

Д. М. Дудікова<sup>1</sup>, С. І. Войчук<sup>2</sup>, Н. О. Вринчану<sup>1</sup>

## **Особливості ультраструктури *Staphylococcus aureus* за дії 4-(1-адамантил) фенокси-3-(N-бензил, N-метил, N-циклогексил)- 2-пропанол хлориду**

<sup>1</sup>Державна установа «Інститут фармакології та токсикології  
Національної академії медичних наук України», м. Київ

<sup>2</sup>Інститут мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного  
Національної академії наук України, м. Київ

*Ключові слова:* похідні адамантану,  
механізм дії, ультраструктура,  
*Staphylococcus aureus*

Антимікробні речовини, контактуючи з клітинами бактерій або грибів, здатні порушувати функції мікробної клітини, впливаючи на внутрішньоклітинні процеси або структурну організацію мембранного апарату. Механізми специфічної дії антимікробних препаратів обумовлюють бактерицидний або бактеріостатичний ефект. Так, дія препаратів з бактерицидним ефектом (пеніциліни, цефалоспорины, карбапенеми, монобактами та ін.) пов'язана з впливом на клітинну стінку або цитоплазматичну мембрану, бактеріостатичний ефект зареєстровано в лікарських засобів, які впливають на синтез білка та нуклеїнові кислоти (макроліди, тетрацикліни, лінкозаміди та ін.) [1].

Одним з методів виявлення порушень у мікробній клітині є електронна мікроскопія, яка дає змогу виявити мішені дії сполук та препаратів, а саме їхній вплив на структуру зовнішньої оболонки, апарат поділу, наявність мембранотропної активності тощо.

Препарати, які порушують цілісність клітинної мембрани, зокрема, орітаванцин та даптоміцин, викликають структурні зміни клітинної оболонки, порушують процеси поділу, знижують мембранний потенціал і сприяють збільшенню проникності мембрани мікроорганізмів [2].

Мембранотропну дію здатні проявляти й похідні адамантану. У досліджен-

нях [3] встановлено, що сполука 4-(адамантил-1)-(1-амінобутил)бензол порушує ультраструктуру бактерій та грибів, при її дії рееструється альтерація клітинної оболонки з пошкодженням процесів клітинного ділення, зростання поліморфізму та зменшення життєздатності клітинної популяції. У зовнішній мембрані бактерій спостерігається підвищення вмісту ліпополісахаридів зі зміненим моносахаридним і жирнокислотним складом.

У скринінгових дослідженнях нами була виділена адамантанвмісна сполука 4-(1-адамантил)фенокси-3-(N-бензил, N-метил, N-циклогексил)-2-пропанол хлорид (шифр ЮК-23) з виразними антистафілококовими властивостями. Сполука синтезована в Інституті органічної хімії НАН України кандидатом фармацевтичних наук Ю. В. Коротким. Для з'ясування механізму антибактеріальної активності, мішені дії сполуки було доцільно провести електронно-мікроскопічні дослідження.

*Мета дослідження* – встановити зміни ультраструктури *Staphylococcus aureus* за дії похідного алкоксіаміно-1-адамантанфенолу.

*Матеріали та методи.* Вплив похідного алкоксіаміно-1-адамантанфенолу на структурну організацію мікроорганізмів досліджували відносно грампозитивних бактерій *S. aureus* ATCC 25923. Мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) визначали методом серійних макророзведень у рідкому поживному середовищі за загальноприйнятою методикою [4]. Щільність інокуляту складала 10<sup>6</sup> КУО/мл поживного середовища.

Для визначення змін ультраструктури бактерій за умови впливу похідного алкоксіаміно-1-адамтанфенолу використовували метод трансмісійної електронної мікроскопії. Тест-об'єктами в дослідженні були мікроорганізми, що знаходились у експоненціальній фазі росту. Бактеріальні клітини інкубували впродовж 1 год та 24 год у середовищі, що містило сполуку в концентрації 2,0 МІК.

Після закінчення терміну інкубації клітини відмивали 0,9 % розчином натрію хлориду та здійснювали фіксацію сумішшю 2,5 % глутарового альдегіду та 4,0 % розчину формальдегіду, додатково фіксували 1,0 % розчином тетроксиду осмію на фосфатному буфері (рН 7,4), зневоднювали в зростаючих концентраціях ацетону та полімеризували в смолі Ероне 812 [5]. Ультратонкі зрізи отримували, використовуючи ультрамікроскоп LKB-8800, їх контрастували розчинами уранілу ацетату та цитрату свинцю [6, 7].

Зрізи аналізували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа JEM-1400 (Jeol, Японія) при напрузі 80 кВ.

**Результати та їх обговорення.** Отримані дані свідчать, що сполука ЮК-23 має виразну антибактеріальну активність відносно *S. aureus*, МІК становить 0,62 мг/мл.

Для вивчення впливу сполуки на ультраструктуру *S. aureus* був проведений аналіз змін морфології клітин, які піддавались дії ЮК-23 у бактерицидній

концентрації 2,0 МІК порівняно з інтактними клітинами (контроль).

Проведені електронно-мікроскопічні дослідження показали, що інтактні клітини *S. aureus* (контроль) мали типову ультраструктурну організацію: клітини оточені клітинною стінкою, однакові за розміром та округлої форми (рис. 1, А).

Спостерігали двошарову клітинну стінку з зовнішнім шаром з високою електронною щільністю та внутрішнім шаром – з низькою щільністю (рис. 1, Б). Позаклітинний екзополісахаридний шар – не розвинений, зовнішня поверхня клітин мала гладку топографію. Цитоплазматична мембрана в основному не мала інвагінацій та щільно прилягала до цитоплазми, а тому не виділялася в окрему структуру на ультратонких зрізах. Цитоплазма мала високу електронну щільність і відносну гомогенність. Дещо вищою була електронна щільність і нуклеоїду (порівняно з іншими компонентами цитоплазми), однак він не мав вираженого розташування та зливався з компонентами цитоплазми. Останнє може свідчити про високу білоксинтетичну активність у клітинах бактерій.

За дії сполуки ЮК-23 у бактерицидній концентрації на клітини *S. aureus* (рис. 2, А) вже через 1 год впливу реєстрували порушення структурної організації цитоплазматичної мембрани клітин і внутрішньоклітинних процесів, які посилювались зі збільшенням часу експозиції з сполукою. Клітинна стінка

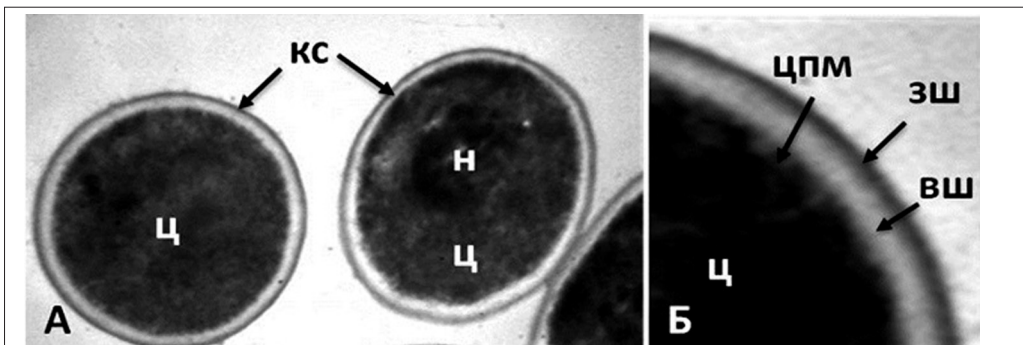


Рис. 1. Ультраструктура клітин *S. aureus* (інтактний контроль), поперечний зріз (А), структура клітинної оболонки (фрагмент) (Б). Електронна мікроскопія, збільшення  $\times 20\ 000$

Примітка. Тут і на рис. 2: КС – клітинна стінка, Ц – цитоплазма, Н – нуклеоїд, ЦПМ – цитоплазматична мембрана, ЗШ – зовнішній шар клітинної стінки, ВШ – внутрішній шар клітинної стінки.

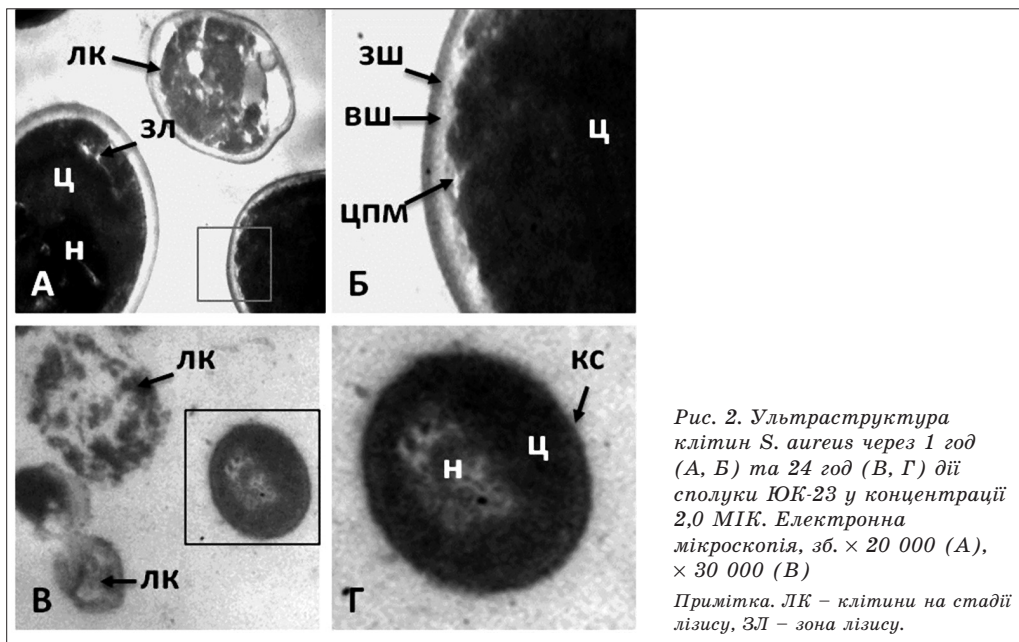


Рис. 2. Ультраструктура клітин *S. aureus* через 1 год (А, В) та 24 год (В, Г) дії сполуки ЮК-23 у концентрації 2,0 МІК. Електронна мікроскопія, зб.  $\times 20\ 000$  (А),  $\times 30\ 000$  (В)

Примітка. ЛК – клітини на стадії лізису, ЗЛ – зона лізису.

зберігала двошарову будову, що є характерною для інтактних клітин, натомість цитоплазматична мембрана локально відокремлювалась від компонентів цитоплазми, або спостерігалось утворення чисельних незначних інвагінацій (рис. 2, В). Цитоплазма набувала високої електронної щільності та містила неупорядковані просвітлені ділянки, які ймовірно є місцями ініціації лізису внутрішньоклітинного матеріалу. У зоні нуклеоїду відмічалось утворення електронно-щільного агломерату з чисельними просвітленими ділянками (рис. 2, А).

Ефект дії речовини посилювався з часом, і через 24 год експозиції зі сполукою ЮК-23 відмічали поліморфізм клітин та їхній лізис (рис. 2, В). У більшості клітин відмічали порушення морфології, відшарування клітинної стінки від цитоплазми, конденсацію вмісту цитоплазми з утворенням зон просвітлення, деформацію та деградацію клітинної стінки. Від окремих клітин залишався внутрішньоклітинний вміст, оточений залишками клітинної стінки, без характерної будови та розподілу на шари (рис. 2, Г).

Отримані дані дослідження свідчать, що під впливом сполуки ЮК-23 першочергово відбувається порушення організації цитоплазми та деградація генетичного апарату. Поява зон просвітлення в цитоплазмі клітин може свідчити про

вихід водорозчинних низькомолекулярних компонентів та збільшення гідратації клітини, а також втрату осмотичного тиску всередині клітини. Клітинна стінка при цьому очевидних змін не зазнає (можливо, через велику кількість шарів пептидоглікану в клітинах стафілококу), а тому, ймовірно, її компоненти не є мішенями дії для сполуки ЮК-23.

Зміни, що відмічаються в будові клітинних оболонок зі збільшенням часу експозиції (через 24 год), ймовірно, є наслідком дії ЮК-23 саме на рівні структур цитоплазми та генетичного апарату, можливо, через блокування біосинтетичних процесів, що підтримують цілісність клітинної стінки. Так, навколо нуклеоїду відмічені зони просвітлення, що може свідчити як про зниження біосинтетичної активності в клітинах бактерій, так і про дію сполуки безпосередньо на ДНК.

За характером змін у клітинах стафілококу механізм дії похідних адамантану відрізняється від такого аміноглікозидів, глікопептидів, пеніцилінів та фторхінолонів. Інгібування біосинтетичних процесів, зокрема, синтезу білка та нуклеїнових кислот, супроводжується незначним збільшенням клітин *S. aureus* у розмірах, потовщенням зовнішньої мембрани, конденсацією нуклеоїду та рибосом, появою шоркуватості зовнішньої оболонки та мезосо-

мальних структур. У присутності інгібіторів синтезу ДНК (ципрофлоксацин) головною особливістю морфології клітин стафілококів є коагуляція ДНК [8].

Інкубація клітин стафілококу в присутності оксациліну та ванкоміцину – інгібіторів синтезу клітинної стінки супроводжується значним збільшенням клітин у розмірах, втратою ними округлої форми та відшаруваннями зовнішньої мембрани, а також появою мезосомальних структур [8].

Таким чином, механізм дії похідного алкоксіаміно-1-адамтанфенолу ЮК-23 відрізняється від такого інгібіторів синтезу компонентів клітинної

стінки, білка або ДНК. Ймовірно, анти-мікробний ефект сполуки зумовлений одночасною дією на цитоплазму та генетичний апарат бактеріальної клітини в різних точках прикладання.

### **Висновок**

Встановлено, що похідне алкоксіаміно-1-адамтанфенолу ЮК-23 призводить до порушення ультраструктури клітин золотистого стафілококу та генетичного апарату, що проявляється відшаруванням клітинної оболонки від цитоплазми, конденсацією цитоплазми з утворенням зон просвітлення, лізисом внутрішньоклітинного вмісту.

1. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / под ред. Л. С. Страчунского, Ю. Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – Москва, 2002. – 375 с.
2. Belley A. Ultrastructural effects of oritavancin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus* / A. Belley, R. Harris, T. Beveridge // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2009. – V.53, № 2. – P.800–804.
3. Вринчану Н. О. Антимікробні властивості нових похідних аміноадамтану та експериментальне обґрунтування доцільності їх медичного використання: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора мед. наук; спец. 14.03.05 «Фармакологія» / Вринчану Ніна Олексіївна; Інститут фармакології та токсикології НАМН України. – Київ, 2010. – 38 с.
4. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: методичні рекомендації / під ред. Ю. Л. Волянського, Ш. С. Гриценко, В. П. Широбокова [та ін.]. – Київ, 2004. – 38 с.
5. Bozzola J. J. Conventional specimen preparation techniques for transmission electron microscopy of cultured cells / J. J. Bozzola // *Electron microscopy: methods and protocols*: ed. John Kuo. – Totowa, NJ : Humana Press, 2007. – P. 1–18.
6. Ellis E. A. Poststaining grids for transmission electron microscopy / E. A. Ellis // *Electron microscopy: methods and protocols*: ed. John Kuo. – Totowa, NJ : Humana Press, 2007. – P. 97–106.
7. *Histopathology Kits: methods and applications*/ eds. F. Venerucci [et al.]. – Bologna, 1998. – 95 p.
8. Ultrastructural study on the effects of antibiotics on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 / Raj L. Santhana, H. L. Hing, Omar Baharudin [et al.]. // *Annals of microscopy*. – 2007. – V. 7. – P. 109–114.

### **Д. М. Дудікова, С. І. Войчук, Н. О. Вринчану** **Особливості ультраструктури *Staphylococcus aureus* за дії 4-(1-адамтаніл) феноксі-3-(N-бензил, N-метил, N-циклогексил)-2-пропанол хлориду**

Розповсюдження резистентності до антимікробних препаратів свідчить про нагальну потребу в нових антибіотиках. Одним з багатобіляючих хімічних класів речовин для їхньої розробки є похідні адамтану. У скринінгових дослідженнях була виділена сполука ЮК-23, яка проявляє виражені антистафілококові властивості.

**Мета дослідження** – встановити зміни ультраструктури *Staphylococcus aureus* за дії похідного алкоксіаміно-1-адамтанфенолу.

У всіх експериментах використовували культуру *S. aureus* ATCC 25923. Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) була визначена методом серійних макророзведень у поживному середовищі. Для вивчення впливу сполуки на ультраструктуру клітин, їх інкубували протягом 1 та 24 год у середовищі, що містило сполуку в концентрації 2,0 МІК. Отримані зразки аналізували методом трансмісійної електронної мікроскопії після контрастування ураніл ацетатом та цитратом свинцю.

Отримані дані свідчать, що сполука ЮК-23 проявляє виражену антибактеріальну активність відносно *S. aureus*, МІК становить 0,6 мкг/мл.

Інкубація *S. aureus* зі сполукою ЮК-23 у бактерицидній концентрації призводить до порушення морфології клітин (відшарування цитоплазматичної мембрани, поява зон просвітлення в цитоплазмі) вже через 1 год. При збільшенні часу інкубації до 24 год зміни поглиблювались: спостерігалось відшарування клітинної стінки та її деградація, конденсація вмісту цитоплазми з утворенням зон просвітлення, лізис клітин.

Виявлені зміни ультраструктури *S. aureus* вказують на можливий механізм дії сполуки ЮК-23, пов'язаний з її впливом на цитоплазму та деградацією генетичного апарату.

**Ключові слова:** похідні адамтану, механізм дії, ультраструктура, *Staphylococcus aureus*

---

**Д. М. Дудикова, С. И. Войчук, Н. А. Врынчану**  
**Особенности ультраструктуры *Staphylococcus aureus* при действии**  
**4-(1-адамантил) фенокси-3-(N-бензил, N-метил, N-циклогексил)-2-пропанол**  
**хлорида**

Распространенность устойчивости к антимикробным препаратам свидетельствует о насущной потребности в новых антибиотиках. Одними из многообещающих химических классов веществ для их разработки являются производные адамантана. В скрининговых исследованиях было выделено соединение ЮК-23, проявляющее выраженные антистафилококковые свойства.

*Цель исследования* – установить изменения ультраструктуры *Staphylococcus aureus* при действии производного алкоксиамино-1-адамантанфенола.

Во всех экспериментах использовали культуру *S. aureus* ATCC 25923. Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) определяли методом серийных макроразведений в питательной среде. Для изучения влияния соединения на ультраструктуру клеток их инкубировали в течение 1 и 24 ч в среде, содержащей соединение в концентрации 2,0 МПК. Полученные образцы анализировали методом трансмиссионной электронной микроскопии после контрастирования уранил ацетатом и цитратом свинца.

Полученные данные свидетельствуют, что соединение ЮК-23 проявляет выраженную антибактериальную активность в отношении *S. aureus*, МПК составляет 0,6 мкг/мл.

Инкубация *S. aureus* с соединением ЮК-23 в бактерицидной концентрации приводит к нарушению морфологии клеток (отслоение цитоплазматической мембраны, появление зон просветления в цитоплазме) уже через 1 ч. При увеличении времени инкубации до 24 ч изменения усиливались: наблюдалось отслоение клеточной стенки и ее деградация, конденсация содержимого цитоплазмы с образованием зон просветления, лизис клеток.

Обнаруженные изменения ультраструктуры клеток *S. aureus* указывают на возможный механизм действия соединения ЮК-23, связанный с его влиянием на цитоплазму и деградацией генетического аппарата.

*Ключевые слова:* производные адамантана, механизм действия, ультраструктура, *Staphylococcus aureus*

**D. M. Dudikova, S. I. Voychuk, N. O. Vrynchanu**  
**Ultrastructural features of *Staphylococcus aureus* caused by 4-(1-adamantyl)phenoxy-3-(N-benzyl, N-methyl, N-cyclohexyl)-2-propanol chloride**

The spread of multidrug resistant strains created a critical need of the new effective antimicrobial agents. One of the promising chemical classes for its research and development are adamantane derivatives. After the screening studies compound UK-23 was selected as the potent anti-staphylococcal agent.

In the present study the purpose was to examine ultrastructural alterations of *Staphylococcus aureus* cells under the influence of alkoxyamino-1-adamantanephenol derivative.

*S. aureus* ATCC 25923 was used in all experiments. The minimum inhibitory concentration was determined by serial macrodilution test in broth. Bacterial cells were exposed to the 2,0 MIC of the UK-23 for 1 h and 24 h. Ultrastructure of intact and treated *S. aureus* cells was examined by transmission electron microscopy after contrasting by uranyl acetate and lead citrate.

The compound UK-23 possesses a distinct antibacterial activity against *S. aureus*, the minimum inhibitory concentration was 0,6 µg/ml.

We found that the bactericidal concentration of compound UK-23 caused defects in cell morphology (detachment of cytoplasmic membrane, enlightenment of cytoplasm) starting from 1 h of treatment. Increase of the incubation time to 24 h led to exacerbation of alterations: detachment and degradation of cell wall, condensation of cytoplasm with zone of enlightenment, cells lysis were registered.

The detected ultrastructural alterations of *S. aureus* suggest the possible mechanism of action of UK-23, due to its influence on the cytoplasm and degradation of genetic apparatus.

*Key words:* adamantane derivatives, mechanism of action, ultrastructure, *Staphylococcus aureus*

---

Надійшла: 12 квітня 2017 р.

**Контактна особа:** Дудикова Дар'я Маратівна, молодший науковий співробітник, відділ фармакології протимікробних засобів, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Е. Потьє, м. Київ, 03057. Тел.: +38 0 44 456 83 32.  
Електронна пошта: darmardud@gmail.com