

З. С. Суворова, Н. О. Вринчану

Чутливість біоплівок *Pseudomonas aeruginosa* до дії похідних алкоксіамінопропанолу

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», м. Київ

Ключові слова: біоплівки, мікроорганізми, *Pseudomonas aeruginosa*, похідні алкоксіамінопропанолу, антибіотики

Одними з розповсюджених збудників нозокоміальних інфекцій є грамнегативні неферментуючі бактерії, представники родів *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium*. Неферментуючі бактерії (НБ) широко розповсюджені в природі, їх можна виділити з різних джерел навколишнього середовища, ґрунту, водойм тощо. Ці мікроорганізми здатні зумовити гнійно-запальні процеси в людей із порушенням функції імунної системи, у хворих зі злоякісними пухлинами, пацієнтів, яким призначали антибіотикотерапію та ін. Одним із представників грамнегативних неферментуючих бактерій є синьогнійна паличка, здатна викликати різноманітні захворювання, головним чином, нозокоміальні інфекції [1, 2].

P. aeruginosa характеризується значною стійкістю до антимікробних препаратів. Так, аналіз чутливості 178 штамів, виділених від хворих, що знаходилися на лікуванні у стаціонарах різних профілів (дитячих, відділеннях реанімації та інтенсивної терапії, пологових будинках тощо), показав, що найбільша кількість стійких штамів синьогнійної палички (близько 30 %) реєструється саме у відділеннях реанімації та інтенсивної терапії. У стаціонарах цього профілю кількість меропенемстійких штамів *P. aeruginosa* складала 42,5 %, імпенемстійких – більше 50,0 %, до обох препаратів нечутливими виявилися 32,4 % виділених штамів бактерій. Продуценти метало-бета-лактамаз складала 19,1 % усіх досліджених та 30,3 % карбапенемстійких

культур. Установлено, що в геномі цих штамів присутні гени *bla-vim2* [3].

Стійкість до сучасних антимікробних препаратів синьогнійній паличці забезпечують: ферментативна інактивація препарату, наявність альтернативних метаболічних шляхів, порушення проникності зовнішніх структур мікробної клітини, зміна мішені дії, активація механізму ефлюкса тощо [4, 5].

У клінічній практиці мікроорганізми все частіше спостерігаються у вигляді спільнот мікроорганізмів – біоплівок. Такі спільноти зумовлюють різноманітні гнійно-запальні процеси, сприяють хронізації процесу, призводять до тяжких наслідків (генералізації, летальності), збільшують тривалість перебування хворих у стаціонарі та потребують значних матеріальних затрат.

Мікроорганізми у формі біоплівок (монокультура, мікробні асоціації) характеризуються високим ступенем резистентності до дії антимікробних засобів. Біоплівки стійкі до дії всіх сучасних антибіотиків у нетоксичних для організму людини дозах. Натепер у клінічній практиці препарати для лікування захворювань, обумовлених біоплівками, відсутні.

Підвищену стійкість до сучасних антимікробних засобів біоплівці забезпечує її структура та фізіологічні властивості [6, 7]. Біоплівка вкрита полімерним матриксом, її структура пронизана водними каналами, що транспортують поживні речовини та видаляють продукти метаболізму. Полімерний матрикс, що вкриває біоплівку, забезпечує захист від негативного впливу зовнішніх факторів, у тому числі від дії антибіотиків. Всередині біоплівки клітини гетерогенні за градієнтом кисню, рН, швидкістю росту тощо.

Значне збільшення кількості резистентних штамів мікроорганізмів, зни-

ження ефективності сучасних антимікробних засобів, відсутність препаратів для лікування патологій, обумовлених біоплівками, актуалізує скринінгові дослідження з метою виділення активних сполук та створення на їхній основі ефективних антимікробних препаратів.

Пошук активних молекул здійснюється серед речовин природного та синтетичного походження. У цьому плані на увагу заслуговують похідні алкоксіамінопропанолу, які виявляють широкий спектр біологічної активності, зокрема, антимікробної.

Мета дослідження – вивчити активність нових похідних алкоксіамінопропанолу відносно біоплівок синьогнійної палички.

Матеріали та методи. Експерименти проведено з використанням еталонного тест-штаму *P. aeruginosa* ATCC 27853 та клінічного штаму *P. aeruginosa* 46, виділеного від хворого гнійно-запального процесом.

Культура *P. aeruginosa* 46 виявила чутливість до дії ципрофлоксацину, амікацину, гентаміцину, резистентна до цефотаксиму, цефепіму, тетрацикліну та меропенему.

Чутливість синьогнійної палички до дії похідних алкоксіамінопропанолу визначали методом серійних розведень і оцінювали за показником мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) [8]. Щільність інокуляту складала 10^5 КУО/мл поживного середовища. Експерименти проведено з використанням поживного бульйону Мюллера-Хінтона.

Здатність похідних алкоксіамінопропанолу впливати на процес формування біоплівки досліджували на 1- та 3-добових культурах бактерій, порушувати сформовані біоплівки – на 1-добовій культурі мікроорганізмів. Дослідження проведено в пластикових планшетах для імуноферментного аналізу [9]. Сполуки (для попередження плівкоутворення) вносили одночасно із внесенням бактерій, для визначення впливу на сформовані біоплівки – через 24 год після внесення культури мікроорганізмів. Щільність інокуляту складала 10^7 КУО/мл поживного середовища. Планшети інкубували в термостаті

впродовж 24 год при 37 °С. Після закінчення терміну інкубації вносили 0,1 % розчин генціанвіолету на 45 хв. Після промивання лунок дистильованою водою здійснювали екстракцію барвника 96,0 % розчином етанолу. Виміри оптичної щільності проводили на мікробіологічному аналізаторі ELx800 (BioТуК, США). Контролем була культура *P. aeruginosa* 46.

Сполуки синтезовані в Інституті органічної хімії НАН України канд. фарм. наук Ю. В. Коротким. Препаратами порівняння в дослідженні були: «Гентаміцин» виробництва ЗАТ «ФФ» Дарниця» та «Ципрофлоксацин», виробництва ВАТ «Київмедпрепарат».

Результати та їх обговорення. Проведеними дослідженнями встановлено, що МІК сполук КВМ-190 і КВМ-204 відносно еталонного тест-штаму *P. aeruginosa* ATCC 27853 складає 3,12 та 12,5 мкг/мл відповідно, відносно клінічного штаму *P. aeruginosa* 46 – 1,56 і 6,25 мкг/мл відповідно. Отримані дані МІК похідних алкоксіамінопропанолу відносно еталонного тест-штаму та штаму, виділеного від хворого гнійно-запальним процесом, свідчать про виразну антисиньогнійну дію вперше синтезованих сполук КВМ-190 і КВМ-204. За рівнем МІК ці речовини мають переваги перед цефотаксимом (МІК 8-32 мкг/мл) і цефтріаксоном (МІК 8-64 мкг/мл) та наближаються до рівня активності карбапенемів: азтреонаму та ертапенему (МІК 2-8 мкг/мл) [8]. Отримані дані свідчать про перспективність уперше синтезованих похідних алкоксіамінопропанолу як нових антисиньогнійних препаратів.

Оскільки в клінічній практиці мікроорганізми все частіше виявляються у вигляді біоплівок, у подальших експериментах дослідили активність цих сполук відносно біоплівок (попередження утворення біоплівок та їхнє руйнування).

Вивчення впливу нових похідних алкоксіамінопропанолу впливати на процес формування біоплівки *P. aeruginosa* досліджували в концентраціях 1,0 МІК, 2,5 МІК та 5,0 МІК.

Отримані результати наведено на рисунку 1.

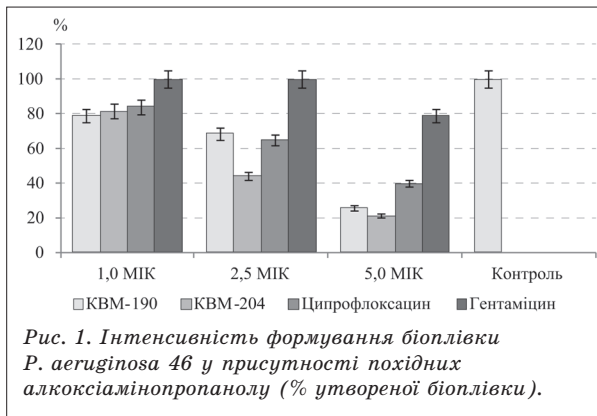


Рис. 1. Інтенсивність формування біоплівки *P. aeruginosa* 46 у присутності похідних алкоксіамінопропанолу (% утвореної біоплівки).

Дані рисунка 1 свідчать, що сполуки КВМ-190 і КВМ-204 проявляють активність відносно біоплівок синьогнійної палички, ступінь вираженості дії залежить від концентрацій. Так, за умови присутності в інкубаційному середовищі КВМ-190 у концентрації 2,5 МІК формування біоплівки складало 68,7 %, при дії сполуки КВМ-204 – 44,4 % порівняно з контролем. Зі збільшенням концентрації сполук формування біоплівки пригнічувалося в більшому ступені. Так, при концентрації 5,0 МІК сполука КВМ-190 пригнічувала плівкоутворення на 74,1 %, КВМ-204 – на 78,7 % порівняно з контролем. Сполуки КВМ-190 і КВМ-204 при концентрації 5,0 МІК за ступенем інгібуючої активності мають переваги перед Ципрофлоксацином та Гентаміцином.

Дослідження впливу похідних алкоксіамінопропанолу на сформовану впродовж 24 год біоплівку здійснювали в концентраціях 10,0 МІК, 25,0 МІК та 50,0 МІК.

Отримані результати досліджень наведено на рисунку 2.

Дані рисунка 2 свідчать, що сполуки КВМ-190 і КВМ-204 дозалежно впливають на біоплівку *P. aeruginosa* 46, інгібіція складає 16,7–61,0 % залежно від концентрації. Так, при концентрації 50,0 МІК інгібіція найвираженіша – 61,0 % (КВМ-190) і 55,6 % (КВМ-204). Зі зменшенням концентрації сполуки до 25,0 МІК активність сполук дещо зменшується і складає 20,6 % (КВМ-190) і 42,3 % (КВМ-204).

Препарат порівняння «Гентаміцин» у концентраціях 10 МІК і 25,0 МІК інгібуючих властивостей до сформованої біоплівки не виявив. У концентрації 50,0 МІК інгібіція складала 13,8 %. У ципрофлоксацину найвираженіша дія спостерігалася при концентрації 50,0 МІК – 13,8 % порівняно з контролем, 25,0 МІК – 23,0 %, 10,0 МІК – 5,0 % порівняно з контролем.

Отже, уперше синтезовані похідні алкоксіамінопропанолу виразно інгібують ріст і розмноження синьогнійної палички як еталонного, так і клінічного штаму. Дослідження впливу на біоплівки *P. aeruginosa* показало, що сполуки здатні впливати на процес формування біоплівки та руйнувати сформовану молоду біоплівку.

Для оцінки перспективності створення на основі сполук КВМ-190 і КВМ-204 нових антимікробних засобів проведено дослідження інгібуючої дії сполук на катетерній моделі.

Більшість мікроорганізмів за рахунок неспецифічних механізмів адгезії здатні прикріплюватися до різних матеріалів, зокрема, до поверхні катетерів. Процес адгезії здійснюється мікроорганізмами за наявності на поверхні катетера білків плазми крові (фібрину, фібронектину, ламініну). На місцеві коагуляційні процеси (тромбогенез) впливає також хімічний склад матеріалу катетера. Найбільшу тромбогенну активність виявлено в поліетиленових та полівінілхлоридних катетерів, найменшу – у силіконових, тefлонових і поліуретанових [10].

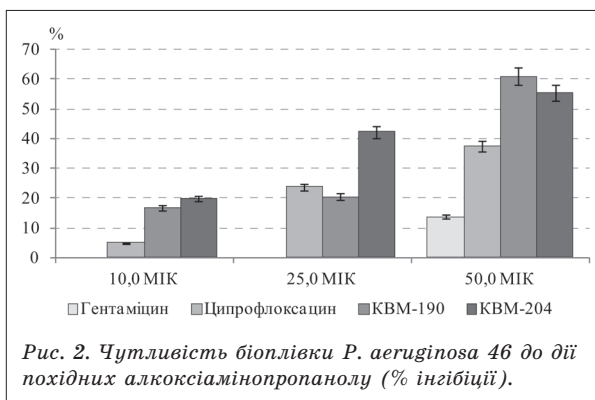


Рис. 2. Чутливість біоплівки *P. aeruginosa* 46 до дії похідних алкоксіамінопропанолу (% інгібіції).

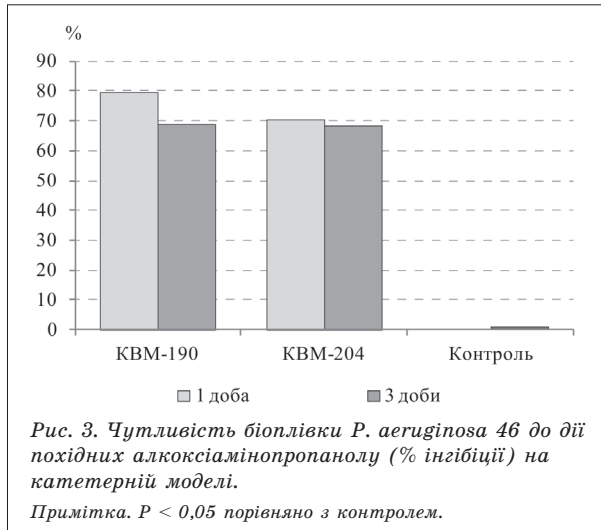
Експерименти щодо здатності *P. aeruginosa* до плівкоутворення на катетерах проведено на урогенітальних катетерах із полівінілхлоридного матеріалу виробництва «Galmed» (Польща).

Концентрації сполук складали 5,0 МІК.

Отримані результати наведено на рисунку 3.

Дані рисунку 3 свідчать, що на катетерній моделі активність сполуки КВМ-190 більш виразна, ніж КВМ-204. Сполука КВМ-190 у концентрації 5,0 МІК руйнує 79,3 % сформованої 1-добової біоплівки та 69,0 % 3-добової біоплівки синьогнійної палички. Активність сполуки КВМ-204 відносно до 1- та 3-добових біоплівок практично однакова й складає при концентрації 5,0 МІК 70,2 % (1-добова) та 68,2 % (3-добова).

Таким чином, проведені експерименти свідчать, що вперше синтезовані похідні алкоксіамінопропанолу проявляють активність відносно синьогнійної палички, інгібують ріст та розмноження планктонних мікроорганізмів і



бактерій у формі біоплівок. Сполуки впливають як на процес плівкоутворення, так і руйнують уже сформовані біоплівки *P. aeruginosa*. До дії похідних алкоксіамінопропанолу більш чутливі біоплівки, які знаходяться на стадії її формування, ніж сформовані біоплівки, що свідчить про профілактичну направленість дії та перспективність створення препаратів для профілактики плівкоутворення.

- Шагинян И. А. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности / Шагинян И. А., Чернуха М. Ю. // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер.– 2005.– Т. 7, № 3.– С. 271–285.
- Рекомендации по оптимизации антимикробной терапии нозокомиальных инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями в отделениях реанимации и интенсивной терапии / Страчунский Л. С., Решедько Г. К., Рябкова Е. Л. [и др.] // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер.– 2002.– Т. 4, № 4.– С. 379–390.
- Grkovic S. Regulation of bacterial drug export systems / Grkovic S., Brown M. H., Skurray R. A. // Microbiol. Mol. Biol. Rev.– 2002.– V. 66.– P.671–701.
- Карбаленемоустойчивые штаммы *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах города Пермь / Карпунина Т. И., Демаков В. А, Кузнецова М. В. [и др.] // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер.– 2010.– Т. 12, № 3.– С. 246–252.
- Jack D. L. The drug/metabolite transporter superfamily / Jack D. L., Yang N. M., Saier M. H. Jr. // Eur. J. Biochem.– 2001.– V. 268.– P. 3620–3539.
- Белобородова Н. В. Роль микробных сообществ или биопленок в кардиохирургии / Белобородова Н. В., Байрамов И. Т. // Антибиот. химиотер.– 2008.– № 11–12.– С. 44–59.
- Афиногенова А. Г. Микробные биопленки ран. Состояние вопроса / Афиногенова А. Г., Даровская Е. Н. // Травматология и ортопедия России.– 2011.– Т. 61, № 3.– С. 119–125.
- Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам [Методические указания МУК 4.2.18-90-04] // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер.– 2004.– Т. 6, № 4.– С. 306–359.
- Образование биопленок – пример социального поведения бактерий / Романова Ю. М., Смирнова Т. А., Андреев А. Л. [и др.] // Микробиология.– 2006.– Т. 75, № 4.– С. 556–661.
- Сидоренко С. В. Инфекции, связанные с центральным венозным катетером // Инфекции и антимикроб. химиотер.– 2001.– Т. 3, № 2.– С. 47–49.

З. С. Суворова, Н. А. Врынчану

Чувствительность биопленок *Pseudomonas aeruginosa* к действию производных алкоксиаминопропанола

Изучена чувствительность *Pseudomonas aeruginosa* к действию новых производных алкоксиаминопропанола. Установлено, что соединения дозозависимо нарушают процесс пленкообразования и разрушают сформировавшиеся биопленки синегнойной палочки, в том числе и сформированные на катетерах. Нарушение пленкообразования *P. aeruginosa* в присутствии производных алкоксиаминопропанола свидетельствует о перспективности разработки на их основе antimicrobных препаратов для профилактики пленкообразования.

Ключевые слова: биопленки, микроорганизмы, Pseudomonas aeruginosa, производные алкоксиаминопропанола, антибиотики

Z. S. Suvorova, N. A. Vrynchanu

Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to the action of alkoxyaminopropanol derivatives

Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to the action of novel derivatives of alkoxyaminopropanol was tested. It was found that compounds in a dose-dependent manner disrupt biofilm formation and destroy *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, including those formed on catheters. Disruption of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm indicates the prospects derivatives of alkoxyaminopropanol as antimicrobial drugs for biofilm prevention.

Key words: biofilms, microorganisms, Pseudomonas aeruginosa, derivatives of alkoxyaminopropanol, antibiotic

Надійшла: 28.08.2012 р.

Контактна особа: Суворова Зінаїда Сергіївна, інженер I категорії, відділ фармакології протимікробних засобів, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», вул. Е. Потьє, 14, м. Київ, 03680. Тел.: +38 (063) 536-29-27. E-mail: suzi-220@bigmir.net