

З. С. Суворова

Вплив похідних алкоксіамінопропанолу на формування біоплівок грамнегативними бактеріями

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

Ключові слова: біоплівки, мікроорганізми, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, похідні алкоксіамінопропанолу, антибіотики

Стійкість збудників гнійно-запальних процесів до антибіотиків є основною причиною недостатньої ефективності антимікробної хіміотерапії. Не дивлячись на достатню кількість антимікробних засобів (більше 30 груп препаратів), антибіотикорезистентність залишається актуальною проблемою клінічної медицини. Особливо небезпечними є метицилін-резистентний стафілокок (*MRSA*), ентерококи, псевдомонади, ентеробактерії, зокрема, продукуючі β -лактамази, практично нечутливі до сучасних антимікробних препаратів [1–4].

Одне із провідних місць у структурі гнійно-запальних процесів займають ентеробактерії. Близько 13 з 30 родів родини *Enterobacteriaceae* можуть обумовлювати різноманітні хвороби кишкової та некишкової локалізації. Серед них – *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* [5]. Ці мікроорганізми спричиняють інфекції сечовивідних шляхів (СВШ), ускладнюють перебіг післяопераційних ран, спричиняють інфекції кісток та суглобів, верхніх та нижніх дихальних шляхів, шлунково-кишкового тракту тощо [6].

Дослідженнями останнього десятиліття встановлено, що більшість мікроорганізмів існує у вигляді специфічно організованих та прикріплених до субстрату біоплівок [7–9]. Біоплівки є основною стратегією виживання бактерій в екологічних нішах. Знаходячись

у прикріпленому стані в складі біоплівок, бактерії захищені від впливу пошкоджуючих факторів зовнішнього середовища та антимікробних речовин. Згідно із сучасним уявленням, біоплівка – це шар бактеріальних клітин, прикріплених до поверхні та один до одного, та вкритий полімерним матриксом. Мікроорганізми утворюють біоплівку на різних біологічних та абіотичних поверхнях, що створює серйозну проблему для медичної практики.

Біоплівки спричиняють близько 65–80 % усіх гнійно-запальних процесів, обумовлюють більшість хронічних інфекцій (верхніх дихальних шляхів, легень, серця, нирок, шкіри, кісток, системи травлення), контамінують практично всі штучні імпланти та катетери [16, 17]. Здатність мікроорганізмів до плівкоутворення є одним із вирішальних факторів у передачі внутрішньолікарняних інфекцій, при цьому значна роль належить саме грамнегативним мікроорганізмам, зокрема, клебсієлам, ешеріхіям, псевдомонадам тощо [10–12]. Процес формування біоплівок є складним, його етапи наведено на рисунку 1.

Мікроорганізми у формі біоплівок виявляють надзвичайну стійкість до дії сучасних антимікробних препаратів. Бактерії та гриби в біоплівках виживають у присутності антибіотиків, концентрації останніх у 500–1000 разів перевищують мінімальні інгібуючі [13–15]. Стійкість біоплівок до дії антимікробних засобів забезпечують: полімерний матрикс, що вкриває біоплівку; інактивація антибіотиків позаклітинними полімерами чи ферментами; уповільнення метаболізму клітин мікроорганізмів, які знаходяться в глибині біоплівки і, відповідно, зменшення швидкості їхнього росту за умов ліміту-

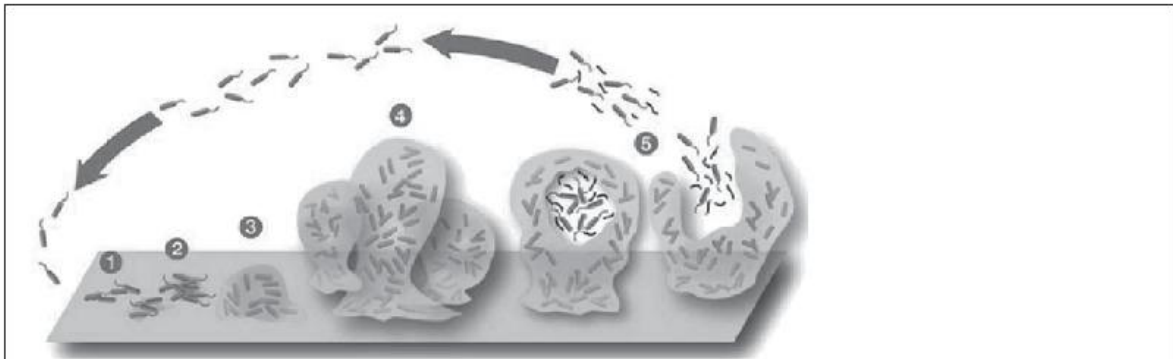


Рис. 1. Етапи формування біоплівки (копія із wonglab.seas.ucla.edu).

Примітка. 1 – первинне прикріплення мікроорганізмів до поверхні (адгезія, сорбція), стадія зворотна; 2 – фіксація мікроорганізмів до поверхні, стадія незворотна. Мікроорганізми виділяють позаклітинні полімери, які забезпечують стійку адгезію; 3 – дозрівання плівки. Клітини, які прикріпились до поверхні, полегшують прикріплення наступних клітин, позаклітинний матрикс утримує всю колонію. Накопичуються поживні речовини, початок ділення клітин; 4 – ріст біоплівки, збільшення її розмірів та форми. Позаклітинний матрикс захищає клітини від агресивних факторів навколишнього середовища; 5 – розповсюдження мікроорганізмів. Від біоплівки відокремлюються мікроорганізми, які здатні прикріплюватись до поверхні й утворювати нові колонії.

вання поживних речовин у біоплівці; експресія генів резистентності; формування в присутності антимікробного препарату мікроорганізмів – персистентів [18, 19, 23].

Таким чином, зростання кількості резистентних штамів та формування ними мікробних співтовариств – біоплівки, зниження ефективності антимікробних препаратів, усе це свідчить про необхідність пошуку нових сполук з антимікробною дією, активних як відносно планктонних мікроорганізмів, так і відносно біоплівки.

Мета дослідження – визначити чутливість біоплівки грамнегативних бактерій до дії похідних алкоксіамінопропанолу.

Матеріали та методи. Експерименти проведено з використанням клінічних штамів *E. coli* (*Escherichia coli*) 51, *P. aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa*) 46, *K. pneumoniae* (*Klebsiella pneumoniae*) 3884, виділених від хворих гнійно-запальними процесами. Культура *P. aeruginosa* 46 виявила чутливість до дії ципрофлоксацину, амікацину, гентаміцину, резистентна до цефотаксиму, цефепіму, тетрацикліну та меропенему. *E. coli* 51 була чутливою до дії цефалоспоринів (цефтріаксону, цефепіму, цефотаксиму та ін.), представника карбопенемів – меропенему, хінолонів (ципрофлоксацину, норфлоксацину), помірно чутлива до дії амікацину. Культура *K. pneumoniae*

3884 виявила чутливість до дії фторхінолонів (ципрофлоксацину, норфлоксацину), карбопенемів (меропенему) та цефалоспоринів (цефтріаксону), резистентна до дії аміноглікозидів (гентаміцину), цефалоспоринів (цефуроксіму, цефепіму, цефтазидиму).

Чутливість мікроорганізмів до дії похідних алкоксіамінопропанолу визначали методом серійних мікророзведень і оцінювали за показником мінімальної інгібувальної концентрації (МІК) [24]. Щільність інокуляту складала 10^5 КУО/мл поживного середовища. Експерименти проведено з використанням поживного бульйону Мюллера-Хінтон.

Здатність похідних алкоксіамінопропанолу впливати на процес формування біоплівки досліджували на 1-добових культурах бактерій. Дослідження проведені в пластикових планшетах для імуноферментного аналізу [9]. Сполуки вносили одночасно з внесенням бактерій. Щільність інокуляту складала 10^7 КУО/мл поживного середовища. Планшети інкубували в термостаті впродовж 24 год при 37°C . Після закінчення терміну інкубації вносили 0,1 % розчин генціанвіолету на 45 хв. Після промивки лунок дистильованою водою здійснювали екстракцію барвника 96,0 % розчином етанолу. Виміри оптичної щільності проводили на мікробіологічному аналізаторі ELx800 (BioTvK, США). У кожному експерименті ставили контроль на стерильність

поживного середовища та контроль росту культури.

Для цих експериментів були відібрані сполуки з найвиразнішою інгібуючою дією щодо відповідного еталонного тест-мікроорганізму. В експериментах використані сполуки: КВМ-114, КВМ-176, КВМ-177, КВМ-187, КВМ-190, КВМ-194, КВМ-204.

Сполуки синтезовані в Інституті органічної хімії кандидатом фарм. наук Ю. В. Коротким. Препаратами порівняння в дослідженні були: Гентаміцин, виробництва ЗАТ ФФ «Дарниця»; Ципрофлоксацин, виробництва ВАТ «Київмедпрепарат»; Цефтріаксон, виробництва «Борисівський завод медичних препаратів» (Білорусь).

Результати та їх обговорення. Проведеними дослідженнями встановлено, що МІК сполук відносно *E. coli* 51 складає: 3,12 мкг/мл (КВМ-194), 6,25 мкг/мл (КВМ-114, КВМ-187, КВМ-204), 12,5 мкг/мл (КВМ-177). Відносно *K. pneumoniae* 3884 МІК сполук КВМ-114 та КВМ-194 – 3,12 мкг/мл, КВМ-187 – 12,5 мкг/мл, КВМ-204 – 6,25 мкг/мл. Відносно *P. aeruginosa* 46 МІК похідних алкоксіамінопропанолу складають: КВМ-176 – 25,0 мкг/мл, КВМ-190 – 1,56 мкг/мл, КВМ-194 – 6,25 мкг/мл, КВМ-204 – 3,12 мкг/мл.

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

Отримані результати наведено на рисунку 2.

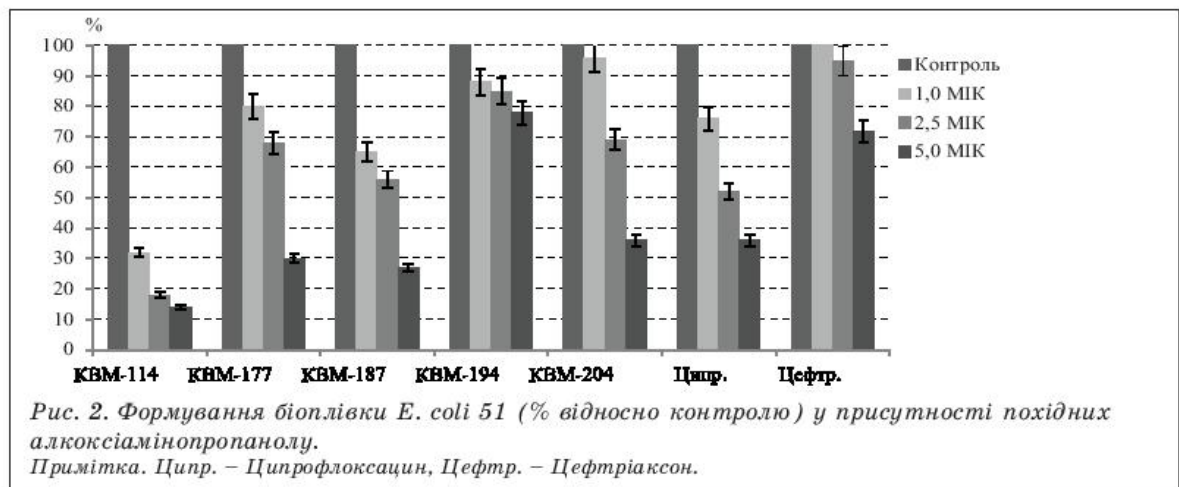
Дані, наведені на рисунку 2, свідчать, що вперше синтезовані сполуки

порушують процес плівкоутворення *E. coli*, ступінь вираженості інгібуючого ефекту залежить від сполуки та концентрації. У концентрації 1,0 МІК порушення процесу плівкоутворення *E. coli* більшою мірою спостерігається за умови присутності в інкубаційному середовищі сполук КВМ-114 та КВМ-187, пригнічення плівкоутворення складає 68,0 % та 35,0 % відповідно. Інгібуючий ефект цих сполук зареєстровано й при концентрації 2,5 МІК, інгібіція складає 82,0 % (КВМ-114) та 44,0 % (КВМ-187). При концентрації 5,0 МІК пригнічуючий ефект сполук зростає. Так, сполука КВМ-114 інгібує утворення біоплівки на 86,0 %, КВМ-187 – на 73,0 % порівняно з контролем. Менша інгібуюча дія спостерігається й у сполук КВМ-177, КВМ-194 та КВМ-204.

В експериментах препарати порівняння не виявили виразного впливу на процес плівкоутворення кишкової палички. При концентрації Ципрофлоксацину 1,0 МІК інгібіція плівкоутворення складала 34,0 %, при 2,5 МІК – 48,0 %, при 5,0 МІК – 66,0 % порівняно з контролем.

Цефтріаксон в концентрації 1,0 МІК не впливав на процес плівкоутворення, у концентрації 2,5 МІК інгібіція складала 5,0 %, при 5,0 МІК – 28,0 % порівняно з контролем.

Результати проведених експериментів свідчать, що вперше синтезовані похідні алкоксіамінопропанолу дозозалежно впливають на формування біоплівки *E. coli*. Найактивнішою відносно *E. coli* виявилася сполука КВМ-114, яка вже в концентрації 1,0 МІК пригнічувала ріст біоплівки. За відсотком перешкоджання формування біоплівки киш-



кової палички, похідні аміноспиртів не поступаються або перевершують дію Цефтріаксону та Ципрофлоксацину.

Активність нових похідних алкоксиамінопропанолу відносно *K. pneumoniae* 3884 наведено на рисунку 3.

Наведені на рисунку 3 дані свідчать, що *K. pneumoniae* виявила чутливість до дії всіх досліджуваних похідних алкоксиамінопропанолу. Найвиразніша дія зареєстрована в сполук КВМ-114 та КВМ-204. У концентрації 1,0 МІК сполуки КВМ-114 та КВМ-204 пригнічують плівкоутворення на 30,0 % та 34,9 % відповідно. Інгибуючий ефект цих сполук зареєстровано й при концентрації 2,5 МІК, пригнічення складало 45,0 % (КВМ-114) та 45,2 % (КВМ-204). При концентрації 5,0 МІК інгибуючий ефект збільшується. Так, сполука КВМ-114 пригнічувала плівкоутворення на 66,0 %, КВМ-204 – на 69,2 %. Вплив сполук КВМ-187 та КВМ-194 на процес плівкоутворення *K. pneumoniae* виражений у меншому ступені.

Експерименти не виявили активності препаратів порівняння відносно тест-об'єкта *K. pneumoniae* 3884. У концентрації 1,0 МІК інгібіція плівкоутворення Ципрофлоксацином складала 2,0 %, у концентрації 2,5 МІК – 16,7 %. При концентрації 5,0 МІК відсоток пригнічення становить 17,8 %.

Цефтріаксон у концентраціях 1,0 МІК та 2,5 МІК не впливав на процес плівкоутворення, у концентрації 5,0 МІК інгібіція складала 13,8 %.

Таким чином, проведені дослідження показали, що похідні алкоксиамінопропанолу впливають на процес формування біоплівки *K. pneumoniae*. Найактивнішою речовиною відносно *K. pneumoniae* виявилась сполука КВМ-204.

Активність сполук відносно *P. aeruginosa* 46 наведено на рисунку 4.

Результати проведених експериментів щодо впливу нових похідних алкоксиамінопропанолу на процес плівкоутворення синьогнійної палич-

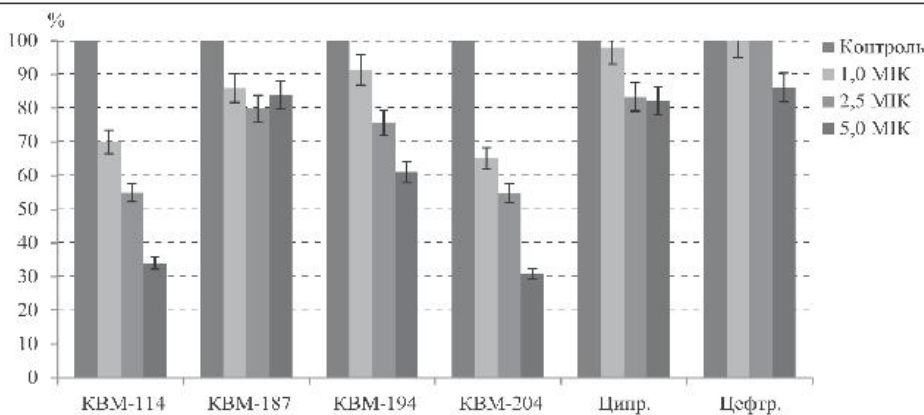


Рис. 3. Формування біоплівки *K. pneumoniae* (% відносно контролю) у присутності похідних алкоксиамінопропанолу.

Примітка: Ципр. – Ципрофлоксацин, Цефтр. – Цефтріаксон.

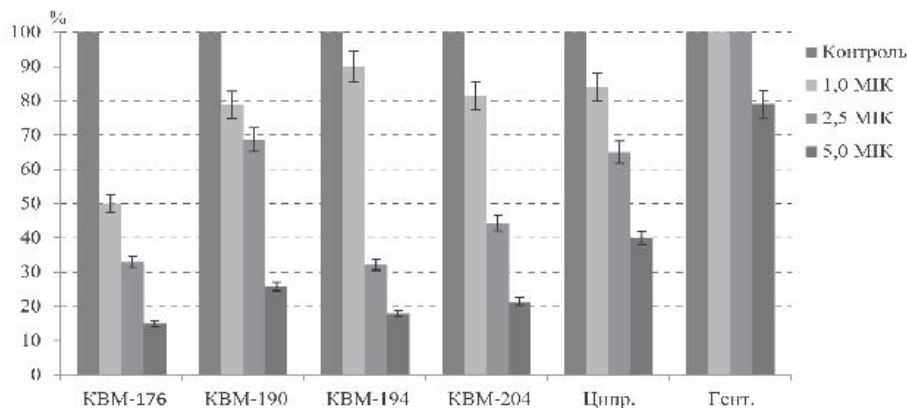


Рис. 4. Формування біоплівки *P. aeruginosa* (% відносно контролю) у присутності похідних алкоксиамінопропанолу.

Примітка: Ципр. – Ципрофлоксацин, Гент. – Гентаміцин.

ки (рис. 4) показали, що *P. aeruginosa* виявила чутливість до дії всіх досліджуваних сполук. Ступінь вираженості ефекту залежить від сполуки, її концентрації та знаходиться в межах 10,0–85,0 %.

Найвиразніша дія зареєстрована в сполук КВМ-194 та КВМ-176. У концентрації 1,0 МІК інгібіція плівкоутворення складала 10,0 % (КВМ-194) та 50,0 % (КВМ-176), у концентрації 2,5 МІК – 67,8 % та 67,0 % відповідно. При концентрації 5,0 МІК відсоток пригнічення для сполуки КВМ-176 становив 85,0 %, для КВМ-194 – 82,0 % порівняно з контролем.

Інгібуєчий ефект сполук КВМ-190 та КВМ-204 складав при концентрації 1,0 МІК 21,2 та 18,6 % відповідно, при 2,5 МІК – 31,3 та 55,6 % відповідно, при 5,0 МІК – 74,1 та 78,6 % відповідно.

Препарати порівняння не виявили виразної активності відносно біоплівки *P. aeruginosa* 46. Гентаміцин у концентраціях 1,0 МІК та 2,5 МІК не має інгібуєчого ефекту, у концентрації 5,0 МІК інгібіція складала 21,0 %. Інгібуєчий

ефект Ципрофлоксацину в концентрації 1,0 МІК – 16,0 %, при 2,5 МІК – 35,0 %, при 5,0 МІК – 60,0 % порівняно з контролем.

Отримані дані свідчать, що вперше синтезовані похідні алкоксіамінопропанолу дозозалежно впливають на формування біоплівки *P. aeruginosa*, найвиразнішу дію на процес плівкоутворення синьогнійної палички здійснює сполука КВМ-176.

Висновок

Уперше синтезовані похідні алкоксіамінопропанолу дозозалежно впливають на формування біоплівки грамнегативних бактерій. Найвиразніше попереджує формування біоплівки *E. coli* та *K. pneumoniae* сполука КВМ-114, біоплівки *P. aeruginosa* – КВМ-176. Відносно *K. pneumoniae* виразна активність зареєстрована й у сполуки КВМ-204. За ступенем вираженості інгібуєчого ефекту вперше синтезовані похідні алкоксіамінопропанолу перевершують препарати порівняння – Ципрофлоксацин, Цефтріаксон та Гентаміцин.

1. Семенов В. М., Дмитриченко Т. И., Жильцов И. В. // Мед. новости.– 2004.– № 2.– С. 10–17.
2. Антибактериальная терапия / Под ред. Л. С. Страчунского, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова.– М.: Полимаг, 2000.– 190 с.
3. Навашин С. М., Сазыкин Ю. С. // Антибиотики и химиотерапия.– 1998.– № 6.– С. 3–6.
4. Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985–1987 and 1995–1998 in Barcelona / Prats G., Mirelis B., Lvovet T. [et al] // Antimicrob. Agents Chemother.– 2000.– № 44 (5).– P. 1140–1145.
5. Сидоренко С. В. Инфекции, вызываемые микроорганизмами семейства Enterobacteriaceae / Сидоренко С. В. // Клинич. антибиотикотерапия.– 2003.– № 1.– С. 5–10.
6. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л. С. Страчунского, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова.– Смоленск: МАКМАХ – 2007.– 464 с.
7. Costerton J. W. Bacterial biofilms in nature and disease / Costerton J. W., Geesey G. G., Cheng K.-J. [et al.] // An. Rev. Microbiol.– 1987.– V. 41 – P. 435–464.
8. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Ильина Т. С., Романова Ю. М., Гинцбург А. Л. // Генетика.– 2004.– Т. 40, № 11.– С. 1445–1456.
9. 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.
10. Вплив комплексу мезо-тетра(4-N-метил-піридил) порфірину з вісмутом на ріст та формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 / Галкін М. Б., Жиліна З. І., Ішков Ю. В., [та ін.] // Микробиологія і біотехнологія.– 2008.– № 1 (2).– С. 86–91.
11. Рафальский В. В. Особенности выбора антимикробной терапии при осложненных инфекциях мочевыводящих путей / Рафальский В. В. // Consillium medicum.– 2004.– Т. 6, № 7.– С. 75–79.
12. Costerton J. W. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection / Costerton J. W. // Trends Microbiol.– 2001.– V. 9, № 2 – P. 50–52.
13. Биопленки возбудителей уроинфекций и использование фторхинолонов / Тец В. В., Артеменко Н. К., Заславская Н. В., Тец Г. В. // Consillium medicum.– 2008.– Т. 10, № 4.– С. 7–11.
14. Davies D. Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents / Davies D. // Nat. Rev. Drug Discov.– 2003.– V. 2. № 2 – P. 114–122.
15. Donlan R. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / Donlan R.M., Costerton J. W. // Clinical Microbiology.– 2002.– V. 15, № 2.– P. 167–193.
16. Wolcott R. D. Biofilms and chronic infections / Wolcott R.D., Ehrlich G.D. // JAMA.– 2008.– V. 299, № 22 – P. 2682–2684.

-
-
17. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease / Lewis K. // Nat. Rev. Microbiol.– 2007.– V. 5, № 1 – P. 48–56.
 18. Влияние природных гипополидеических соединений на формирование биопленок штаммами рода *Pseudomonas* / Пужевская Т. О., Бибилова М. В., Грамматикова Н. Э. [и др.] // Антибиотики и химиотерапия (Москва).– 2009.– Т. 54, № 1–2 – С. 10–13.
 19. Белобородова Н. В. Роль микробных сообществ или биопленок в кардиохирургии / Белобородова Н. В., Байрамов И. Т. // Антибиотики и химиотерапия.– 2008.– Т. 53, № 11–12.– С. 44–59.
 20. Рекомендации по оптимизации антимикробной терапии нозокомиальных инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями в отделениях реанимации и интенсивной терапии (Пособие для врачей) / Страчунский Л. С., Решедько Г. К., Рябкова Е. Л. [и др.] // Клини. Микробиол. Антимикроб. Химиотер.– 2002.– Т. 4, № 4.– С. 379–390.
 21. Электронно-микроскопическое изучение биопленок, образуемых бактериями *Burkholderia seracida* / Смирнова Т. А., Диденко Л. В., Андреева А. Л. [и др.] // Микробиология.– 2008.– Т. 77, № 1.– С. 63–70.
 22. Watnick P. Biofilm, city of microbes / Watnick P., Kolter R. // Journal of Bacteriology.– 2000.– V. 182, № 10.– P. 2675–2679.
 23. Costerton J. W. Microbial biofilms / Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E. // An. Rev. Microbiol.– 1995.– V. 49.– P. 711–745.
 24. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам [Методические указания МУК 4.2.18–90–04] // Клини. Микроб. Антимикроб. Химиотер.– 2004.– Т. 6, № 4.– С.306–359.

З. С. Суворова

Влияние производных алкоксаминопропанола на формирование биопленок грамотрицательными бактериями

Изучено влияние новых производных алкоксаминопропанола на формирование биопленок *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*. Установлено, что новые производные алкоксаминопропанола KBM-114, KBM-204 и KBM-176 дозозависимо нарушают процесс пленкообразования грамотрицательными бактериями, превышая активность Ципрофлоксацина, Цефтриаксона и Гентамицина.

Ключевые слова: биопленки, микроорганизмы, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, производные алкоксаминопропанола, антибиотики

Z. S. Suvorova

Influence of derivatives of alkoxsaminopropanol on the biofilms formation by gram-negative bacteria

It has been studied influence of the novel derivatives of alkoxsaminopropanol on the biofilms formation by *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. It was found that novel derivatives of alkoxsaminopropanol KBM-114, KBM-204 and KBM-176 dose-dependently disrupt the biofilms formation by gram-negative bacteria and exceed the activity of Ciprofloxacin, Ceftriaxone and Gentamicin.

Key words: biofilms, microorganisms, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, derivatives of alkoxsaminopropanol, antibiotic

Надійшла: 14.10.2012 р.

Контактна особа: Суворова Зінаїда Сергіївна, інженер, відділ фармакології протимікробних засобів, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», вул. Єжена Потьє, 14, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 (044) 456-83-32. Електронна пошта: suzi-220@bigmir.net, suvorovazina@gmail.com