

УДК 579.61:615.33:547.057

Д.В. Ротар

Буковинський державний медичний
університет, м. Чернівці**ОПТИМІЗАЦІЯ СКРИНІНГУ
АНТИМІКРОБНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ
ВОДОНЕРОЗЧИННИХ СПОЛУК
ОРГАНІЧНОГО СИНТЕЗУ**

Ключові слова: антимікробна активність, водонерозчинні сполуки органічного синтезу.

Резюме. Розроблено методику дослідження антимікробної активності, що базується на використанні желатиново-гліцеринової основи, нових сполук органічного синтезу, які неможливо дослідити за допомогою класичних методів у зв'язку з їх поганою або повною нерозчинністю у воді, та відповідно відібрати серед них такі, які б володіли найкращими антимікробними властивостями. Оптимізовано скринінг антимікробних властивостей нових хімічних сполук, що дозволяє встановити дозозалежний характер їх дії.

Вступ

Згідно даних ВООЗ, швидке підвищення стійкості мікроорганізмів до антимікробних препаратів загрожує підірвати основи охорони здоров'я, що напрацьовані медичною наукою впродовж останніх 50 років. Виходи із ситуації, що склалася, на даний момент можуть бути наступні: знаходити методи контролю розповсюдження резистентності мікроорганізмів до препаратів, що вже існують і використовуються, або інтенсифікувати розробку і впровадження нових антимікробних препаратів. Перший варіант є набагато складнішим, але за сучасних умов призначення/самопризначення, безрецептурного відпуску та нераціонального використання антимікробних препаратів у вітчизняній системі охорони здоров'я є поки що важко досяжним. Проте другий шлях виходу із ситуації хоча й є довготривалим і економічно більш дорогим, оскільки з моменту розробки нової молекули антимікробної речовини до виходу на ринок готового препарату можуть пройти роки, а іноді і десятиліття, однак більш перспективним у боротьбі з резистентними штамми мікроорганізмів, та дає можливість практичній медицині створити резерв ефективних антимікробних ліків [1].

Мета дослідження

Розробити методику випробування антимікробної активності нових сполук органічного синтезу, які неможливо дослідити за допомогою класичних методів у зв'язку з їх поганою або повною нерозчинністю у воді, та таким чином здійснити якісний відбір сполук з найкращими антимікробними властивостями.

Матеріали та методи

Для дослідження антимікробних властивостей використано 16 нових хімічних речовин (піра-

золвісних сполук з сечовинним фрагментом у положенні 3 піразольного циклу), які синтезовано на кафедрі медичної та фармацевтичної хімії Буковинського державного медичного університету. Всі вони погано або повністю нерозчинні у воді.

Дослідження проведено за класичним методом двократних серійних розведень та за модифікованою методикою з використанням желатиново-гліцеринової основи.

Як об'єкти для вивчення антимікробної активності досліджуваних сполук використано наступні тест - культури мікроорганізмів: *S.aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 8236F800, *C. albicans* ATCC 885-653.

Згідно даних Державної Фармакопеї України, яка рекомендує для дослідження водонерозчинних препаратів приготування суспензій із завішуванням нерозчинних часточок у відповідній основі (поліетиленгліколь та ін.), ми як розчинник для нових органічних сполук (за умови, якщо речовина розчиниться) використали желатиново-гліцеринову основу. Однак, якщо досліджувана речовина не розчинялась у даній основі, то часточки речовини просто зависали у ній, формуючи суспензію. Суспензію готували шляхом поступового додавання до розважених у стерильні флакони по 1 мг нерозчинних хімічних сполук 9,9 мл желатиново-гліцеринової основи, отримуючи розведення речовин 100 мкг/мл.

Паралельно проводився контроль стерильності речовин із метою встановлення забрудненості суспензії. Для висіву аеробних мікроорганізмів використовували м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), для анаеробних - тіогліколеве середовище. Посіви аеробів інкубували 24 год при t 37°C, анаеробів - 72 год при t 37°C в анаеробних умовах.

Далі проводили посів 24 годинних бульйонних тест - культур *S.aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 8236F800, відповідно

стандарту мутності 105 бактеріальних клітин на 1 мл, *S. albicans* ATCC 885-653 - 102 клітин дріжджоподібного гриба на 1 мл газомом (як для методу стандартних дисків).

На окремі сектори чашки за допомогою стандартної піпетки (1 мл) наносились краплею досліджувані сполуки у вигляді суспензії на желатиново-гліцериновій основі (суспензію попередньо підігрівали до 40°C). Коли крапля на поверхні агару застигала, чашки поміщались у термостат для інкубації: *S.aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 8236F800 - 24 год при t 37°C, *S. albicans* ATCC 885-653 - 48 год при t 28°C.

Облік результатів дослідження проводили згідно розмірів (мм) зон затримки росту чи їх відсутності. Дослідження проводили тричі з метою

отримання достовірних результатів.

Обговорення результатів дослідження

У результаті проведеного дослідження анти-мікробної активності нових сполук органічного синтезу, встановлено залежність між розчинністю досліджуваних сполук та антимікробним ефектом (навіть якщо вдавалося розчинити водонерозчинні речовини, вони все одно в ході дослідження осідали при взаємодії з МПБ, який був приготовлений на водній основі).

Результати досліджень методом двократних серійних досліджень нових піразолвмісних сполук зі сечовинним фрагментом у положенні 3 піразольного циклу наведено у табл. 1.

Як видно з таблиці 1, жодна з досліджуваних сполук не виявляла виражених антимікробних

Таблиця 1

Результати дослідження антимікробної активності водонерозчинних нових органічних сполук методом двократних серійних розведень (1000 мкг/мл)

№ п/п	Досліджувані сполуки	Тест – мікроорганізм							
		<i>S.aureus</i> ATCC 25923		<i>E.coli</i> ATCC 25922		<i>B. subtilis</i> ATCC 8236F800		<i>C. albicans</i> ATCC 885-653	
		МБсК	МБцК	МБсК	МБцК	МБсК	МБцК	МФсК	МФцК
1.	M1	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
2.	M2	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
3.	M3	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
4.	M4	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
5.	M5	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
6.	M6	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
7.	M7	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
8.	M8	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
9.	M9	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
10.	M10	500	500	500	250	250	500	500	500
11.	M11	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
12.	M12	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
13.	M13	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
14.	M14	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
15.	M15	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
16.	M16	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Примітки:

«МБсК» – мінімальна бактерістатична (інгібуюча) концентрація

«МБцК» – мінімальна бактеріцидна концентрація

«МФсК» - мінімальна фунгістатична (інгібуюча) концентрація

«МФцК» - мінімальна фунгіцидна концентрація

властивостей, тому що більшість з них випадали в осад при взаємодії з МПБ.

Тому, проаналізувавши фармакопейні методи дослідження нерозчинних лікарських форм, які передбачають визначення мікробного забруднення нерозчинних лікарських форм шляхом приготування суспензій із завішуванням нерозчинних часточок у відповідній основі, ми прийшли до висновку, що модифікація їх для нашої роботи може оптимізувати дослідження та покращати

скринінг антимікробних властивостей нових органічних сполук. З метою здешевлення методу дослідження ми вирішили використати не поліетиленгліколь, а желатиново-гліцеринову основу для завішування в ній нерозчинних часточок досліджуваних речовин. Контроль стерильності суспензії із досліджуваних органічних сполук на желатиново-гліцериновій основі не встановив забрудненості ні аеробними, ні анаеробними мікроорганізмами.

У табл. 2 представлені результати дослідження за модифікованою методикою, і, як видно, з даних, спектр антимікробних властивостей досліджуваних речовин значно ширший ніж про-

демонстрований у табл. 1.

Найкращий результат спостерігався відносно дріжджеподібних грибів роду *Candida*. Так, сполука М 10 призводила до затримки росту

Таблиця 2

Результати дослідження антимікробної активності водонерозчинних нових органічних сполук за модифікованою методикою

№ п/п	Досліджувані сполуки (1 крапля-12,5мкг)	Діаметр зони затримки росту тест – мікроорганізму (мм)			
		<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>B. subtilis</i> ATCC 8236F800	<i>C. albicans</i> ATCC 885-653
1.	M1	<1	<1	-	<1
2.	M2	<1	<1	-	<5
3.	M3	<1	<1	-	<5
4.	M4	<1	<1	-	<5
5.	M5	<1	<1	-	<5
6.	M6	<1	<1	-	<5
7.	M7	<1	<1	-	5
8.	M8	<1	<1	-	<5
9.	M9	<1	<1	-	<5
10.	M10	<5	<5	-	6,5
11.	M11	<1	<1	-	<5
12.	M12	<1	<1	-	<5
13.	M13	<1	<1	-	<5
14.	M14	<1	<1	-	<5
15.	M15	<1	<1	-	5
16.	M16	<1	<1	-	5

Примітка: «-» - зон затримки росту не виявлено

грибів із зоною діаметром 6,5 мм, речовини М 7, 15-16 - 5 мм, М 2-6, 8-9, 11-14 - < 5мм. Тільки речовина М 1 призводила до затримки росту зони менше 1 мм.

Щодо *S.aureus* ATCC 25923, *E.coli* ATCC 25922, то всі досліджувані речовини призводили до затримки росту тест-мікроорганізмів з зоною діаметром менше 1 мм, винятком була сполука М 10, яка провокувала затримку зони росту діаметром більше 5мм.

І тільки *B. subtilis* ATCC 8236F800 виявилась стійкою до всіх 16 нових сполук, жодна з яких не викликала затримки росту даного мікроорганізму.

Проаналізувавши отримані результати ми вирішили піддати більш детальному скринінгу сполуку М 10, яка виявила непогані показники антигрибкової активності в об'ємі однієї краплі (12,5 мкг). Тому наступні випробування були нап-

равлені на встановлення залежності між об'ємом досліджуваної сполуки та розміром зон затримки росту *C. albicans* ATCC 885-653.

Проведені дослідження засвідчили фунгіцидні властивості сполуки М 10, та виявили чітку залежність між дозою нової сполуки та її активністю. Так, 0,1 мл (10 мкг) сполуки М 10 затримував ріст *C. albicans* ATCC 885-653 у зоні діаметром 7 мм, 0,2 мл (20 мкг) - 7,5 мм, 0,3 мл (30 мкг) - 8 мм, 0,4 мл (40 мкг) - 11 мм, 0,5 мл (50 мкг) - 21 мм (табл. 3).

Такі результати можна порівняти з подібними в методі стандартних дисків (використовують диски з навантаженням антибіотика від 5 до 25 мкг/диск), так як мікроорганізм, який під впливом антибіотика формує зони затримки росту діаметром у інтервалі від 5 мм до 10мм є

Таблиця 3

Результати дослідження антигрибкової активності різних доз сполуки М 10

№ п/п	Об'єм досліджуваної суспензії (мл)	Маса досліджуваної сполуки (мкг)	Діаметр зони затримки росту тест – мікроорганізму <i>C. albicans</i> ATCC 885-653 (мм)
1.	0,1	10	7
2.	0,2	20	7,5
3.	0,3	30	8
4.	0,4	40	11
5.	0,5	50	21

малочутливим, від 10 мм до 15 мм - чутливим, від 15 мм до 20 мм - високочутливим, та більше 20 мм - надчутливим до даного антимікробного препарату. А сполука М 10 у дозі 50 мкг спровокувала затримку росту *S. albicans* ATCC 885-653 у зоні розміром 21 мм, що робить її перспективною для подальших більш глибоких досліджень, у першу чергу, стосовно протигрибкової активності.

Висновки

1. Модифікована методика дослідження антимікробної активності водонерозчинних нових органічних сполук, що базується на використанні желатиново-гліцеринової основи виявилася достатньо ефективною. Вона дозволила виявити анти-грибкові властивості нової органічної сполуки (М 10), що належить до піразольмісних сполук з сечовинним фрагментом у положенні 3 піразольного циклу, які не можна виявити відомими класичними методами досліджень.

2. Оптимізація скринінгу антимікробних властивостей нових хімічних сполук дозволяє не лише виявити перспективні в антимікробному відношенні хімічні сполуки, але й встановити дозозалежний характер їх антимікробної дії.

Перспективи подальших досліджень

Впровадження модифікованої методики, яка базується на використанні желатиново-гліцеринової основи, у скринінг антимікробних властивостей органічних сполук.

Література. 1. Актуальні питання створення нових лікарських засобів: матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів та молодих вчених, 21-22 квітня 2010 р., Харків / Національний фармацевтичний університет; редкол. В. П. Черних, С. М. Коваленко, Н. А. Цубанова. - Харків: НФаУ, 2010. - 522 с. 2. Вовк М.В. 4-Функціональні піразоли / М.В. Вовк, М.К. Братенко, В.О. Черноус. - Чернівці: Прут, 2008. - С. 5-23. 3. Державна Фармакопея України: / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". - 1-е вид. - Харків : РІРЕГ, 2001. - 556 с. 4. Державна Фармакопея України. Доповнення 1 / Державне підприємство "Науково-

експертний фармакопейний центр". - Харків: РІРЕГ, 2004. - 494 с. 5. Державна Фармакопея України. Доповнення 2 / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". - Харків, 2008. - 617 с. 6. Державна Фармакопея України. Доповнення 3 / Державне підприємство "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів". - Харків, 2009. - 279 с. 7. Державна Фармакопея України. Доповнення 4 / Державне підприємство "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів". - Харків, 2011. - 540 с.

ОПТИМИЗАЦИЯ СКРИНИНГА АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ ВОДОНЕРАСТВОРИМЫХ СОЕДИНЕНИЙ ОРГАНИЧЕСКОГО СИНТЕЗА

Д.В. Ротарь

Резюме. Разработана методика исследования антимикробной активности, которая базируется на использовании желатиново-глицериновой основы, новых соединений органического синтеза, которые невозможно исследовать с помощью классических методов в связи с их плохой или полной нерастворимостью в воде, и соответственно отобрать среди них такие, которые бы обладали лучшими антимикробными свойствами. Оптимизирован скрининг антимикробных свойств новых химических соединений, что позволяет установить дозозависимый характер их действия.

Ключевые слова: антимикробная активность, водонерастворимые соединения органического синтеза.

SCREENING OPTIMIZATION OF ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF THE WATER-INSOLUBLE ORGANIC SYNTHESIS COMPOUNDS

D. V. Rotar

Abstract. Method of investigation of antimicrobial activity based on the use of gelatin-glycerin base, organic synthesis of new compounds that can not be investigated using classical methods due to their poor or complete insolubility in water and relatively to select among them those which have the best antimicrobial properties has been developed. Screening of antimicrobial properties of new chemical compounds that enables to determine the dose-dependent nature of their actions has been optimized.

Key words: antimicrobial activity, water-insoluble compounds of organic synthesis.

Bukovyna State Medical University, (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2014. - Vol.14, №2 (48). - P.120-123.

Надійшла до редакції 15.05.2014

Рецензент – доц. О.В. Геруш

© Д.В.Ротарь, 2014