

Д. М. ДУДІКОВА, З. С. СУВороВА, В. В. НЕДАШКІВСЬКА, А. О. ШАРОВА,
М. Л. ДРОНОВА, канд. фарм. наук, Н. О. ВРИНЧАНУ, д-р мед. наук
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ

АКТИВНІСТЬ ПОХІДНИХ АМІНОПРОПАНОЛУ ВІДНОСНО БІОПЛІВОК *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Ключові слова: спільноти мікробних клітин, мікроорганізми, *Pseudomonas aeruginosa*, похідні амінопропанолу, антибактеріальні засоби

D. M. DUDIKOVA, Z. S. SUVOROVA, V. V. NEDASHKIVSKA, A. O. SHAROVA,
M. L. DRONOVA, N. O. VRYNCHANU

SI «Institute of pharmacology and toxicology of NAMS of Ukraine», Kyiv

ANTIBIOFILM ACTIVITY OF AMINOPROPANOL DERIVATIVES AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Key words: microbial cells communities, microorganisms, *Pseudomonas aeruginosa*, aminopropanol derivatives, antibacterial agents

Госпітальна інфекція, не дивлячись на наявність значної кількості антимікробних препаратів, залишається серйозною медичною та економічною проблемою, ускладнює перебіг післяопераційних та опікових ран, збільшує тривалість стаціонарного лікування, сприяє зростанню частоти летальних випадків.

В етіології госпітальних інфекцій провідна роль належить мікроорганізмам, об'єднаним у групу з акронімом ESKAPE [1], зокрема *Pseudomonas aeruginosa*. Синьогнійна паличка зумовлює як гострі, так і хронічні гнійно-запальні процеси. Одним із механізмів реалізації хронічного інфекційного процесу є існування бактерій в організмі у вигляді специфічно організованих та прикріплених до субстрату спільнот – біоплівки [2].

Біоплівки є основною стратегією виживання мікроорганізмів в екологічних нішах. Знаходячись у прикріпленому стані в складі біоплівки, бактерії захищені від факторів імунного захисту макроорганізму, впливу пошкоджуючих факторів навколишнього середовища та антимікробних речовин. Здатність *P. aeruginosa* до плівкоутворення є одним із вирішальних факторів у передачі внутрішньолікарняних інфекцій, оскільки синьогнійна паличка у формі біоплівки виявляє надзвичайну стійкість до дії сучасних антибактеріальних препаратів. Бактерії у біоплівках виживають у присутності антибіотиків, концентрації яких у 100–1 000 разів перевищують мінімальні інгібуючі, що призводить до появи стійких штамів мікроорганізмів, неповної ерадикації збудників, їх персистенції та хронізації запальних процесів [3].

Таким чином, збільшення кількості резистентних штамів мікроорганізмів, утворення ними біоплівки, а також відсутність ефективних та безпечних антибіоплівкових препаратів свідчать про актуальність проблеми. Одним із шляхів її вирішення є застосування лікарських засобів, здатних впливати на різні етапи розвитку біоплівки та руйнувати вже сформовану біоплівку.

В теперішній час здійснюється активний пошук таких засобів серед різних фармакологічних груп: блокаторів ефлюкських pomp, муколітиків, ферментних препаратів, перспективними є комбінації антибіотиків (наприклад, бета-лактамів з глікопептидами/ліпопептидами) [4], комбінацій антибіотиків із неантимікробними препаратами та ін. Серед монопрепаратів антибіоплівкова дія виявлена у фосфоміцину, рифампіцину [5], мупіроцину, N-ацетилцистеїну [6], бактеріоцинів [7], скіламіцинів [8], нітроксидів [9], фуранонів [10] та ін.

На увагу заслуговують також нові похідні амінопропанолу, які в експериментах *in vitro* виявили виразні антимікробні властивості відносно планктонних та біоплівкових штамів мікроорганізмів.

Мета роботи – встановити вплив аміноспиртів з адамантильним та N-алкіларильним радикалом на біоплівки *P. aeruginosa*.

Матеріали та методи дослідження

В експериментах використано сполуки з адамантильним (КВМ-97) та N-алкіларильним (КВМ-194, КВМ-204, КВМ-261, КВМ-262) радикалом, синтезовані в Інституті органічної хімії канд. фарм. наук Ю. В. Коротким [11, 12].

Препаратами порівняння слугували: ципрофлоксацин (Ципринол, розчин для інфузій, KRKA, Словенія), меропенем (Меронем, порошок для розчину для ін'єкцій, Астра Зенека ЮК Лімітед, Великобританія), гентаміцин (гентаміцин, субстанція, отримано від ЗАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», Україна), цефтазидим (Цефтум®, порошок для розчину для ін'єкцій, ВАТ «Київмедпрепарат», Україна).

Експерименти здійснено з використанням клінічного штаму *P. aeruginosa* 449, виділеного від хворого гнійно-запальним процесом. Культура виявила чутливість до дії азтреонаму, цефоперазону, ципрофлоксацину, амікацину, гентаміцину, резистентність – до цефепіму, тетрацикліну, була помірно чутливою до дії цефтриаксону, цефотаксиму, меропенему.

Чутливість *P. aeruginosa* 449 до дії похідних амінопропанолу визначали методом серійних мікророзведень і оцінювали за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) згідно з загальноприйнятою методикою [13].

Здатність сполук впливати на плівкоутворення та на сформовані біоплівки *P. aeruginosa* досліджували згідно з методом сорбції генціанвіолету на структурах біоплівки, з подальшою їх десорбцією в органічний розчинник [14]. Для вивчення впливу сполук на плівкоутворення внесення розчинів досліджуваних речовин та культури робили одночасно, у разі дії на сформовані біоплівки - на 1-у та 5-у добу після інокуляції. Концентрації сполук становили 5,0 та 0,5 МІК. Дослідження виконували з використанням нічної культури, розведеної у 100 разів, яку вирощували на рідкому живильному середовищі № 8. Термін інкубації з розчинами сполук та препаратів - 24 год за 37 °С. Вміст планшетів видаляли, промивали лунки, вносили 0,1%-й розчин генціанвіолету та витримували 15 хв. Для виявлення біоплівки барвник екстрагували етанолом. Вимірювання оптичної щільності здійснювали на Adsorbance Microplate Reader ELx800 (BioTek, США) за довжини хвилі 630 нм. Контролем слугували інтактні культури мікроорганізмів, вирощені за тих самих умов.

Відсоток сформованої біоплівки обчислювали за формулою:

$$[(OD_{бп} - OD_c) / (OD_p - OD_{пс})],$$

де $OD_{бп}$ – оптична щільність розчинів, екстрагованих із біоплівок, оброблених сполуками;

OD_c – оптична щільність середовища з відповідними розчинами сполук;

OD_p – оптична щільність контролю культури;

$OD_{пс}$ – оптична щільність живильного середовища.

Усі дослідження виконано у трьох повторях, дані наведено як $M \pm m$, де M – середнє значення, m – стандартна помилка середнього. Статистичне оброблення результатів здійснено з використанням критеріїв Краскела-Уолеса та Ньюмена-Кейлса ($p < 0,05$) за допомогою «StatSoft Statistica 6.0».

Результати дослідження та обговорення

Встановлено, що МІК похідних амінопропанолу відносно планктонних клітин *P. aeruginosa* 449 становить: КВМ-97 – 50,0 мкг/мл, КВМ-194 – 100,0 мкг/мл, КВМ-204 – 50,0 мкг/мл, КВМ-261 – 25,0 мкг/мл, КВМ-262 – 25,0 мкг/мл. МІК відносно препаратів порівняння становить: меропенем – 6,3 мкг/мл, ципрофлоксацин – 0,25 мкг/мл, гентаміцин – 0,39 мкг/мл, цефтазидим – 1,56 мкг/мл.

Дослідження показали, що вперше синтезовані сполуки порушують процес плівкоутворення *P. aeruginosa* (рис., А).

Встановлено, що за дії сполук у концентрації 0,5 МІК порушення процесу плівкоутворення синьогійної палички більшою мірою спостерігається за умови присутності в інкубаційному середовищі КВМ-97, КВМ-261 та КВМ-262 (пригнічення на 31,8%, 57,8% та 32,7% відповідно). Збільшення концентрації сполук супроводжується зростанням інгібувального ефекту до 90,5% (КВМ-261), 84,3% (КВМ-97) та 83,3% (КВМ-262). Антибіоплівкова активність КВМ-204 за концентрації 0,5 МІК становить 13,9%, за 5,0 МІК – 75,6%. Експерименти не виявили порушення плівкоутворення за дії сполуки КВМ-194 у субінгібуючій концентрації, а в разі дії сполуки у концентрації 5,0 МІК пригнічувальний ефект становить 76,0% (порівняно з контролем).

Дослідженнями не встановлено виразного впливу на процес плівкоутворення синьогійної палички препаратів порівняння, окрім меропенему та ципрофлоксацину в концентрації 5,0 МІК, інгібування плівкоутворення становить 71,9% та 79,7% відповідно. Фторхінолоновий антибіотик ципрофлоксацин у субінгібуючій концентрації не порушував процес плівкоутворення *P. aeruginosa*. Інгібувальний ефект гентаміцину за концентрації 0,5 МІК та 5,0 МІК становить 29,1% та 16,2% відповідно. Препарат порівняння цефтазидим у концентрації 0,5 МІК пригнічує плівкоутворення на 19,1%, а за 5,0 МІК – на 63,8% порівняно з контролем.

Результати експериментів свідчать, що вперше синтезовані похідні амінопропанолу дозозалежно впливають на формування біоплівок *P. aeruginosa*, найбільш активною виявилася сполука КВМ-261. За ступенем інгібування плівкоутворення синьогійної палички сполуки КВМ-97, КВМ-261 та КВМ-262 виявляють перевагу перед препаратами порівняння (за концентрації 0,5 МІК), а сполуки КВМ-261 та КВМ-262 – і у разі концентрації 5,0 МІК.

Під час дослідження впливу похідних амінопропанолу на 1-добову біоплівку встановлено, що *P. aeruginosa* виявила чутливість до дії усіх досліджуваних сполук. Ступінь вираженості ефекту залежить від сполуки та її концентрації (рис., Б).

Експерименти показали, що досліджені похідні амінопропанолу виявили виразну антибіоплівкову активність (окрім КВМ-262). Ступінь руйнування біоплівки становить: у сполук КВМ-97 та КВМ-204 за концентрації 0,5 МІК – 63,9% та 55,8%, за 5,0 МІК – 60,8% та 76,6% відповідно; у сполук КВМ-194, КВМ-261, КВМ-262 – 56,7%, 56,8%, 15,2% за концентрації 0,5 МІК та 65,7%, 60,9%, 20,3% за 5,0 МІК відповідно.

Під час оцінювання антибіоплівкової дії препаратів порівняння встановлено, що найбільш виразний ефект відносно 1-добової біоплівки виявляє гентаміцин: 73,5% – за концентрації 0,5 МІК та 37,2% – за концентрації 5,0 МІК. Інгібувальний ефект ципрофлоксацину в концентрації 0,5 МІК становить 38,5%, за 5,0 МІК – 44,9% порівняно з контролем. Меропенем у концентрації 0,5 МІК руйнує сформовану біоплівку на 56,6%, за 5,0 МІК – на 47,5%. Цефтазидим в концентраціях 0,5 МІК не здійснює інгібувального ефекту, в концентрації 5,0 МІК інгібування становить 29,6%.

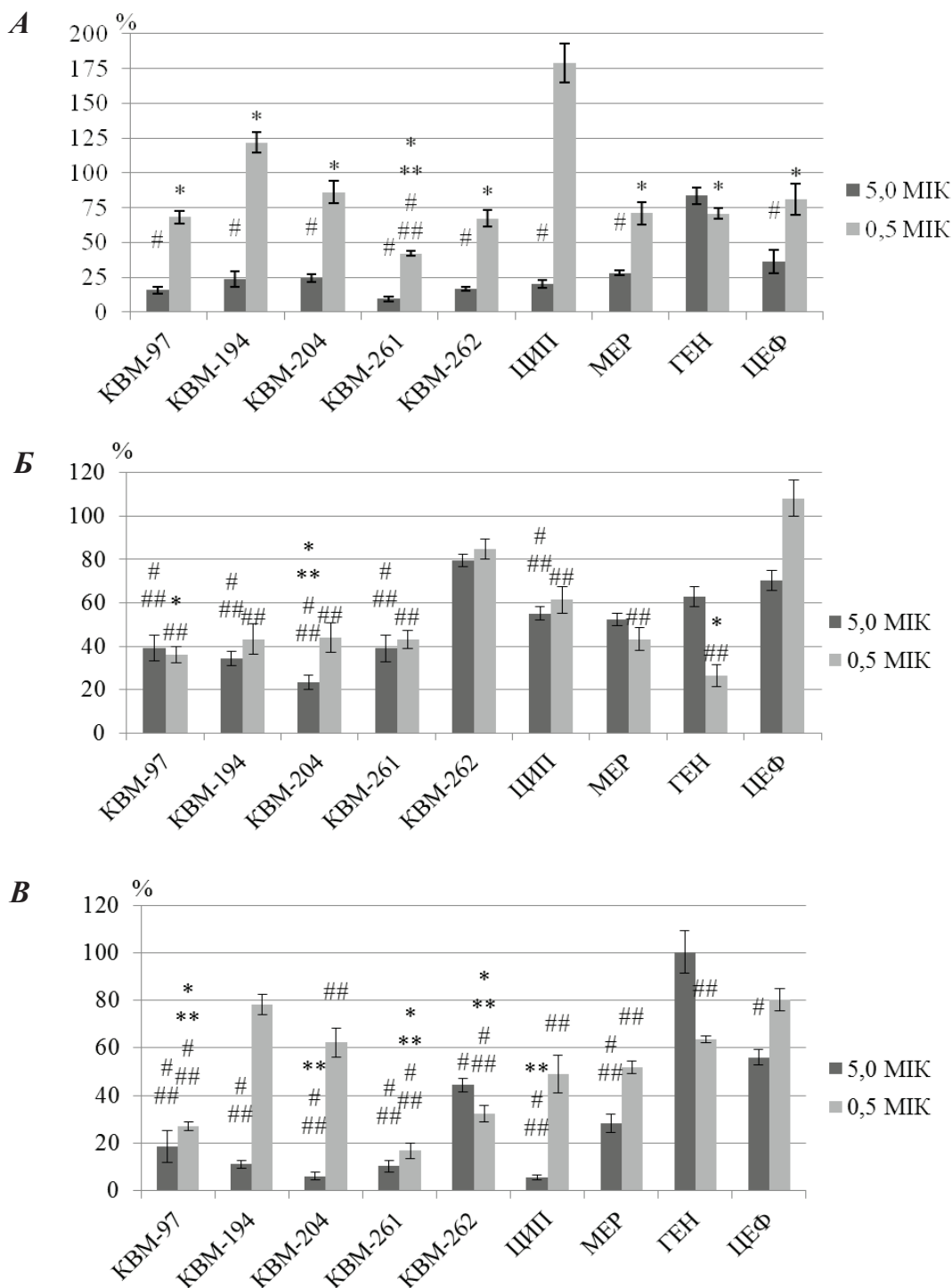


Рис. Вплив похідних амінопропанолу на плівкоутворення (А) та на сформовані 1-добову (Б) та 5-добову (В) біоплівки *P. aeruginosa* 449 (% утвореної біоплівки відносно контролю)

ЦІПІ – 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.

Оскільки зрілі біоплівки є практично нечутливими до дії антимікробних препаратів [3], у подальших дослідженнях було доцільно оцінити активність похідних амінопропанолу відносно 5-добової біоплівки, сформованої *P. aeruginosa*. Отримані результати наведено на рис., В.

Результати досліджень свідчать, що похідні амінопропанолу дозозалежно впливають на біоплівку *P. aeruginosa* 449. Так, за концентрації 5,0 МІК руйнування біоплівки найбільше виражено і становить 81,3% (КВМ-97), 88,9% (КВМ-194), 93,9% (КВМ-204), 89,7% (КВМ-261) та 55,6% (КВМ-262). Зі зменшенням концентрації сполук до субінгібуючих (0,5 МІК) їхня активність знижується і становить: 72,9% (КВМ-97), 21,8% (КВМ-194), 37,7% (КВМ-204), 83,3% (КВМ-261) та 67,5% (КВМ-262).

Препарат порівняння гентаміцин у концентрації 5,0 МІК інгібувальних властивостей відносно сформованої 5-добової біоплівки не виявив. У концентрації 0,5 МІК інгібування становить 36,2%. У ципрофлоксацину найбільш виразну дію спостерігали за концентрації 5,0 МІК – 94,4%, за 0,5 МІК інгібування менш виразне та становить 50,9% порівняно з контролем. Антибіоплівковий ефект препарату порівняння меропенему зареєстровано за концентрації 0,5 МІК та 5,0 МІК, інгібування становить 48,0% та 71,7% відповідно. Цефтазидим у концентрації 0,5 МІК руйнує сформовану 5-добову біоплівку на 19,7%, за 5,0 МІК – на 43,9% порівняно з контролем.

Таким чином, вперше синтезовані похідні амінопропанолу виявили виразну антибіоплівкову активність відносно *P. aeruginosa*, найбільш активно виявилася сполука КВМ-204. За ступенем інгібування плівкоутворення синьогнійної палички всі досліджувані сполуки (окрім КВМ-262) виявляють перевагу перед цефтазидимом, а за концентрації 5,0 МІК – і перед гентаміцином.

Отже, вперше синтезовані похідні амінопропанолу з адамантильним та N-алкіларильним радикалом дозозалежно впливають на ріст та розмноження синьогнійної палички. Дослідження впливу на біоплівки *P. aeruginosa* показало, що сполуки здатні впливати на процес формування біоплівки та руйнувати сформовану біоплівку. Найбільш виразно запобігає формуванню біоплівок синьогнійної палички сполука КВМ-261, руйнує сформовані біоплівки *P. aeruginosa* – КВМ-204. За ступенем вираженості інгібувального ефекту вперше синтезовані похідні амінопропанолу мають переваги перед препаратами порівняння ципрофлоксацином, меропенемом, цефтазидимом та гентаміцином.

Вперше синтезовані похідні амінопропанолу з адамантильним та N-алкіларильним радикалом можуть бути перспективними для створення лікарських засобів з антибіоплівковою активністю на їх основі.

Висновки

1. Похідні амінопропанолу з адамантильним та N-алкіларильним радикалом впливають на біоплівки *P. aeruginosa* на етапі їх формування. Серед них сполука КВМ-261 найбільш виразно перешкоджає процесу плівкоутворення вже у концентрації 0,5 МІК порівняно з ципрофлоксацином, меропенемом, гентаміцином та цефтазидимом.

2. За умови наявності похідних амінопропанолу в інкубаційному середовищі спостерігали дозозалежний вплив на 1-добову біоплівку *P. aeruginosa*, найбільш виразну інгібувальну дію виявляє сполука КВМ-204.

3. Сформована 5-добова біоплівка синьогнійної палички є чутливою до дії досліджених сполук, які переважають за дією препарати порівняння. Найбільш активно виявилася сполука КВМ-261.

Список використаної літератури

1. Pendleton J. N., Gorman S. P., Gilmore B. F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens // *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* – 2013. – N 11 (3). – P. 297–308.
2. Габриэлян Н. И., Горская Е. М., Романова Н. И., Цирульникова О. М. Госпитальная микрофлора и биопленки // *Вестн. трансплантологии и искусственных органов.* – 2012. – № 3. – С. 83–91.
3. Donlan R. M., Costerton J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // *Clin. Microbiol.* – 2002. – V. 15, N 2. – P. 167–193.
4. Barber K. E., Werth B. J., McRoberts J. P., Rybak M. J. A novel approach utilizing biofilm time-kill curves to assess the bactericidal activity of ceftaroline combinations against biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2014. – V. 58, N 5. – P. 2989–2992.
5. Mihailescu R. High activity of fosfomycin and rifampin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm *in vitro* and in an experimental foreign-body infection model // *Ibid.* – 2014. – V. 58, N 5. – P. 2547–2553.
6. Голуб А. В. Бактериальные биопленки – новая цель терапии? // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.* – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 23–29.
7. Okuda K. Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2013. – V. 57, N 11. – P. 5572–5579.
8. Navarro G. Image-based 384-well high-throughput screening method for the discovery of skyllamycins a to c as biofilm inhibitors and inducers of biofilm detachment in *Pseudomonas aeruginosa* // *Ibid.* – 2014. – V. 58, N 2. – P. 1092–1099.
9. De la Fuente-Nunez C. Effect of nitroxides on swarming motility and biofilm formation, multicellular behaviors in *Pseudomonas aeruginosa* // *Ibid.* – 2013. – V. 57, N 10. – P. 4877–4877.
10. Kuehl R. Furanone at subinhibitory concentrations enhances staphylococcal biofilm formation by luxS repression // *Ibid.* – 2009. – V. 53, N 10. – P. 4159–4166
11. Пат. 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.
12. Пат. 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.
13. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Метод. указания МУК 4.2.18-90-04 // *Клин. микроб. антимикроб. химиотер.* – 2004. – Т. 6, № 4. – С. 306–359.
14. O'Toole G. A. Microtiter dish biofilm formation assay // *J. Vis. Exp.* – 2011. – N 47. – P. 2437.

Надійшла до редакції 10 січня 2017 року.

Д. М. Дудикова, З. С. Суворова, В. В. Недашковская, А. А. Шарова, М. Л. Дронова, Н. А. Врынчану

ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», г. Киев

АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОПРОПАНОЛА ОТНОСИТЕЛЬНО БИОПЛЕНОК *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Ключевые слова: сообщества микробных клеток, микроорганизмы, *Pseudomonas aeruginosa*, производные аминoproпанола, антибактериальные средства

А Н Н О Т А Ц И Я

Бактериальные биопленки, в частности образованные *Pseudomonas aeruginosa*, являются причиной серьезных хронических инфекционных заболеваний. Бактерии в биопленке фенотипически более устойчивы к действию антибиотиков и иммунной системы макроорганизма, что делает их важным фактором патогенности для многих микроорганизмов.

Объектом исследования были выбраны производные аминспиртов с адамантильным (КВМ-97) та N-алкиларильным радикалом (КВМ-194, КВМ-204, КВМ-261, КВМ-262). Целью работы было установить влияние соединений на пленкообразование и сформированные биопленки *P. aeruginosa*. Влияние производных аминспиртов на биопленки оценивали с использованием генцианвиолета. В качестве препаратов сравнения использовали субстанции ципрофлоксацина, меропенема, цефтазидима и гентамицина.

Способность соединений влиять на пленкообразование и сформированные биопленки *P. aeruginosa* исследовали методом сорбции генцианвиолета на структурах биопленки с последующей десорбцией в органический растворитель.

Полученные результаты показали, что все соединения в исследованных концентрациях проявляют активность в отношении биопленок. Значительное уменьшение пленкообразования *P. aeruginosa* наблюдали в присутствии КВМ-97, КВМ-261 и КВМ-262 в высокой концентрации (5,0 МПК), ингибирование пленкообразования составило 84,3%, 90,5% и 83,3% соответственно.

После инкубирования с КВМ-204 в концентрации 5,0 МПК 1-суточная сформированная биопленка была разрушена на 76,6%. Кроме того, соединения КВМ-97, КВМ-194 и КВМ-261 в обеих концентрациях показали высокую активность относительно биопленки синегнойной палочки, степень разрушения биопленки составила 56,7–65,7%.

Все исследованные соединения (в зависимости от дозы) проявили выраженную ингибирующую активность в отношении зрелой 5-суточной биопленки *P. aeruginosa*.

Также было отмечено, что исследуемые соединения проявляют высокую антибиопленочную активность по сравнению с официальными антимикробными препаратами.

Производные аминoproпанола могут стать основой для создания новой группы антимикробных препаратов и перспективных лекарственных средств для лечения хронических инфекций.

D. M. Dudikova, Z. S. Suvorova, V. V. Nedashkivska, A. O. Sharova, M. L. Dronova, N. O. Vrynchanu

SI «Institute of pharmacology and toxicology of NAMS of Ukraine», Kyiv

ANTIBIOFILM ACTIVITY OF AMINOPROPANOL DERIVATIVES AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Key words: microbial cells communities, microorganisms, *Pseudomonas aeruginosa*, aminopropanol derivatives, antibacterial agents

ABSTRACT

Bacterial biofilm, particularly formed by *Pseudomonas aeruginosa*, are a cause of severe chronic infectious diseases. Bacteria within a biofilm are phenotypically more resistant to antibiotics and the macroorganism immune system, making it an important virulence factor for many microbes.

The aminopropanol derivatives with adamantyl (KVM-97) and N-alkylaryl radicals (KVM-194, KVM-204, KVM-261, and KVM-262) were used as study object. The aim of this study was to investigate the antibiofilm activity of compounds on biofilm formation and on mature biofilm of *P. aeruginosa*. The effects of the aminopropanol derivatives on the biofilm mass were evaluated by using crystal violet assay. Ciprofloxacin, meropenem, ceftazidime, gentamicin were used as reference substances.

Reported results demonstrate that all compounds displayed antibiofilm activity at the tested concentrations. Remarkable reduction in biofilm formation of *P. aeruginosa* was found after treatment with KVM-97, KVM-261 and KVM-262 in high concentration ($5\times$ MIC), biofilm inhibition activity were 84.3%, 90.5% and 83.3% respectively.

After a treatment with KVM-204 at 250 $\mu\text{g/ml}$ ($5\times$ MIC) 76.6% of the preformed 24-hr biofilms were destroyed. Furthermore, compounds KVM-97, KVM-194 and KVM-261 in both concentrations showed potent antibiofilm activity against the *P. aeruginosa*, inhibition activity values being between 56.7 and 65.7%.

All tested compounds in dose-dependent manner exhibited pronounced inhibition activity against mature 5-days *P. aeruginosa* biofilm.

It was also observed that tested compounds show high antibiofilm activity in comparison to reference antimicrobials.

The aminopropanol derivatives may provide templates for a new group of antimicrobial agents and potential future therapeutics for treating chronic infections.

Електронна адреса для листування з авторами: darmardud@gmail.com