

Д. М. Дудікова¹, К. С. Коробкова², І. П. Токовенко²

Антимікоплазмова активність похідних 1-адамтанфенолу

¹ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ

²Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України, м. Київ

Ключові слова: мікоплазми, похідні адамтанфенолу, антимікробні засоби

Представники класу *Mollicutes* роду *Mycoplasma* та *Acholeplasma* – бактерії невеликого розміру (100–300 нм), позбавлені клітинної стінки, що є патогенними для людини та багатьох видів тварин. Зазвичай вони колонізують слизові оболонки [1].

Мікоплазми здатні зумовлювати хронічні запалення дихальних та сечових шляхів, статевих органів і суглобів пацієнтів усіх вікових груп. Так, *Mycoplasma pneumoniae* є збудником захворювань верхніх та нижніх дихальних шляхів [2], викликає внутрішньоутробні інфекції, вади розвитку плода [3, 4], може бути етіологічним фактором гострого гломерулонефриту [5]. *M. pneumoniae* в асоціації з стафілококами та вірусами здатна ускладнювати перебіг менінгітів та інших захворювань центральної нервової системи та черепно-мозкових нервів [6, 7].

Представники роду *Acholeplasma* виділені практично в кожного виду живих організмів: рослин, комах, рептилій, птахів, ссавців та людини. Вони є однією з п'яти найпоширеніших причин забруднення клітинних культур і збудником хвороб рослин. *A. modicum* викликають захворювання респіраторної та сечостатевої системи багатьох видів тварин, у тому числі великої рогатої худоби та гризунів [8, 9].

Антимікоплазмову активність виявляють тетрацикліни, макроліди, лінкозаміди, аміноглікозиди та фторхінолони. Механізм дії цих препаратів зумовлений пригніченням синтезу білка на рибосомах (тетрацикліни, макроліди, лінкозаміди та аміноглікозиди), або порушенням процесів реплікації та транскрипції ДНК у клітинах збудника (фторхінолони).

Мікоплазми є природно резистентними до препаратів, які порушують синтез компонентів клітинної стінки (пеніциліни, цефалоспорини).

Необхідно відмітити, що чутливість до антибіотиків залежить від виду мікоплазм: *M. pneumoniae* чутлива до дії макролідів та тетрациклінів, *M. hominis* – природно резистентна до їхньої дії [10]. Не дивлячись на виразну інгібуючу активність відносно мікоплазм макролідів, кліндаміцин (16-членний макролід) не рекомендований для застосування при інфекціях, викликаних *M. pneumoniae*, оскільки він не завжди проявляє активність *in vivo*. Усі мікоплазми чутливі до дії хінолонів нового покоління [11].

Останніми роками реєструється збільшення кількості резистентних до дії антибіотиків штамів молікутів. Прикладом є *M. pneumoniae*, частота виділених штамів мікроорганізмів, стійких до дії макролідів, зростає з 5,0 % (2003 р.) до 89,5 % (2011 р.) [12].

Недостатня ефективність сучасних лікарських засобів потребує пошуку нових речовин з виразною антимікробною дією та розробки на їхній основі ефективних та безпечних препаратів. У цьому плані перспективними є похідні аміноадамтантану.

Адамтантанвмісні сполуки мають широкий спектр активності, пригнічують ріст та розмноження грамозитивних та грамнегативних бактерій та грибів (плісеньутворюючих, дріжджоподібних, дерматомицетів). Антимікробну активність адамтантанвмісних сполук наведено в таблиці 1.

При дослідженні механізму інгібуючої дії адамтантанвмісних сполук встановлено, що вони здатні порушувати цілісність цитоплазматичної мембрани мікроорганізмів [19]. Підтвердженням

Антимікробна активність похідних адамантану

| Шифр сполук | Мінімальна інгібуюча концентрація, мкг/мл | | | | |
|-----------------|---|----------------|----------------------|--------------------|-----------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> | <i>A. niger</i> |
| ЮК-23 [13] | 0,6 | 10,0 | – | 0,6 | 2,5 |
| КВМ-97 [14] | 0,6 | 1,25 | 2,5 | 0,6 | 1,25 |
| АМ-166 [15, 16] | 1,25 | 2,5 | – | 1,0 | 1,0 |
| Флуконазол [17] | – | – | – | 1,0 | – |
| Лінезолід [18] | 2,0 | – | – | – | – |
| Цефепім [18] | – | 0,06 | 2,0 | – | – |

Примітка. «–» – активність відсутня.

мембранотропної дії сполук, що мають адамантильний радикал, є дослідження їхньої активності щодо мікоплазм, клітин, які не мають клітинної стінки.

Мета дослідження – визначення активності похідних адамантану відносно мікоплазм.

Матеріали та методи. Досліджувани сполуки. Для дослідження антибіотичної активності використовували похідні 1-адамантанфенолу (табл. 2), синтезовані в Інституті органічної хімії НАН України канд. фарм. наук Ю. В. Коротким. Як розчинник використовували воду.

Мікробіологічні дослідження. Антимікоплазматичну активність похідних адамантану визначали методом серійних розведень у рідкому поживному середовищі СМ ІМВ-72 відносно *Acholeplasma modicum* Leach 1973 – ATCC 29102 (NCTC 10134) та *Mycoplasma pneumoniae* ATCC 15531.

Для вирощування тест-мікроорганізмів використовували поживне середовище складу: гідролізат м'язів серця бика – 335,0 мл, настій м'яза серця бика – 335,0 мл, дріжджовий екстракт 25 % – 100,0 мл, ферментний гідролізат казеїну – 2,0 г, ДНК – 0,02 г, натрію хлорид – 5,0 г, сироватка коня – 200 мл, ацетат талію – 0,001 г, бензилпеніцилін – до концентрації 1000 ОД/мл (рН 7,5–7,8).

Мікоплазми вирощували при 32 °С протягом 72 год. Щільність інкуляту становила 10⁹ КУО/мл поживного середовища.

Результати дослідження антимікробної активності враховували через 48–72 год культивування в термостаті при 32 °С за ступенем мутності середовища. За мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) сполук приймали максимальне розведення, при якому не спостерігали зростання мікроорганізмів.

Таблиця 2

Структурні формули похідних 1-адамантанфенолу

| Шифр | Структурна формула |
|--------|--------------------|
| ЮК-23 | |
| КВМ-97 | |
| АМ-166 | |

Інгібуюча дія похідних 1-адамантанфенолу відносно молікутів

| Шифр сполук | Мінімальна інгібуюча концентрація, мкг/мл | |
|-------------|---|--|
| | <i>Acholeplasma modicum</i> ATCC 29102 | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> ATCC 15531 |
| ЮК-23 | 6,25 | 3,12 |
| КВМ-97 | 12,50 | 1,56 |
| АМ-166 | 6,25 | 6,25 |

Результати та їх обговорення. Отримані результати наведено в таблиці 3.

Серед досліджених похідних 1-адамантанфенолу відносно *A. modicum* найактивнішими виявилися сполуки ЮК-23 та АМ-166 (МІК – 6,25 мкг/мл для обох сполук) відносно *M. pneumoniae* – КВМ-97 (МІК – 1,56 мкг/мл).

У результаті проведених експериментів щодо інгібуючої дії похідних адамантану встановлено, що найбільшу інгібуючу активність відносно *M. pneumoniae* виявляла сполука КВМ-97 (МІК – 1,56 мкг/мл).

Порівняно з сучасними антимікробними засобами відносно *M. pneumoniae* похідні 1-адамантанфенолу поступаються за активністю хінолонам (МІК моксифлоксацину 0,12 мкг/мл, левофлоксацину – 0,5–2,0 мкг/мл) та аміноглікозидам (МІК азитроміцину – 0,008–0,120 мкг/мл). У той самий час, досліджені сполуки не поступаються за активністю новому антибіотику еверніміцину, МІК якого відносно *M. pneumoniae* складає 2,0–4,0 мкг/мл відповідно [10].

Похідні 1-адамантанфенолу мають переваги перед лінезолідом, активним відносно *M. hominis* (МІК 2,0–8,0 мкг/мл), проте штами *M. pneumoniae* є нечутливими до його дії (МІК > 64,0) [10].

Цікавим є той факт, що представники роду *Mycoplasma* відрізняються від *Acholeplasma* складом клітинної мембрани та потребою в стеринах для росту клітин. Головним компонентом клітинної мембрани *Mycoplasma* є холестерол, до складу мембрани клітин *Acholeplasma* входять нейтральні глі-

коліпіді – ліпоглікани [20]. Відмінність мембранного складу зумовлює різну чутливість до мембранотропних агентів. Так, ахолеплазми практично не чутливі до дії 1,5 % дигітоніну та амфотерицину В на відміну від мікоплазм. Це пов'язано зі здатністю амфотерицину В та дигітоніну утворювати комплекси зі стеринами мембрани, у результаті чого відбувається дезорганізація ліпідного шару, що призводить до зміни проникності та, можливо, лізису клітин [21, 22].

Отже, можна вважати, що активність похідних 1-адамантанфенолу відносно молікут не пов'язана зі складом мембран, сполуки не утворюють комплексів зі стеринами. Це також підтверджується дослідженнями, проведеними відносно дріжджоподібних грибів *C. albicans*. При вивченні впливу похідного 1-адамантанфенолу АМ-166 на синтез ергостерину грибів встановлено, що ця сполука не вступає з ним у хімічну взаємодію [23].

Висновок

Похідні 1-адамантанфенолу впливають на ріст та розмноження молікутів *Acholeplasma modicum* та *Mycoplasma pneumoniae*, МІК знаходиться в діапазоні концентрацій 1,56–12,50 мкг/мл. Механізм антимікробної дії похідних 1-адамантанфенолу відносно молікутів зумовлений впливом на внутрішньоклітинні процеси та/або плазматичну мембрану і не пов'язаний з впливом на синтез пептидоглікану клітинної стінки та стеролів клітинної мембрани.

1. Микоплазми // Борхсениус С. Н., Чернова О. А., Чернов В. М., Вонский М. С.]. – СПб. : «Наука», 2002. – 320 с.
2. Сличак Т. В. Место противовоспалительной терапии при острых респираторных заболеваниях у детей / Т. В. Сличак // Педиатрия. – 2012. – Т. 91, № 5. – С. 67–73.
3. Waites K. B. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen / K. B. Waites, D. F. Talkington // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2004. – V. 17, № 4. – P. 697–728.

4. Резниченко Г. И. Роль микоплазменной инфекции в развитии хронических воспалительных заболеваний у женщин и детей / Г. И. Резниченко, Ю. Г. Резниченко, Н. Ю. Резниченко // Здоровье ребенка. – 2007. – Т. 3, № 6. – С. 18–21.
5. Laso M. C. Mycoplasma pneumoniae detection with PCR in renal tissue of a patient with acute glomerulonephritis / M. C. Laso, M. E. Cadario, L. Haymes // *Pediatr. Nephrol.* – 2006. – V. 21, № 10. – P. 1483–1486.
6. Septic shock, necrotizing pneumonitis, and meningoencephalitis caused by Mycoplasma pneumoniae in a child: a case report / E. R. Barreira, D. C. Souza, P. F. Góes [et al.] // *Clin. Pediatr (Phila).* – 2009. – V. 48, № 3. – P. 320–322.
7. Narita M. Pathogenesis of neurologic manifestations of Mycoplasma pneumoniae infection / M. Narita // *Pediatr. Neurol.* 2009. – № 41. – P. 159–166.
8. David S. A. W. Evaluation of Mycoplasma inactivation during production of biologics: egg-based viral vaccines as a model / S. A. W. David, D. V. Volokhov, Z. Ye, V. Chizhikov // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – V. 76, № 9. – P. 2718–2728.
9. Isolation of Acholeplasmatales from rabbit faeces / A. F. Angulo, M. Doeksen, A. Hill, A. J. Polak-Vogelzang // *Lab. Anim.*, 1987. – V. 21. – P. 201–204.
10. Kenny G. E. Susceptibilities of Mycoplasma hominis, M. pneumoniae, and Ureaplasma urealyticum to GAR-936, dalbopristin, dirithromycin, evernimicin, gatifloxacin, linezolid, moxifloxacin, quinupristin-dalbopristin, and telithromycin compared to their susceptibilities to reference macrolides, tetracyclines, and quinolones / G. E. Kenny, F. D. Cartwright // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. – V. 45, № 9. – P. 2604–2608.
11. *In vitro* Activity of a New Quinoline Derivative, ER-2 against Clinical Isolates of Mycoplasma pneumoniae and Mycoplasma hominis / S. Shilpakala, R. Raghavachari, E. Ramesh, R. Malathi // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2009. – V. 53, № 12. – P. 5317–5318.
12. Drug resistance mechanisms of Mycoplasma pneumoniae to macrolide antibiotics / X. Liu, Y. Jiang, X. Chen [et al.] // *BioMed Research International*, 2014 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/320801>.
13. Пат. № 84649, UA, МПК C07C 217/32 (2006.01), A61K 31/14 (2006.01). 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-[N-бензил, N-метил(циклогексил)амоний]-2-пропанол хлорид / Максимов Ю. М., Короткий Ю. В., Вринчану Н. О. та ін.; – власник Інститут фармакології і токсикології АМН України. – № а2007 05294; заявл. 15.05.07; опубл. 10.11.08, Бюл. № 21.
14. Пат. № 89570, UA, МПК C07C 213/00, C07C 215/00, A61K 31/14 (2006.01). 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-(N-бензил, N-диметиламіно)-2-пропанол хлорид / Короткий Ю. В., Максимов Ю. М., Вринчану Н. О. та ін.; – власник Інститут фармакології і токсикології АМН України. – № а200804978; заявл. 17.04.08; опубл. 10.02.10, Бюл. № 3.
15. Вринчану Н. О. Антибактеріальна дія 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил) бензолу / Н. О. Вринчану // *Мікробіологічний журнал.* – 2007. – Т. 69, № 5. – С. 42–47.
16. Вринчану Н. А. Ингибирующая активность 4-(адамантил-1)-1-(1-аминобутил) бензола по отношению к дрожжеподобным грибам / Н. А. Вринчану // *Успехи медицинской микологии. Пятый Всероссийский Конгресс по медицинской микологии, 19–23 апреля 2007 г.: тезисы докладов.* – Москва, 2007. – Т. IX. – С. 280–281.
17. EUCAST. Antifungal Agents. Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 6.1, valid from 2013-03-11 [Электронный ресурс] - Режим доступа: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Antifungal_breakpoints_v_6.1.pdf.
18. EUCAST. Routine internal quality control as recommended by EUCAST. Version 3.1, valid from 2013-01-01. [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/EUCAST_Routine_QC_tables_3.1.pdf.
19. Вринчану Н. О. Дослідження деяких сторін механізму антигрибкової дії нового похідного адамантану / Н. О. Вринчану, О. В Сергієнко, Ю. М. Максимов // *Морфологія.* – 2009. – Т. III, № 2. – С. 2427.
20. Metabolomic analysis of three mollicute species / A. A. Vanyushkina, G. Y. Fisunov, A. Y. Gorbachev [et al.] // *PLoS One*, – 2014. – V. 9, № 3. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3942410/pdf/pone.0089312.pdf>.
21. Freundt E. A. Activity of herbicolin A against Mycoplasma, Acholeplasma, Ureaplasma, and Spiroplasma species / E. A. Freundt, G. Winkelmann // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1984. – V. 26, № 1. – P. 112–114.
22. Rottem S. Differentiation of sterol-requiring from sterol nonrequiring mycoplasmas by Amphotericin B / S. Rottem // *Appl. Microbiol.*, – 1972. – V. 23, № 3. – P. 659–660.
23. Вринчану Н. А. Влияние аминадамантана на синтез эргостерина *S. albicans* / Н. А. Вринчану // *Иммунология, алергология, инфектология.* – 2009. – № 2. – С. 137–138.

Д. М. Дудікова, К. С. Коробкова, І. П. Токовенко
Антимікоплазмова активність похідних 1-адамантанфенолу

Останнім часом значну увагу приділяють ролі мікоплазм у патогенезі інфекційно-запальних процесів різних систем організму людини.

Мета дослідження – вивчення активності відносно мікоплазм похідних 1-адамантанфенолу – АМ-166, ЮК-23 та КВМ-97.

Мінімальну інгібуючу концентрацію визначали методом серійних розведень у рідкому поживному середовищі СМ ІМВ-72 відносно *Acholeplasma modicum* і *Mycoplasma pneumoniae*.

Встановлено, що вперше синтезовані похідні 1-адамантанфенолу здатні інгібувати ріст обох штамів. Активність сполуки ЮК-23 відносно *A. modicum* та *M. pneumoniae* становить 6,25 мкг/мл та 3,12 мкг/мл, КВМ-97 – 12,5 мкг/мл та 1,56 мкг/мл відповідно. Активність АМ-166 відносно обох штамів становить 6,25 мкг/мл. Механізм антимікробної дії похідних 1-адамантанфенолу відносно молікутів зумовлений впливом на внутрішньоклітинні процеси та/або плазматичну мембрану і не пов'язаний з впливом на синтез пептидоглікану клітинної стінки та стеролів клітинної мембрани.

Ключові слова: мікоплазми, похідні адамантанфенолу, антимікробні засоби

Д. М. Дудикова, Е. С. Коробкова, І. П. Токовенко
Антимікоплазменная активність производных 1-адамантанфенола

В настоящее время большое внимание уделяется роли микоплазм в патогенезе инфекционно-воспалительных процессов разных систем организма человека.

Цель исследования – изучение антимікоплазменной активности производных 1-адамантанфенола – АМ-166, ЮК-23 и КВМ-97.

Минимальную ингибирующую концентрацию соединений определяли методом серийных разведений в жидкой питательной среде СМ ІМВ-72 в отношении *Acholeplasma modicum* и *Mycoplasma pneumoniae*.

Установлено, что впервые синтезированные производные 1-адамантанфенола способны ингибировать рост обоих штаммов. Активность соединения ЮК-23 в отношении *A. modicum* и *M. pneumoniae* составляет 6,25 мкг/мл и 3,12 мкг/мл, КВМ-97 – 12,5 мкг/мл и 1,56 мкг/мл соответственно. Активность АМ-166 в отношении обоих штаммов составляет 6,25 мкг/мл. Механизм антимікробного действия производных 1-адамантанфенола относительно молликутов обусловлен влиянием на внутриклеточные процессы и/или плазматическую мембрану и не связан с влиянием на синтез пептидоглікана клеточной стенки и стеролов клеточной мембраны.

Ключевые слова: микоплазмы, производные адамантанфенола, антимікробные препараты

D. M. Dudikova, K. S. Korobkova, I. P. Tokovenko
Susceptibility of mycoplasmas to 1-adamantane phenol derivatives

Currently, much attention is given to the role of *Mycoplasma* organisms in the pathogenesis of infectious-inflammatory processes of the urogenital and respiratory systems.

The aim of the current study was to investigate antimycoplasma activity of 1-adamantane phenol derivatives (AM-166, UK-23 and KVM-97). Minimum inhibitory concentrations (MICs) against *Acholeplasma modicum* and *Mycoplasma pneumoniae* were determined by the serial tube dilution method. Serial two-fold dilutions of the compounds in the medium were inoculated with a culture of microorganisms (10^9 colony-forming units/ml) and then incubated at 32 °C for 3 days. *In vitro* data indicate that mycoplasma organisms were sensitive to all compounds tested. Our study indicates that activity of UK-23 against *A. modicum* and *M. pneumoniae* were 6,25 µg/ml and 3,12 µg/ml, KVM-97 – 12,5 µg/ml and 1,56 µg/ml respectively. AM-166 activity was 6,25 µg/ml against both strains.

Mechanism of antimicrobial action of 1-adamantane phenol derivatives against mollicutes caused by effect on intracellular processes and/or the plasma membrane and is not associated with an effect on the synthesis of cell wall peptidoglycan and cell membrane sterols.

Key words: mycoplasmas, adamantane phenol derivatives, antibiotics

Надійшла: 08.05.2014 р.

Контактна особа: Дудікова Дар'я Маратівна, молодший науковий співробітник, відділ фармакології протимікробних засобів, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Е. Потье, м. Київ, 03680. Тел.: +38 0 44 456-83-32.
Електронна пошта: darmardud@gmail.com.