

М.Л.Дронова¹
С.І.Войчук²
Н.О.Вринчану¹

¹ ДУ „Інститут фармакології та токсикології НАМН України”, Київ
² Інститут мікробіології та вірусології імені Д.К.Заболотного НАН України, Київ

Ключові слова:
Escherichia coli, ариаліфатичні аміноспирти, механізм дії, антибіотики.

Надійшла: 10.11.2014
Прийнята: 18.12.2014

УДК 579.23, 615.281.9,547.435

УЛЬТРАСТРУКТУРА *ESCHERICHIA COLI* ПРИ ДІЇ НОВОГО ПОХІДНОГО АРИЛАЛІФАТИЧНИХ АМІНОСПИРТІВ

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи «Фармакодинамічні аспекти протимікробної активності нових похідних ариаліфатичних аміноспиртів».

Реферат. Метою роботи було встановити зміни ультраструктури кишкової палички при дії нового похідного ариаліфатичних аміноспиртів, сполуки КВМ-114. Дослідження проведені з використанням методу трансмісійної електронної мікроскопії. Встановлено, що при інкубації клітин зі сполукою у субінгібуючій концентрації вже через 1 рік спостерігаються порушення структури клітинної оболонки та зміни, що свідчать про пригнічення внутрішньоклітинних процесів.

Morphologia. – 2014. – Т. 8, № 4. – С. 26-29.

© М.Л.Дронова, С.І.Войчук, Н.О.Вринчану, 2014

✉ ml.dronova@gmail.com

Dronova M.L., Voychuk S.I., Vrynchanu N.O. Ultrastructure of *Escherichia coli* cells under the action of a novel derivative of aryl aliphatic aminoalcohols.

ABSTRACT. Background. Novel derivatives of aryl aliphatic aminoalcohols were examined for antimicrobial activity. Compound KVM-114 (4-(1,1,3,3-tetrabutyl) phenoxy-3-dimethylamino-2-propanol hydrochloride) was found as a selective against gram-negative bacteria. **Objective.** Investigation of compound KVM-114 influence on *E. coli* ultrastructure. **Methods.** Minimum inhibitory concentrations were determined by serial dilution method in Muller-Hinton broth. Bacteria (*Escherichia coli*) for transmission electron microscopy samples preparation was grown to exponential phase and then was exposed to the subinhibitory concentration of KVM-114 for 1 h and 24 h. **Results.** Intact *E. coli* cells were rod-shaped with rounded ends. A light layer, allowing clear visualization of the cell wall, was observed between the cytoplasm and cytoplasmic membrane. Lipopolysaccharide layer was well distinguished as well. Cytoplasm was filled with ribosomes and polyribosomes. 1 hour exposition to KVM-114 at a subinhibitory concentration resulted in the absence of polyribosomes in the cytoplasm. Increase of electron density of lipopolysaccharide layer and cell wall indicate alteration of cell envelope. Prolongation of the incubation period to 24 hours led to cell recovery: no changes were observed, compared to control cells. The data obtained suggest compound's ability to alter cell envelope and metabolic activity, however, subinhibitory concentration is apparently not sufficient for total inhibition of *E. coli* growth. **Conclusion.** The derivative of aryl aliphatic aminoalcohols, compound KVM-114, possesses inhibitory activity against gram-negative bacteria. *E. coli* treatment with this compound resulted in structural changes of the cell wall and alteration of intracellular processes.

Key words: *Escherichia coli*, aryl aliphatic aminoalcohols, mechanism of action, antibiotics.

Citation:

Dronova ML, Voychuk SI, Vrynchanu NO. [Ultrastructure of *Escherichia coli* cells under the action of a novel derivative of aryl aliphatic aminoalcohols]. *Morphologia*. 2014;8(4):26-9. Ukrainian.

Вступ

Представники родини *Enterobacteriaceae* на сьогодні є одними із провідних збудників у структурі інфекційних захворювань. Згідно з даним [1] з 30 родів *Enterobacteriaceae* близько 13 здатні викликати різноманітні захворювання. Бактерії цієї родини здатні спричинити ранову інфекцію, сепсис, пневмонію, захворювання сечостатевої сфери. Нагальною проблемою є нозокоміальні інфекції, одними із основних збудників яких є *E.coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter*, *Proteus* spp. та ін. [1].

Не дивлячись на достатню кількість антиба-

ктеріальних препаратів (пеніциліни, цефалоспорины, карбапенеми, фторхінолони, аміноглікозиди тощо), проблема профілактики та лікування пацієнтів з захворюваннями, обумовленими грамнегативними бактеріями, у повній мірі не вирішена. Основна причина недостатньої ефективності сучасних антимікробних препаратів – формування резистентності до їх дії. Один із шляхів її вирішення – пошук нових антибактеріальних засобів з мононаправленою дією. Нашими попередніми дослідженнями була виявлена селективна антибактеріальна активність у вперше синтезованого похідного ариаліфатичних аміноспир-

тів сполуки 4-(1,1,3,3-тетрабутил)фенокси-3-диметиламіно-2-пропанол гідрохлориду (шифр KBM-114) [2]. Поглиблене дослідження анібактеріальної дії сполуки виявило більш виразний інгібуючий вплив по відношенню до грамнегативних бактерій. Так, МІК по відношенню до *E. coli* 25922 складає 5,0 мкг/мл, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 131625 – 6,25 мкг/мл, *Shigella newcastle* 3592 ГКМ – 3,12 мкг/мл, *Providencia rettgeri* – 12,5 мкг/мл. Отримані дані свідчать про доцільність подальшого поглибленого дослідження сполуки, зокрема встановлення механізму анібактеріальної дії похідного арилаліфатичних аміноспиртів KBM-114.

Мета

Встановити зміни ультраструктури кишкової палички при дії сполуки KBM-114.

Матеріали та методи

В експериментах щодо визначення анібактеріальної активності нового похідного арилаліфатичних аміноспиртів були використані ододобові культури *E. coli* ATCC 25922. Інгібуючу дію оцінювали за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК), яку визначали методом серійних розведень у рідкому середовищі Мюллера-Хінтон [3]. Щільність інокуляту складала 10^6 КУО/мл поживного середовища.

Для визначення змін ультраструктури бактерій за умов впливу похідного арилаліфатичних аміноспиртів використовували метод трансмі-

сійної електронної мікроскопії. Тест-об'єктами в дослідженні слугували мікроорганізми, які знаходились у експоненціальній фазі росту. Культуру мікроорганізмів (6-годинну) інкубували протягом 1 год та 24 год у середовищі, що містило сполуку у концентрації 0,5 МІК. Після закінчення терміну інкубації клітини відмивали 0,9 % розчином натрію хлориду та фіксували у суміші глутаральдегіду та формальдегіду. Матеріал додатково фіксували 1,0 % розчином тетраоксиду осмію на фосфатному буфері (рН 7,4), зневоднювали в ацетоні зростаючої концентрації та поміщали в епоксидні смоли [4]. Ультратонкі зрізи отримували, використовуючи ультрамікромом LKB-8800, контрастували тетраоксидом осмію та цитратом свинцю [5]. Отримані ультратонкі зрізи вивчали методом трансмісійної електронної мікроскопії за допомогою електронного мікроскопа EM-125K при напрузі 80 кВ.

Результати та їх обговорення

Проведені електронно-мікроскопічні дослідження показали, що інтактні клітини *E. coli* були паличковидної форми із заокругленими кінцями. Між цитоплазмою, заповненою рибосомами і полірибосомальними комплексами, та цитоплазматичною мембраною існує світлий прошарок, який дозволяє чітко візуалізувати клітинну стінку (рис. 1). На ультрамікрофотографіях вирізняється шар ліпополісахариду.

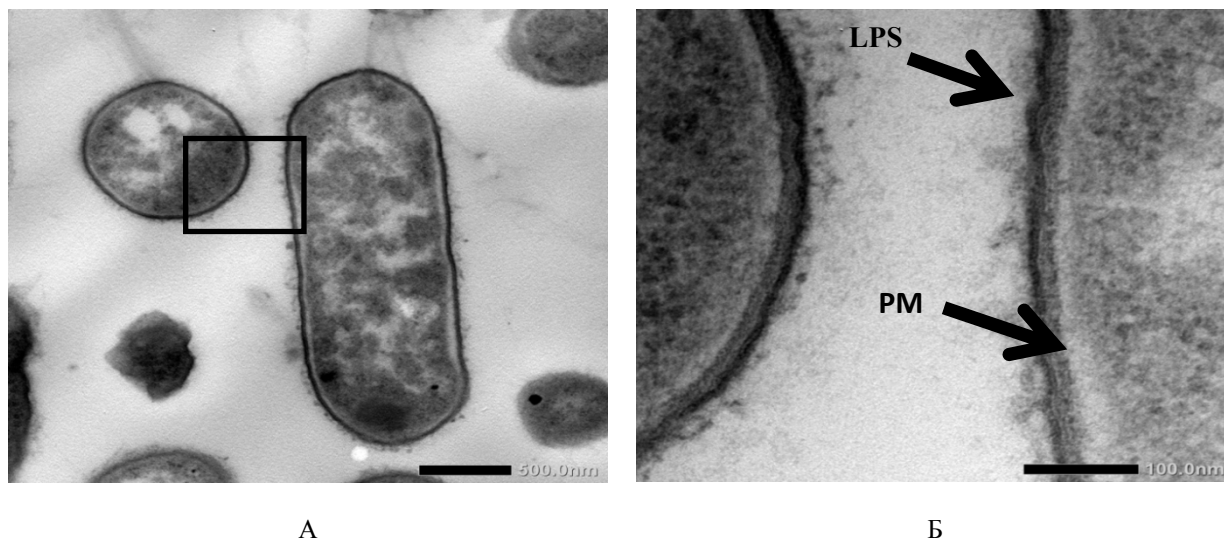


Рис. 1. Ультратонкі зрізи клітин *E. coli* (контроль), поздовжній та поперечний зрізи (А), структура клітинної оболонки (В). Електронна мікроскопія, збільшення: $\times 8000$ (А), $\times 50000$ (В). LPS – ліпополісахаридний шар; PM – плазматична мембрана.

Через 1 год дії сполуки KBM-114 (рис. 2) у концентрації 0,5 МІК (2,5 мкг/мл) ліпополісахаридний шар і клітинна стінка *E. coli* набувають підвищеної осміофільності, цитоплазма щільно

прилягає до цитоплазматичної мембрани. У цитоплазмі відсутні полірибосомальні комплекси, що може свідчити про пригнічення метаболічних процесів у клітинах.

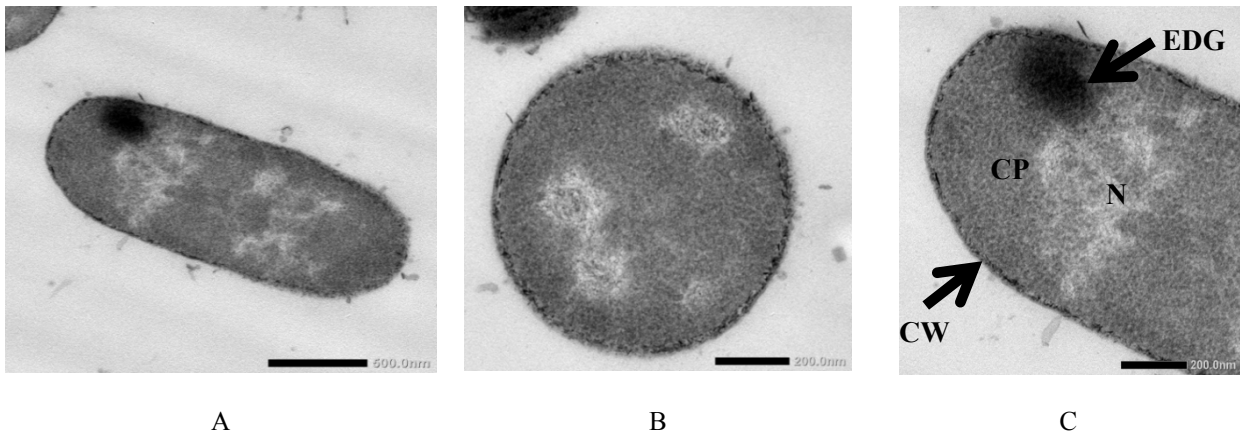


Рис. 2. Клітини *E. coli* через 1 рік дії речовини KBM-114 в концентрації 0,5 МІК. Електронна мікроскопія, збільшення $\times 12000$ (А), $\times 25000$ (В), $\times 25000$ (С). CP – цитоплазма; N – нуклеоїд, EDG – електронно-щільна гранула, CW – клітинна стінка.

Впродовж 24-годинної інкубації *E. coli* зі сполукою KBM-114 внутрішньоклітинна структура *E. coli* (рис. 3) близька до структури клітин контрольної популяції: цитоплазма і цитоплазма-

тична мембрана відокремлені світлим шаром без рибосом, рибосоми утворюють рибосомальні комплекси, активно розвинутий ліпополісахаридний шар.

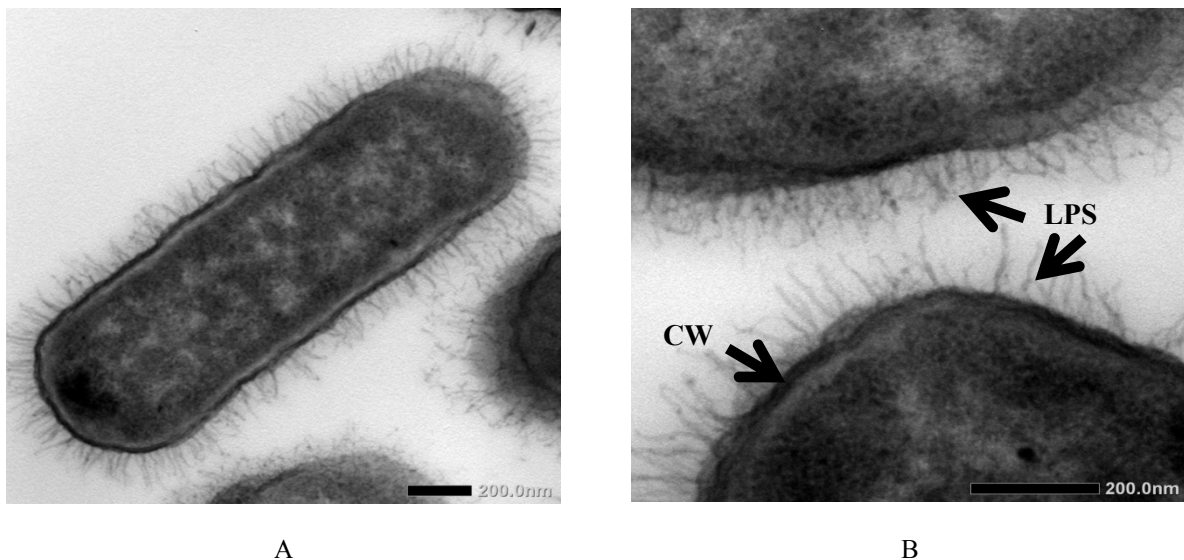


Рис. 3. Клітини *E. coli* ATCC 25922 через 24 год дії речовини KBM-114 в концентрації 0,5 МІК. Електронна мікроскопія, збільшення $\times 15000$ (А), $\times 30000$ (В). CW – клітинна стінка, LPS – ліпополісахаридний шар.

Як свідчать дані рис. 3, через 24 год відмічається відновлення процесів життєдіяльності клітин, що можна пояснити саме впливом на клітини кишкової палички субінгібуючої концентрації сполуки, яка призводить до певних порушень у клітинах мікроорганізмів, але є недостатньою для повного пригнічення росту та розмноження бактерій.

Таким чином, проведені дослідження показали, що сполука KBM-114 виявляє інгібуючу дію відносно грамнегативних мікроорганізмів. При дослідженні ультраструктури кишкової палички за умови дії сполуки в субінгібуючій концентрації виявлені зміни у структурі клітинної

оболонки та відсутність полірибосомальних комплексів вже через 1 год впливу.

Підсумок

Похідне арилаліфатичних аміноспиртів KBM-114 порушує ріст та розмноження грамнегативних бактерій. В концентрації 0,5 МІК обумовлює зміни структури клітинної стінки та порушує внутрішньоклітинні процеси, про що свідчить відсутність у цитоплазмі полірибосомальних комплексів.

Перспективи подальших розробок

Встановлення механізму антимікробної дії є важливим при створенні нового препарату антимікробної дії. В подальшому необхідно з'ясувати

вплив сполуки KBM-114 на склад зовнішньої мембрани бактерій, функціонування цитоплазматичної мембрани, а також дослідити внутрішньо-

клітинні процеси за умови впливу субінгібуючих та бактерицидних концентрацій сполуки (вміст білка, нуклеїнових кислот, та ін.).

Літературні джерела References

1. Sidorenko SV. [Infections, caused by bacteria of the family Enterobacteriaceae]. *Klinicheskaia antibiotikoterapiia*. 2001; 5-6: 11-5. Russian.

2. Korotkyi YuV, Vrynchanu NO, Suvorova ZS; Smertenko OA, inventors;

State enterprise «Institute of pharmacology and toxicology of National academy of medical sciences of Ukraine», Institute of organic chemistry of the National Academy of sciences of Ukraine, assignees. [Hydrochlorides of 1-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenoxy]-3-dialkylamino-2-propanol]. Ukrainian patent UA 105691. 2014 Jun 10. Int. Cl. A01N33/10; C07C 217/32; C07D

223/04; C07D 295/088; C07D 295/092. Ukrainian.

3. [Guidelines for susceptibility testing of microorganisms to antibacterial agents 4.2.1890-04]. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2004; 6(4): 306-359. Russian.

4. Bozzola JJ. Conventional specimen preparation techniques for transmission electron microscopy of cultured cells. Kuo J, editor. *Electron microscopy: methods and protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2007. P. 1-18.

5. Ann Ellis E. Poststaining grids for transmission electron microscopy. Kuo J, editor. *Electron microscopy: methods and protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2007. P. 97-106.

Дронова М.Л., Войчук С.И., Врынчану Н.А. Ультраструктура *Escherichia coli* при действии нового производного арилалифатических аминоспиртов.

Реферат. Целью работы было установить изменения ультраструктуры кишечной палочки при действии нового производного арилалифатических аминоспиртов соединения KBM-114. Исследования проведены с использованием метода трансмиссионной электронной микроскопии. Установлено, что при инкубации клеток с соединением в субингибирующей концентрации уже через 1 ч наблюдаются нарушения структуры клеточной оболочки и изменения, свидетельствующие об угнетении внутриклеточных процессов.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, арилалифатические аминоспирты, механизм действия, антибиотика.