

Д. М. Дудікова¹, Н. О. Вринчану¹, Ю. В. Короткий², М. Л. Дронова¹,
З. С. Суворова¹, А. О. Шарова¹, Н. І. Гринчук¹, В. В. Недашківська¹

Антибактеріальна активність амінопропанолів з адамантільним і N-алкіларильним радикалом відносно біоплівки *E. coli*

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

²Інститут органічної хімії Національної академії наук України, м. Київ

Ключові слова: біоплівки, мікроорганізми,
E. coli, похідні амінопропанолу,
антибактеріальні засоби

Однією з актуальних і складних проблем сучасної медицини залишається лікування пацієнтів з гнійно-запальними захворюваннями. Останнім часом надзвичайного поширення набули нозокоміальні інфекції. Причиною їхнього виникнення є особливі госпітальні штами мікроорганізмів з підвищеною агресивністю, здатністю протистояти захисним силам організму, а також полірезистентністю до протимікробних засобів [1]. Одним з прикладів таких збудників є кишкова паличка, яка здатна викликати гострі та хронічні інфекції шлунково-кишкового тракту, сечовидільної та статеві системи у людини. Процес хронізації захворювання, зокрема ешерихіозу, забезпечується особливою формою існування бактерій у вигляді специфічно організованих та прикріплених до субстрату мікробних спільнот – біоплівок.

Утворення біоплівок є однією з основних стратегій виживання бактерій у навколишньому середовищі, у тому числі в організмі господаря. Здатність мікроорганізмів існувати в стані біоплівки знижує ефективність антимікробної хіміотерапії, оскільки за таких умов значно підвищується стійкість бактерій до дії антибактеріальних, дезінфікуючих засобів і несприятливих факторів середовища.

Показано, що бактерії в біоплівках стійкі до дії антибіотиків у концентраціях у 100–1000 разів більших, ніж їхня мінімальна інгібуюча концентра-

ція *in vitro* відносно планктонних мікроорганізмів [2]. Застосування антимікробних препаратів у звичайних терапевтичних дозах може призводити до відбору стійких штамів мікроорганізмів, а неповна ерадикація збудників за біоплівкових інфекцій, у свою чергу, сприяє їхній персистенції та хронізації запальних процесів.

Отже, проблема стійкості мікроорганізмів до антимікробних засобів і зниження ефективності препаратів для лікування гнійно-запальних захворювань у світі тільки загострюється, що свідчить про актуальність та необхідність подальших досліджень у цій області, зокрема, вивчення здатності нових сполук та офіційних препаратів з протимікробною активністю впливати на різні етапи формування біоплівки та на сформовану мікробну спільноту.

Раніше нами було показано вплив амінопропанолів з адамантільним або N-алкіларильним радикалом на початковий етап плівкоутворення – адгезію кишкової палички до абіотичної поверхні та антибіоплівкову активність амінопропанолів відносно *Candida albicans* [3, 4].

Мета дослідження – встановити вплив нових похідних амінопропанолів на плівкоутворення та сформовані *E. coli* біоплівки порівняно з антибактеріальними препаратами.

Матеріали та методи. Дослідження антибіоплівкової активності похідних амінопропанолу здійснено з використанням сполуки з адамантільним (КВМ-97) або N-алкіларильним (КВМ-194, КВМ-204, КВМ-261, КВМ-262)

радикалом [5, 6]. Оцінку антибіоплівкової активності сполук здійснено у порівнянні з антимікробними препаратами різних груп: фторхінолонами (ципрофлоксацин, «Ципринол», КРКА, Словенія), карбапенемами (меропенем, «Меронем», АстраЗенека ЮК Лімітед, Великобританія), аміноглікозидами (гентаміцин, «Гентаміцин-Здоров'я», ТОВ «ФК «Здоров'я», Україна) та цефалоспоридами (цефтазидим, «Цефтум®», ПАТ «Київмедпрепарат», Україна).

Експерименти проведено з використанням клінічного штаму *E. coli* 311, резистентного до дії амікацину, норфлоксацину та цефоперазону, чутливого до гентаміцину, меропенему, цефтазидиму та ципрофлоксацину.

Чутливість тест-штаму до дії похідних амінопропанолу визначали методом серійних мікророзведень і оцінювали за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) згідно з загальноприйнятою методикою [7].

Здатність сполук впливати на плівкоутворення та сформовані біоплівки *E. coli* визначали методом сорбції генціанвіолету на структурах біоплівки з подальшою їхньою десорбцією в органічний розчинник з використанням полістиролових планшетів для імуноферментного аналізу [8]. Для вивчення впливу сполук на плівкоутворення внесення розчинів досліджуваних речовин та культури проводили одночасно, за дії на сформовані біоплівки – на 1 та 5 добу після інокуляції. Концентрації сполук та препаратів становили 5,0 та 0,5 МІК. Дослідження проведені з використанням нічної культури, розведеної в 100 разів, яку вирощували на рідкому поживному середовищі № 8. Термін інкубації з розчинами сполук та препаратів становив 24 год за температури 37 °С. Уміст планшетів видаляли, промивали лунки, внесли 0,1 % розчин генціанвіолету, витримували 15 хв, після чого барвник екстрагували етанолом. Вимірювання оптичної щільності проводили на Adsorbance Microplate Reader EL x 800 (BioTek, США) за довжини хвилі 630 нм. Контролем були інтактні культури мікроорганізмів, вирощені за тих самих умов.

Усі дослідження проведені в трьох повторях, дані представлені як $M \pm m$, де M – середнє значення, m – стандартна помилка середнього. Статистичну обробку результатів проводили з використанням критеріїв Крассела-Уолеса та Ньюмена-Кейлса ($p < 0,05$) за допомогою «StatSoft Statistica 6.0».

Результати та їх обговорення. За результатами дослідження встановлено, що МІК похідних амінопропанолу відносно планктонних клітин *E. coli* 311 складає: КВМ-97 – 25,0 мкг/мл, КВМ-194, КВМ-204 – 50,0 мкг/мл, КВМ-261, КВМ-262 – 25,0 мкг/мл. Тест-штам є чутливим до обраних препаратів порівняння, МІК меропенему становить 0,01 мкг/мл, ципрофлоксацину – 0,015 мкг/мл, гентаміцину – 0,25 мкг/мл, цефтазидиму – 0,15 мкг/мл.

При вивченні впливу похідних амінопропанолу на процес плівкоутворення кишкової палички виявлена здатність досліджених сполук порушувати утворення біоплівки на абіотичній поверхні (рис. 1).

Встановлено, що найвиразніше порушує формування біоплівок *E. coli* сполука КВМ-262 у концентрації 5,0 МІК (92,6 %). За умови присутності в інкубаційному середовищі сполук КВМ-97, КВМ-194, КВМ-204 та КВМ-261 у концентрації 5,0 МІК пригнічення плівкоутворення складає 71,1 %, 51,1 %, 57,5 % та 76,5 % відповідно. За інгібуючим ефектом у разі 5,0 МІК сполуки КВМ-97, КВМ-261, КВМ-262 не поступаються ($p > 0,05$) усім препаратам порівняння – ципрофлоксацину, гентаміцину, цефтазидиму та меропенему.

В експериментах встановлено, що досліджувані сполуки КВМ-97, КВМ-194 і КВМ-204 виявляють виразну антибіоплівкову активність не тільки за 5,0 МІК, але й у субінгібуючій концентрації (0,5 МІК). Слід відмітити, що зменшення концентрації зазначених сполук супроводжується підвищенням інгібуючого ефекту: КВМ-97 – з 71,1 до 83,6 %, КВМ-194 – з 51,1 до 56,4 %, КВМ-204 – з 57,5 – до 63,5 %. Значного порушення плівкоутворення за дії КВМ-261 і КВМ-262 не виявлено (інгі-

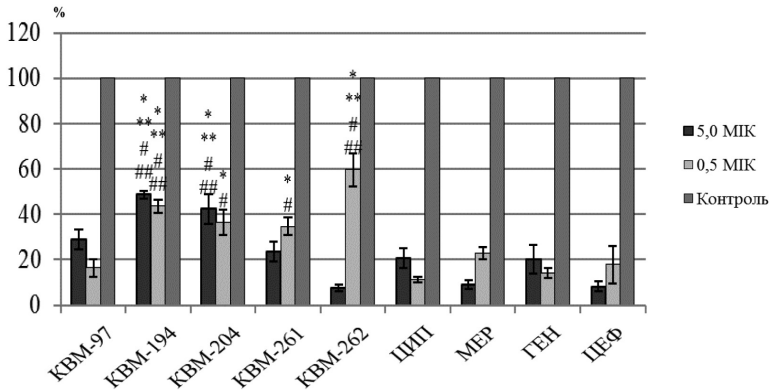


Рис. 1. Вплив похідних амінопропанолу на плівкоутворення *E. coli*, % утвореної біоплівки відносно контролю

Примітка. Тут і на рис. 2-3: ЦИП – ципрофлоксацин, МЕР – меропенем, ГЕН – гентаміцин, ЦЕФ – цефтазидим; * $p < 0,05$ відносно відповідної концентрації ципрофлоксацину, ** $p < 0,05$ відносно відповідної концентрації меропенему, # $p < 0,05$ відносно відповідної концентрації гентаміцину, ## $p < 0,05$ відносно відповідної концентрації цефтазидиму.

біція в разі 0,5 МІК 65,2 та 40,2 % відповідно).

Препарати порівняння ефективно вплинули на плівкоутворення кишкової палички. Для ципрофлоксацину інгібуюча дія становить 88,9 і 79,4 %, меропенему – 77,0 і 91,0 %, гентаміцину – 85,8 і 79,8 % і цефтазидиму – 82,2 і 91,7 % (0,5 МІК і 5,0 МІК відповідно).

У дослідженні дії похідних амінопропанолу на 1-добові біоплівки встановлено, що ці сполуки проявляють менш виражену активність порівняно з їхнім впливом на плівкоутворення (рис. 2). Антибіоплівкова активність сполук за 0,5 МІК складає: KBM-97 – 34,9 %, KBM-262 – 19,2 %, KBM-204 – 18,1 %, KBM-194 – 16,6 %, KBM-261 – 2,7 % інгібування порівняно з інтактною

культурою. У разі збільшення концентрації сполук до 5,0 МІК активність сполук підвищується й складає: KBM-97 – 76,6 %, KBM-204 – 75,6 %, KBM-262 – 64,5 %, KBM-194 – 46,7 %, KBM-261 – 37,1 %. Слід зазначити, що сполуки KBM-97, KBM-204 і KBM-262 у концентрації 5,0 МІК за активністю відносно сформованої 1-добової біоплівки *E. coli* вірогідно переважають гентаміцин та цефтазидим і не поступаються ципрофлоксацину та меропенему.

У разі оцінки антибіоплівкової дії препаратів порівняння встановлено (рис. 2), що всі антимікробні засоби виявляють антибіоплівкову дію відносно 1-добової біоплівки кишкової палички, інгібуюча активність у межах 17,2–64,9 % залежно від препарату та концентрації. Так, найвиразніший

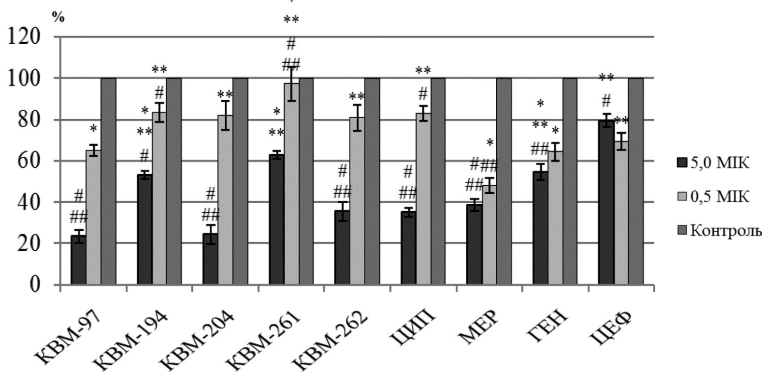


Рис. 2. Вплив похідних амінопропанолу на 1-добову біоплівку *E. coli*, % утвореної біоплівки відносно контролю

ефект спостерігали в ципрофлоксацину та меропенему, у разі 5,0 МІК ступінь руйнування біоплівки складає 64,9 і 61,3 % відповідно, у разі 0,5 МІК – 17,2 і 51,9 % відповідно. Інгібуючий вплив гентаміцину та цефтазидиму в концентрації 5,0 МІК становить 45,4 і 20,5 %; 0,5 МІК – 35,6 і 30,6 % відповідно (порівняно з контролем).

У подальших дослідженнях було оцінено активність похідних амінопропанолу відносно 5-добової біоплівки *E. coli* 311. Отримані результати наведено на рисунку 3.

Результати дослідження (рис. 3) свідчать, що похідні амінопропанолу здатні руйнувати 5-добову біоплівку *E. coli* 311. Пригнічення біоплівки в концентрації 5,0 МІК найвираженіше в КВМ-194, КВМ-97, КВМ-262 і складає 79,8 %, 56,8 %, 63,2 % відповідно, сполуки вірогідно переважають меропенем та не поступаються цефтазидиму ($p < 0,05$). Сполуки КВМ-204 і КВМ-261 у цій концентрації зруйнували біоплівку на 42,2 і 55,0 %. Антибіоплівкова дія похідних амінопропанолу в разі концентрації 0,5 МІК – у межах 30,1–59,6 % залежно від сполуки.

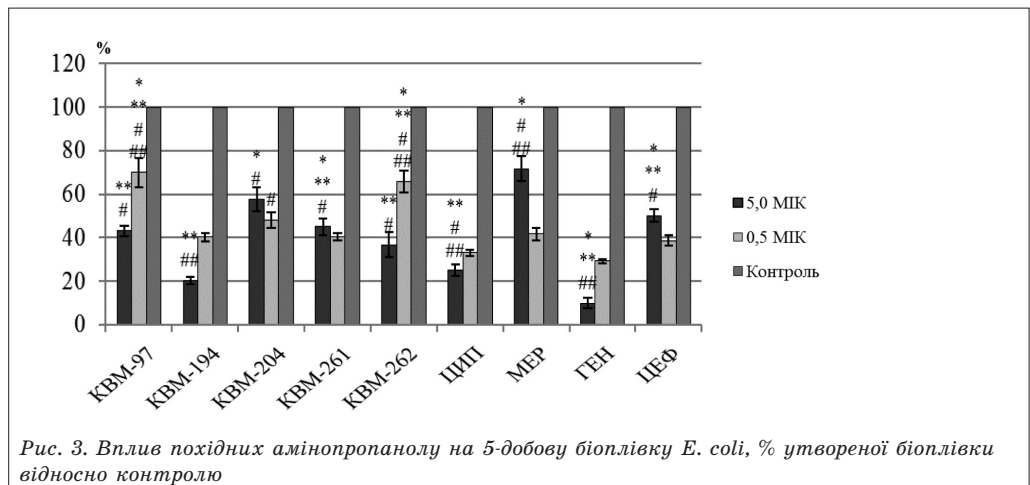
Препарати порівняння в концентрації 0,5 МІК проявили досить виразну інгібуючу дію щодо сформованих біоплівок: ципрофлоксацин – 66,9 %, меропенем – 58,3 %, гентаміцин – 70,7 %, цефтазидим – 61,3 %. У разі збільшення концентрації до 5,0 МІК ступінь руйнування біоплівки зростає в ципрофлоксацину до 75,0 %, у гентаміцину –

до 90,2 %. У меропенему та цефтазидиму інгібуюча дія зменшилася до 28,3 і 49,9 % відповідно.

Отже, уперше синтезовані похідні амінопропанолу з адамантильним і N-алкіларильним радикалом дозозалежно впливають на ріст і розмноження кишкової палички. Дослідження впливу на біоплівки *E. coli* показало, що сполуки здатні впливати на процес плівкоутворення та руйнувати сформовану біоплівку. Найвиразнішу дію відносно біоплівок кишкової палички на всіх досліджених етапах розвитку виявляють сполуки КВМ-97 і КВМ-262, які за ступенем інгібуючого ефекту проявляють переваги або не поступаються препаратам порівняння ципрофлоксацину, меропенему, цефтазидиму та гентаміцину.

Висновки

1. Похідні амінопропанолу з адамантильним і N-алкіларильним радикалом впливають на біоплівки *E. coli* на етапі їхнього формування. Серед них сполуки КВМ-97, КВМ-262 і КВМ-261 найвиразніше перешкоджають процесу плівкоутворення в концентрації 5,0 МІК порівняно з офіційними препаратами.
2. За умови наявності похідних амінопропанолу в інкубаційному середовищі спостерігається дозозалежний вплив на 1-добову біоплівку *E. coli*, найбільшу інгібуючу дію в концентрації 5,0 МІК проявляють сполуки КВМ-97, КВМ-262 і КВМ-204.



3. Сформована 5-добова біоплівка кишкової палички є чутливою до дії досліджених сполук та препаратів порівняння. Найактивнішими виявились сполуки КВМ-97, КВМ-262 і КВМ-194 у концентрації 5,0 МК.
4. Уперше синтезовані похідні амінопропанолу з адамантильним та N-алкіларильним радикалом можуть бути перспективними для створення на їхній основі лікарських засобів з антибіоплівковою активністю.

1. Мізюк Р. М. Дослідження протимікробної активності культивованих і дикоростучих лікарських рослин Галичини відносно основних збудників гнійно-септичних інфекцій / Р. М. Мізюк. – 2016.
2. Donlan R. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / R. M. Donlan, J. W. Costerton // *Clinical Microbiology*. – 2002. – V. 15, № 2. – P. 167–193.
3. Дослідження впливу похідних арилаліфатичних аміноспиртів на адгезивні властивості *E. coli* / С. В. Гриневич, В. В. Недашківська, А. А. Дуплій [та ін.]. // III Міжнародна науково-практична конференція «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології». – 2015.
4. Суворова З. С. Антимікробная активность производных арилаліфатических аміноспиртов в отношении биопленок *S. 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.
5. Патент на винахід № 89570. 1-[4-(1-Адамантил)-фенокси]-3-(N-бензил, N-диметиламіно)-2-пропанол хлорид / Короткий Ю. В., Максимов Ю. М., Вринчану Н. О. та ін. – Заявл. 17.04.08; Опубл. 10.02.10, Бюл. № 3.
6. Патент на винахід № 109202. 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-3-(N-бензилгексаметиленіміній)-2-пропанол хлорид / Короткий Ю. В., Вринчану Н. О., Дронова М. Л., Смертенко О. А. – Заявл. 20.12.2013; Опубл. 27.07.2015; Бюл. № 14.
7. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам [Методические указания МУК 4.2.18-90-04] // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2004. – Т. 6, № 4. – С. 306–359.
8. O'Toole G. A. Microtiter dish biofilm formation assay / G. A. O'Toole // *J. Vis. Exp.* – 2011. – № 47. – pii: 2437.

Д. М. Дудікова, Н. О. Вринчану, Ю. В. Короткий, М. Л. Дронова, З. С. Суворова, А. О. Шарова, Н. І. Гринчук, В. В. Недашківська
Антибактеріальна активність амінопропанолів з адамантильним і N-алкіларильним радикалом відносно біоплівок *E. coli*

Утворення біоплівок мікроорганізмами створює великі труднощі в клінічній практиці, оскільки при цьому значно підвищується стійкість бактерій до антибактеріальних і дезінфікуючих засобів, збільшуються витрати на лікування пацієнта, зростає летальність від інфекційних ускладнень. Тому перспективним є пошук нових сполук, здатних впливати на зрілу біоплівку та на різні етапи її формування.

Мета дослідження – встановити вплив нових похідних амінопропанолів на плівкоутворення та сформовані *E. coli* біоплівки порівнянно з антибактеріальними препаратами.

Чутливість клінічного штаму *E. coli* до дії сполук КВМ-97, КВМ-194, КВМ-204, КВМ-261, КВМ-262 і препаратів порівняння ципрофлоксацину, меропенему, гентаміцину та цефтазидиму визначали методом серійних мікророзведень і оцінювали за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МК). Здатність досліджуваних сполук та антимікробних засобів впливати на плівкоутворення та сформовані біоплівки кишкової палички досліджували методом сорбції генціанвіолету на структурах біоплівки з подальшою десорбцією в органічний розчинник.

Дослідження впливу амінопропанолів з адамантильним та N-алкіларильним радикалом на біоплівки *E. coli* показало, що сполуки порушують плівкоутворення та руйнують сформовані біоплівки. Найвиразнішу дію відносно біоплівок кишкової палички на всіх досліджених етапах розвитку виявляють сполуки КВМ-97 і КВМ-262, які за ступенем інгібуючого ефекту проявляють переваги або не поступають препаратам порівняння ципрофлоксацину, меропенему, цефтазидиму та гентаміцину.

Отже, уперше синтезовані похідні амінопропанолу з адамантильним та N-алкіларильним радикалом можуть бути перспективними для створення на їхній основі лікарських засобів з антибіоплівковою активністю.

Ключові слова: біоплівки, мікроорганізми, *E. coli*, похідні амінопропанолу, антибактеріальні засоби

Д. М. Дудікова, Н. А. Вринчану, Ю. В. Короткий, М. Л. Дронова, З. С. Суворова, А. А. Шарова, Н. І. Гринчук, В. В. Недашківська
Антибактериальная активность аминопропанолов с адамантильным и N-алкиларильным радикалом относительно биопленок *E. coli*

Образование биопленок микроорганизмами создает большие трудности в клинической практике, так как при этом значительно повышается устойчивость бактерий к антибактериальным и дезинфицирующим средствам, увеличиваются расходы на лечение пациента, возрастает летальность от

инфекционных осложнений. Поэтому перспективным является поиск новых соединений, способных влиять на зрелую биопленку и различные этапы ее формирования.

Цель исследования – установить влияние новых производных аминoproпанола на пленкообразование и сформированные *E. coli* биопленки по сравнению с антибактериальными препаратами.

Чувствительность клинического штамма *E. coli* к действию соединений КВМ-97, КВМ-194, КВМ-204, КВМ-261, КВМ-262 и препаратов сравнения ципрофлоксацина, меропенема, гентамицина и цефтазида определяли методом серийных микроразведений и оценивали по показателю минимальной ингибирующей концентрации (МИК). Способность исследуемых соединений и антибиотиков влиять на пленкообразование и сформированные биопленки кишечной палочки исследовали методом сорбции геотриана на структурах биопленки с дальнейшей десорбцией в органический растворитель.

Исследования влияния аминoproпанола с адамантильным и N-алкиларильным радикалом на биопленки *E. coli* показало, что соединения нарушают пленкообразование и разрушают сформированные биопленки. Наиболее выраженное действие в отношении биопленок кишечной палочки на всех исследованных этапах развития выявлено у соединений КВМ-97 и КВМ-262, которые по степени ингибирующего эффекта превосходят или не уступают препаратам сравнения ципрофлоксацину, меропенему, цефтазидиму и гентамицину.

Таким образом, впервые синтезированные производные аминoproпанола с адамантильным и N-алкиларильным радикалом могут быть перспективными для создания на их основе лекарственных средств с антибиопленочной активностью.

Ключевые слова: биопленки, микроорганизмы, *E. coli*, производные аминoproпанола, антибактериальные средства

D. M. Dudikova, N. O. Vrychanu, Yu. V. Korotkiy, M. L. Dronova, Z. S. Suvorova, A. O. Sharova, N. I. Hrynychuk, V. V. Nedashkivska

Antibacterial activity of aminopropanol derivatives with adamantyl and N-alkyl aryl radicals against *E. coli* biofilms

Biofilm formation is considered as a serious clinical problem due to its resistance to antibacterials and disinfectants, high treatment costs and the increase of the lethal complications rate. Therefore, there is a constant demand for the new compounds possessing a distinct activity against biofilms on the different stages of its formation.

The aim of the study was to investigate the effect of novel aminopropanol derivatives on biofilm formation and preformed *E. coli* biofilms in comparison to antibacterial drugs.

Strain susceptibility to tested compounds KVM-97, KVM-194, KVM-204, KVM-261, KVM-262 and antibacterials (ciprofloxacin, meropenem, gentamicin, ceftazidime) was evaluated by microdilution method and assessed by minimum inhibitory concentration (MIC). Antibiofilm activity was determined by the crystal violet assay.

Our studies have shown that aminopropanols with adamantyl or N-alkyl aryl radical inhibit biofilm formation and disrupt preformed *E. coli* biofilms. KVM-97 and KVM-262 demonstrated the most pronounced effect against *E. coli* biofilms on the all studied stages of its development; compounds' activity was superior or comparable to referent antimicrobials ciprofloxacin, meropenem, ceftazidime and gentamycin.

The data obtained suggest the promises of novel aminopropanol derivatives with adamantyl or N-alkyl aryl radical for the development of new antibiofilm drugs.

Key words: biofilms, microorganisms, *E. coli*, aminopropanol derivatives, antibacterial drugs

Надійшла: 22 серпня 2017 р.

Контактна особа: Дронова Марія Леонідівна, кандидат фармацевтичних наук, молодший науковий співробітник, лабораторія фармакології протимікробних засобів відділу фармакології, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Е. Потье, м. Київ, 03057. Тел.: +38 0 44 456 83 32. Електронна пошта: ml.dronova@gmail.com