рифампіцину, ЦИП – ципрофлоксацин, АЗТ – азитроміцин, ГЕН – гентаміцин, РИФ – рифампіцин.

активність гентаміцину у концентрації 5,0 МІК складала 18,7%, у концентрації 0,5 МІК – 27,1%, дія рифампіцину спостерігалася тільки у концентрації 5,0 МІК і складала 67,8%.

Показано, що сполука KBM-194 у субінгібуючій концентрації за антибіоплівковою активністю переважала усі препарати порівняння, а у концентрації 5,0 МІК, як і KBM-263, не поступалася ципрофлоксацину, азитроміцину та рифампіцину.

Результати дослідження здатності сполук та препаратів порівняння руйнувати сформовані 2-добові біоплівки золотистого стафілокока наведено на рис. 3.

Згідно з отриманими результатами досліджень (рис. 3) встановлено, що сполука KBM-194 у концентрації 5,0 МІК руйнує сформовані 2-добові біоплівки *S. aureus* 222 на 27,6%, а при 0,5 МІК – на 33,8%. Антибіоплівкова ак-

тивність сполук KBM-204, KBM-261 та KBM-263 у концентрації 5,0 МІК складала 17,4%, 9,1% та 7,7% відповідно, при зменшенні концентрації до 0,5 МІК дані сполуки не проявляли інгібуючого впливу. Сполука KBM-262 не виявляла пригнічуючої дії у обох досліджуваних концентраціях.

Серед препаратів порівняння найактивнішим виявився рифампіцин, інгібіція становила 59,6% (5,0 МІК) та 61,8% (0,5 МІК). Інгібуюча дія ципрофлоксацину, азитроміцину, гентаміцину складала: 22,0% та 7,0%, 21,3% та 6,2%, 13,1% та 33,1% (5,0 МІК та 0,5 МІК відповідно).

Досліджувані сполуки, окрім KBM-262, за антибіоплівковою активністю не поступалися рифампіцину у концентрації 5,0 МІК, а KBM-194 у субінгібуючій концентрації не поступався рифампіцину та вірогідно переважав азитроміцин.

Таким чином, проведені експерименти показали, що похідні амінопропанолу з N-алкіларильним радикалом виявляють виразний інгібуючий ефект на плівкоутворення та здатні руйнувати сформовані 1-добові та 2-добові біоплівки *S. aureus*.

Висновки. 1. Вперше синтезовані похідні амінопропанолу виявляють високу здатність порушувати плівкоутворення золотистого стафілокока і не поступаються або є близькими до препаратів порівняння за своєю антибіоплівковою активністю. Специфічна дія сполук є дозозалежною.

2. Сполуки виявляють здатність руйнувати сформовані 1-добові біоплівки *S. aureus*. Найбільш виразну дію проявляла KBM-194 у концентрації 0,5 МІК, яка вірогідно переважала усі препарати порівняння.

3. Відносно 2-добових біоплівок золотистого стафілокока найбільш активною виявилась сполука KBM-194, яка у субінгібуючій концентрації не поступається рифампіцину та вірогідно перевагає азитроміцин.

4. Вперше синтезовані похідні амінопропанолу з N-алкіларильним радикалом є перспективними для подальших досліджень специфічної антимікробної активності.

Список літератури:

1. Staphylococcal Infection, Antibiotic Resistance and Therapeutics / R. Choudhury, S. Panda, S. Sharma, D. V. Singh // Antibiotic Resistant Bacteria – A Continuous Challenge in the New Millennium. – 2012. – С. 247–272.
2. Ерошенко Д. В. Влияние факторов внешней среды на первые этапы образования биопленок бактериями *Staphylococcus epidermidis*: дис. канд. биол. наук: 03.02.03 / Ерошенко Д. В. – Пермь, 2015. – 137 с.
3. Чеботарь И. В. Биопленки *Staphylococcus aureus*: структурно-функциональные характеристики и взаимоотношения с нейтрофилами: дис. докт. мед. наук: 03.02.03 / Чеботарь И. В. – Нижний Новгород, 2014. – 239 с.
4. Вплив антибіотиків на біоплівкоутворення MSSA та MRSA штамми стафілокока / [С. А. Деркач, І. А. Воронкіна, Л. С. Габишева та ін.] // ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ. – 2016. – № 4. – С. 46–51.
5. Суворова З. С. Антимикробная активность производных арилалифатических аминспиртов в отношении биопленок *C. albicans* и *E. coli* / З. С. Суворова, М. Л. Дронова // Материалы X Международной (XIX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых «Вестник РГМУ». – 2015. – С. 852.
6. O'Toole G. A. Microtiter dish biofilm formation assay // J. Vis. Exp. – 2011. – № 47. – Р. 2437.
7. Романова Ю. М. Образование биопленок – пример «социального» поведения бактерий / Ю. М. Романова, Т. А. Смирнова, А. Л. Андреев [и др.] // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 4. – С. 556–661.

Грынчук Н.И.

Институт фармакологии и токсикологии
Национальной академии медицинских наук Украины

ВЛИЯНИЕ АМИНОСПИРТОВ С N-АЛКИЛАРИЛЬНЫМ РАДИКАЛОМ НА БИОПЛЕНКИ STAPHYLOCOCCUS

Аннотация

На сегодня в клинической практике нет ни одного лекарственного препарата, который бы в нетоксичных для человека дозах проявлял антибиопленочную активность. Исследование влияния новых производных аминoproпанола с N-алкиларильным радикалом на *S. aureus* показало, что соединения проявляют выразительную антибиопленочную активность. Относительно сформированных биопленок наиболее активным оказалось соединение КВМ-194 в субингибирующей концентрации, которое по степени ингибирующего эффекта преобладает или не уступает препаратам сравнения ципрофлоксацину, азитромицину, гентамицину и рифампицину. Таким образом, впервые синтезированные производные аминoproпанола с N-алкиларильным радикалом могут быть перспективными для разработки на их основе лекарственных средств с антибиопленочной активностью.

Ключевые слова: биопленки, микроорганизмы, *S. aureus*, производные аминoproпанола, антибактериальные средства.

Hrynychuk N.I.

Institute of Pharmacology and Toxicology
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine

ACTIVITY OF N-ALKYL ARYL AMINOPROPANOL DERIVATIVES ON STAPHYLOCOCCUS BIOFILMS

Summary

Nowadays there are no antibacterial medications in clinical practice, effective against biofilms at non-toxic doses for human. Our studies have shown the significant antibiofilm effect of aminopropanols with N-alkyl aryl radical. Compound KVM-194 possessed the most pronounced activity against the preformed *S. aureus* biofilms at subinhibitory concentration; its action was superior or comparable to referent antimicrobials ciprofloxacin, azithromycin, gentamicin, rifampicin. The data obtained suggest the promises of novel aminopropanol derivatives with N-alkyl aryl radical for the development of new antibiofilm drugs.

Keywords: biofilms, microorganisms, *S. aureus*, aminopropanol derivatives, antibacterial drugs.