

ОРИГІНАЛЬНА СТАТТЯ

УДК 547.435: 579.61: 615.281.9: 615.282

ФОРМУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ДО ПОХІДНОГО АРИЛАЛІФАТИЧНИХ АМІНОСПИРТІВ



Дронова Марія Леонідівна,
ml.dronova@gmail.com

Дронова М.Л., Суворова З.С., Цикоза А.В., Вринчану Н.О.

ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМН України", м. Київ, Україна

Резюме. Похідні 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси-3-(N-алкіл)-2-пропанолу є новим класом сполук з антимікробними властивостями, що здатні пригнічувати ріст та розмноження як бактерій, так і грибів. Однією з найбільш перспективних є сполука КВМ-194, у попередніх дослідженнях виявлено широкий спектр її активності по відношенню до планктонних мікроорганізмів та біоплівки. Метою нашої роботи було дослідити можливість розвитку резистентності у бактерій та грибів до дії сполуки КВМ-194. У експериментах були використані тест-штами *Staphylococcus aureus* і *Candida albicans*. Мікроорганізми вирощували на щільному поживному середовищі у присутності субінгібуючої концентрації сполуки. Чутливість бактерій і грибів до КВМ-194 та офіційних антимікробних препаратів визначали кожні 5 пасажів. Антимікробну активність похідного 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси-3-(N-алкіл)-2-пропанолу досліджували методом серійних розведень у рідкому поживному середовищі, чутливість бактерій та грибів до дії офіційних препаратів визначали диско-дифузійним методом. Отримані дані свідчать про відсутність достовірних змін МІК сполуки по відношенню до *S. aureus* та *C. albicans* протягом 20 пасажів. Дослідження активності офіційних препаратів показали, що чутливість *C. albicans* до клотримазолу не змінювалася в умовах експерименту, а антифунгальні засоби класу поліенів (ністатин та амфотерицин В) проявляють навіть дещо більш виразну інгібуючу дію. Не виявлено змін чутливості золотистого стафілококу, вирощеного у присутності КВМ-194, до таких антибіотиків як левофлоксацин, оксацилін, кліндаміцин та еритроміцин. Таким чином отримані результати свідчать про повільний розвиток резистентності бактерій та грибів до КВМ-194, а також відсутність перехресної стійкості між сполукою та офіційними антимікробними препаратами.

Ключові слова: антимікробна активність, резистентність, похідні арилаліфатичних аміноспиртів.

Вступ. Упродовж останніх десятиліть спостерігається інтенсивне збільшення частоти виявлення антибіотикорезистентних штамів патогенів та, водночас, зменшення кількості впроваджених у клінічну практику нових лікарських засобів з антимікробною дією. Так, з 1983 по 2007 рр. кількість антимікробних препаратів, дозволених FDA для медичного застосування, скоротилася майже на 75 % [1]. Однією із причин зменшення уваги виробників до розробки антибіотиків є значні матеріальні затрати на розробку та докази безпечності і ефективності, дослідження в клінічних умовах тощо. Враховується і нетривалий період використання антибактеріальних та антифунгальних препаратів (курсами у період інфекційного процесу), на відміну від лікарських засобів, які застосовуються для профілактики та лікування пацієнтів із хроніч-

ними захворюваннями (гіпертензивні, протидіабетичні та інші препарати), що впливає на прибутки фармацевтичних компаній.

Основним напрямком пошуку нових сполук з антимікробною дією наразі залишається хімічна модифікація антибіотиків вже відомих класів [2], оскільки такий шлях є значно швидшим, дешевшим та більш передбачуваним. Проте суттєві переваги такого підходу поєднуються з основним недоліком – нова сполука зберігає базову хімічну структуру та механізм дії попередника, а отже у більшості випадків і механізми резистентності. Більш ризикованим є процес пошуку речовин із високою антимікробною активністю серед нових хімічних класів, у такому випадку вірогідність швидкої появи резистентності до нового препарату є значно нижчою.

Перспективними для створення нових антимікробних препаратів є похідні 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-3-(N-алкіламіно)-2-пропанолу, оскільки вони в скринінгових експериментах проявили широкий спектр антимікробної дії [3, 4, 5]. Серед вперше синтезованих похідних четвертинних солей 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-3-(N-алкіламіно)-2-пропанолу виявлена сполука KBM-194, яка виявляє виразну антимікробну активність відносно бактерій та грибів, порушує ріст та розмноження як планктонних, так і біоплівкових форм мікроорганізмів [4, 6].

Отримані дані щодо спектру та вираженості інгібуючої дії свідчать про доцільність проведення поглиблених досліджень сполуки KBM-194 для оцінки перспективності створення на її основі нового лікарського засобу з антимікробною активністю.

На етапі поглибленого дослідження KBM-194 є доцільним встановити ефективність сполуки в умовах *in vivo*, механізм антимікробної дії, вивчити швидкість формування резистентності збудників та можливість сумісного застосування з офіційними антимікробними препаратами.

Мета роботи. Дослідити можливість розвитку стійкості у бактерій та грибів до дії сполуки KBM-194.

Матеріали та методи. Антимікробну активність похідного арилаліфатичних аміноспиртів досліджували методом серійних розведень у рідких поживних середовищах із встановленням мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Щільність інокуляту при визначенні МІК складала 5×10^5 КУО/мл (для бактерій) та 10^6 грибних елементів/мл поживного середовища. В експериментах використана культура, виділена з однієї мікробної колонії. При встановленні МІК сполуки відносно бактерій використовували бульон Мюллера-Хінтон, відносно грибів – рідке середовище Сабуро [7, 8, 9].

Визначення можливості виникнення стійких штамів мікроорганізмів та швидкість формування резистентності бактерій та грибів до дії сполуки KBM-194 проводили по відношенню до тест-мікроорганізмів – *Staphylococcus aureus* 042012 та *Candida albicans* 1659. Бактерії вирощували на агарі Мюллера-Хінтон, гриби – на щільному середовищі Сабуро впродовж 24 год при 35 °C. Мікроорганізми культивували на поживних середовищах, які містили субінгібуючу концентрацію (0,5 МІК) сполуки KBM-194. Після кожного з 5 пасажів проводили перевірку морфологічних та культуральних характеристик тест-мікроорганізмів, а також їх чутливість до сполуки та досліджуваних антибактеріальних та антифунгальних препаратів.

Чутливість бактерій та грибів до дії офіційних препаратів визначали диско-дифузійним методом, з використанням стандартного набору дисків (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Індія) [8, 10].

Сполука KBM-194 синтезована у Інституті органічної хімії НАН України к. фарм. н. Ю.В. Коротким.

Всі дослідження проведено не менше, ніж у трьох повторках. Статистична обробка результатів проводилася за допомогою програми “Statistica 6.0”, для оцінки достовірності відмінностей використовували критерій Фридмана. Дані наведено у вигляді $M \pm m$, де M – середнє значення, m – стандартне відхилення.

Результати та їх обговорення. Дослідження щодо розвитку резистентності *S. aureus* та *C. albicans* по відношенню до похідного арилаліфатичних аміноспиртів KBM-194 проводилися протягом 20 пасажів мікроорганізмів. Отримані дані наведено на рис. 1.

Результати експериментів (рис. 1) свідчать, що чутливість *S. aureus* до дії похідного арилаліфатичних аміноспиртів KBM-194 не змінюється впродовж усього терміну дослідження. Виявлено деяке зниження чутливості *C. albicans* до дії похідного арилаліфатичних аміноспиртів. Так, на 10-му пасажі реєструється зниження активності сполуки відносно дріжджоподібного гриба у 2 рази. Таке зниження хоча і має місце, але є статистично недостовірним. Упродовж наступних пересівів (до 20 пасажу) змін МІК не спостерігали, подальше зниження активності сполуки відносно *C. albicans* не реєстрували.

Оскільки при сумісному застосуванні антимікробних препаратів можливе формування перехресної резистентності, в подальших експериментах було досліджено вплив сполуки KBM-194 на чутливість грибів та бактерій до дії офіційних препаратів: ністатину, амфотерицину В, клотримазолу (антифунгальні засоби), левофлоксацину, оксациліну, кліндаміцину, еритроміцину (антибактеріальні препарати).

Отримані результати наведено в табл. 1.

Як свідчать дані табл. 1., похідне арилаліфатичних аміноспиртів достовірно не змінювало чутливість гриба *C. albicans* до дії азолового препарату клотримазолу, зони затримки росту становлять (13,0-14,0) мм.

Експериментально встановлено, що присутність в інкубаційному середовищі сполуки KBM-194 (0,5 МІК) не тільки не знижує специфічну активність полієнових антибіотиків, але і сприяє підвищенню чутливості *C. albicans* (до дії ністатину – з 10 пасажу, до дії амфотерицину В – з 15 пасажу).

Можливо такі зміни можуть мати місце за рахунок різних механізмів дії. Відомо, що полієнові препарати

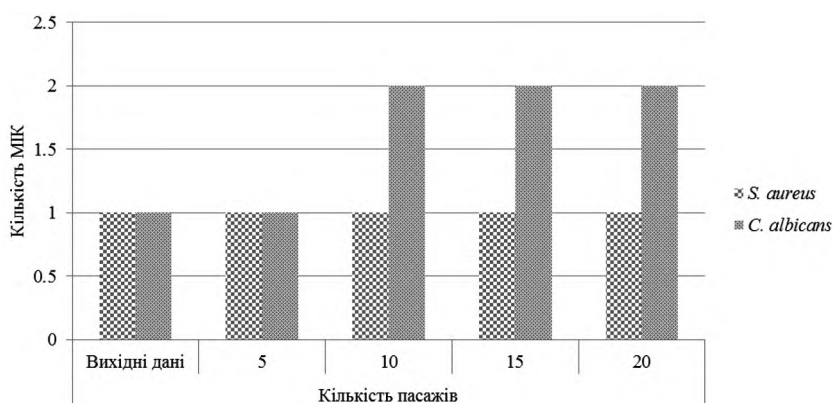


Рис. 1. Чутливість мікроорганізмів до сполуки KBM-194 в залежності від кількості пасажів

Таблиця 1.

Чутливість *C. albicans* до антифунгальних засобів (діаметри зон затримки росту, мм)

Препарати	Вміст у диску (мкг)	Вихідні дані	Кількість пасажів			
			5	10	15	20
Ністатин	100,0	21,8±1,92	21,0±0,82	24,5±0,58*	23,0±0,82*	24,0±0,82*
Амфотерицин В	40,0	11,3±0,58	12,4±1,14	12,8±1,47	16,8±1,3	16,3±3,79
Клотримазол	10,0	13,0±1,0	14,0±1,0	13,0±1,4±	13,5±2,38	14,0±2,16

Примітка: * – достовірні зміни у порівнянні з вихідними даними, p<0,05.

Таблиця 2.

Чутливість *S. aureus* до антибіотиків (діаметри зон затримки росту, мм)

Препарати	Вміст у диску (мкг)	Вихідні дані	Кількість пасажів			
			5	10	15	20
Левофлоксацин	5,0	40,5±0,84	40,7±1,03	41,7±0,52	40,6±1,51	40,8±1,6
Оксацилін	1,0	16,0±2,83	17,0±0,82	16,0±1,41	17,0±1,15	17,0±0,82
Кліндаміцин	2,0	39,0±0,82	39,5±0,58	39,8±0,96	39,5±0,58	39,3±1,5
Еритроміцин	15,0	39,0±1,83	40,0±0,82	40,0±0,82	40,0±1,63	40,8±0,96

здійснюють антифунгальний ефект, зв'язуючись з ергостерином, що призводить до підвищення проникності цитоплазматичної мембрани.

Результати дослідження специфічної антибактеріальної активності офіційних антибактеріальних препаратів за умови впливу сполуки КВМ-194 наведено в табл. 2.

Як свідчать дані табл. 2, за умови присутності в інкубаційному середовищі субінгібууючої концентрації сполуки КВМ-194 активність левофлоксацину відносно *S. aureus* не змінюється, діаметри зон затримки росту мікроорганізмів у межах (40,5-41,7) мм. Встановлено, що сполука КВМ-194 не здійснює негативного впливу на специфічну активність представника ізоксазолілпеніцилінів – оксациліну, лінкозамідів – кліндаміцину та макролідів – еритроміцину.

Таким чином результати проведених експериментів свідчать, що резистентність *S. aureus* до сполуки КВМ-194 не формується. Практично не змінюється і чутливість дріжджоподібного гриба *C. albicans* до дії похідного арилаліфатичних аміноспиртів. Встановлено, що за умови присутності в інкубаційному середовищі похідного арилаліфатичних аміноспиртів КВМ-194 перехресна резистентність у мікроорганізмів до офіційних антибактеріальних та антифунгальних препаратів не формується.

Висновки.

1. Встановлено, що до сполуки КВМ-194 не формується резистентність у *S. aureus*. У *C. albicans* після 10 пасажів зі сполукою спостерігається зниження чутливості до дії КВМ-194 удвічі.

2. Експериментами доведено, що похідне арилаліфатичних аміноспиртів не здійснює негативного впливу на специфічну активність антифунгальних препаратів – поліенів та азолів.

3. Сполука КВМ-194 не сприяє формуванню перехресної резистентності до оксациліну, кліндаміцину, еритроміцину та левофлоксацину, що свідчить про можливість їх сумісного застосування при проведенні комбінованої антибіотикотерапії.

Конфлікт інтересів.

Автор заявляє, що не має конфлікту інтересів, який може сприйматися таким, що може завдати шкоди неупередженості статті.

Джерела фінансування.

Ця стаття не отримала фінансової підтримки від державної, громадської або комерційної організації.

ЛІТЕРАТУРА

- Emerging Antibiotics: Will We Have What We Need? [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.medscape.com/viewarticle/715971>
- De Souza Mendes C. U. Pipeline of known chemical classes of antibiotics / De Souza Mendes C.U., De Souza Antunes A.M. // Antibiotics. – 2013. – № 2. – P. 500-534.
- Митюк І. В. Антибактеріальна активність нових похідних алкоксамінопропанолів / І.В. Митюк, З.С. Суворова, Г.С. Сірик // Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції [“Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини”], (21-22 вересня 2012 р.). – Львів, 2012. – С. 102-103.
- Суворова З. С. Вплив похідних алкоксамінопропанолу на формування біоплівки грамнегативними бактеріями / З.С. Суворова // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2013. – № 1. – С. 78-83
- Дронова М. Л. Чутливість мікоплазм до похідних арилаліфатичних аміноспиртів / М.Л. Дронова, К.С. Коробкова, Н.О. Вричану, І. П. Токовенко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2013. – № 4-5 – С. 48-51.
- Дронова М. Л. Чувствительность биопленок Staphylococcus aureus к действию производных арилалифатических аминоспиртов / М. Л. Дронова // Universum: Медицина и фармакология : электрон. научн. журн. – 2015. – № 2. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/1932>.
- Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: Метод. рекомендації // Волянський Ю.Л., Гриценко І.С., Ширококов В.П., Дубініна Н.В. та ін. – Київ, 2004. – 38 с.
- Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания МУК 4.2.1890-04 // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотерап. – 2004. – Т.6, № 4. – С. 306-359.
- Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts: EUCAST definitive document EDef 7.2 Revision. – 21 p. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/EUCAST_EDef_7_2_revision.pdf.
- Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline – NCCLS Document M44-A // National Committee for Clinical Laboratory Standards. Pennsylvania, 2008. – V.24, № 15. – 36 p.

**ФОРМИРОВАНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
МИКРООРГАНИЗМОВ К ПРОИЗВОДНОМУ
АРИЛАЛИФАТИЧЕСКИХ АМИНОСПИРТОВ**

Дронова М.Л., Суворова З.С., Цыкоза А.В.,
Врынчану Н. А.

ГУ "Институт фармакологии и токсикологии
НАМН Украины", г. Киев, Украина

Резюме. Производные 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси-3-(N-алкил)-2 пропанола – новый класс соединений с антимикробными свойствами, способных подавлять рост и размножение как бактерий, так и грибов. Одним из наиболее перспективных является соединение КВМ-194, в предыдущих исследованиях выявлен широкий спектр его активности по отношению к планктонным микроорганизмам и биопленкам. Целью нашей работы было исследовать возможность развития резистентности у бактерий и грибов к действию соединения КВМ-194. В экспериментах были использованы тест-штаммы *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. Микроорганизмы выращивали на плотной питательной среде в присутствии субингибирующей концентрации соединения. Чувствительность бактерий и грибов к КВМ-194 и официальным антимикробным препаратам определяли каждые 5 пассажей. Антимикробную активность производного 4-(1,1,3,3-тетраметил-бутил) фенокси-3-(N-алкил)-2-пропанола исследовали методом серийных разведений в жидкой питательной среде, чувствительность бактерий и грибов к действию официальными препаратами определяли диско-диффузионным методом. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии достоверных изменений МИК соединения по отношению к *S. aureus* и *C. albicans* в течение 20 пассажей. Исследования активности официальных препаратов показали, что чувствительность *C. albicans* к клотримазолу не изменялась в условиях эксперимента, а антифунгальные препараты класса полиенов (нистатин и амфотерицин В) проявляют даже несколько более выраженное ингибирующее действие. Не выявлено изменений чувствительности золотистого стафилококка, выращенного в присутствии КВМ-194, к таким антибиотикам как левофлоксацин, оксациллин, клиндамицин и эритромицин. Таким образом полученные результаты свидетельствуют о медленном развитии резистентности бактерий и грибов к КВМ-194, а также об отсутствии перекрестной устойчивости между соединением и официальными антимикробными препаратами.

Ключевые слова: антимикробная активность, резистентность, производные арилалифатических аминоспиртов.

**DEVELOPMENT OF RESISTANCE
TO A DERIVATIVE OF THE ARYLALIPHATIC
AMINOALCOHOLS**

M. Dronova, Z. Suvorova,
A. Tsykoza, N. Vrynchanu

SI "Institute of pharmacology and toxicology of NAMS
of Ukraine", Kiev, Ukraine

Summary. Derivatives of 4- (1,1,3,3-tetramethyl butyl) phenoxy-3-(N-alkyl amino)-2-propanol are the novel class of antimicrobial agents, possessing pronounce inhibitory activity against bacteria and fungi. KVM-194 was found to be one of the most promising compounds of this class, preliminary experiments demonstrated its broad spectrum of activity against planktonic microorganisms and biofilms. The aim of the present study was to investigate the development of resistance to KVM-194 in bacteria and fungi. *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* were used in all experiments. Microorganisms were grown on the nutrient agar in the presence of subinhibitory concentration of compound. Susceptibility of bacteria and fungi to KVM-194 and official antimicrobials was tested every 5 passages. The antimicrobial activity of the 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenoxy-3-(N-alkyl)-2-propanol derivative was investigated by serial broth dilution method. Susceptibility of bacteria and fungi to the official antimicrobials was tested by disk diffusion assay. The data obtained suggest no significant changes of *C. albicans* and *S. aureus* susceptibility to KVM-194 for 20 passages in the presence of compound. Further studies showed that clotrimazole action on *C. albicans* was not affected in the experimental conditions, while polyene antimycotics (nystatin and amphotericin B) demonstrate even slightly higher activity. Bacteria *S. aureus*, grown in the presence of KVM-194, showed no changes in susceptibility to levofloxacin, oxacillin, clindamycin and erythromycin. Thus, obtained results suggest a slow development of KVM-194 resistance in bacteria and fungi and a lack of cross-resistance between the compound and official antimicrobial agents.

Key words: antimicrobial activity, resistance, derivatives of arylaliphatic aminoalcohols.