

7universum.com
UNIVERSUM:

МЕДИЦИНА И ФАРМАКОЛОГИЯ

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ БИОПЛЕНОК *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
К ДЕЙСТВИЮ ПРОИЗВОДНЫХ
АРИЛАЛИФАТИЧЕСКИХ АМИНОСПИРТОВ**

Дронова Мария Леонидовна

*аспирант отдела фармакологии противомикробных средств
Государственного учреждения «Институт фармакологии и токсикологии
Национальной академии медицинских наук Украины»,
Украина, г. Киев
E-mail: ml.dronova@gmail.com*

**SUSCEPTIBILITY OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BIOFILMS
TO ARYLALIPHATIC AMINOALCOHOLS**

Dronova Maria

*postgraduate student, department of pharmacology of antimicrobial agents,
State institution «Institute of pharmacology and toxicology
of National academy of medical sciences of Ukraine»,
Ukraine, Kiev*

АННОТАЦИЯ

Впервые синтезированные производные арилалифатических аминоспиртов проявляют выраженную активность по отношению к биопленкам золотистого стафилококка. Соединения способны как разрушать сформированную молодую биопленку, так и препятствовать её образованию. По степени ингибирующего эффекта производные арилалифатических аминоспиртов имеют преимущества перед препаратом сравнения цефтриаксоном и не уступают ципрофлоксацину.

ABSTRACT

The novel derivatives of arylaliphatic aminoalcohols exhibit significant activity against *Staphylococcus aureus* biofilms. Compounds are able to destroy young biofilm and prevent its formation. The derivatives of arylaliphatic aminoalcohols

possess more pronounced activity than ceftriaxone and equal or higher activity comparatively to ciprofloxacin.

Ключевые слова: биопленки, *Staphylococcus aureus*, арилалифатические аминоспирты.

Keywords: biofilms, *Staphylococcus aureus*, arylaliphatic aminoalcohols.

Основной формой существования микроорганизмов в естественных условиях является биопленка — связанное с поверхностью сообщество клеток. Это образование имеет сложную структуру и характеризуется наличием полимерного матрикса, генетическим полиморфизмом клеток и их взаимодействием между собой с помощью специфических и неспецифических механизмов коммуникации. Биопленки способны формироваться на поверхности имплантов, эндотрахеальных трубок, катетеров, контактных линз и т. д.; их обнаруживают в более чем 80 % случаев хронических заболеваний [3]. К патологиям, которые связывают с образованием биопленок, относят периодонтиты, хронические отиты, риносинуситы, а также такие опасные для жизни состояния, как гнойный перитонит, плеврит, септицемию, эндокардит, менингит и др. [2; 13].

Особенно опасными биопленочные формы бактерий считают по причине их повышенной устойчивости к действию факторов защиты организма, а также к действию антибиотиков и дезинфектантов [3; 7]. Так, чувствительность биопленок *S. aureus* к ванкомицину в 200 раз ниже по сравнению с планктонными формами [11], чувствительность *P. aeruginosa* к тобрамицину снижается в 125 раз [16].

Одним из методов лечения пациентов с биопленочными инфекциями является механическое удаление зараженных изделий медицинского назначения или поврежденных тканей. Однако повторная постановка новых имплантов в некоторых случаях связана с определенными трудностями, например, необходимостью выбора иного места доступа, поскольку

при использовании предыдущего риск повторной колонизации достаточно высок [1; 6]. Кроме того, во многих случаях хирургическое удаление биопленки из организма больного невозможно.

В настоящее время не существует ни одного препарата, рекомендованного при заболеваниях, вызванных биопленочными формами бактерий. Тяжесть и длительность воспалительного процесса, отсутствие средств, активных в отношении таких форм микроорганизмов требует поиска путей для решения проблемы, один из которых — использование лекарственных препаратов, влияющих как на различные этапы развития биопленки, так и на уже сформированную биопленку. В настоящее время ведется активный поиск таких средств среди различных фармакологических групп: блокаторов эффлюксных помп, муколитических средств, антибиотиков и их комбинаций, ферментных препаратов и др. Так, в качестве потенциальных антибиопленочных средств исследуются фосфомицин, рифампицин [14], мупироцин, комбинация бета-лактамов с гликопептидами / липопептидами [9], N-ацетилцистеин [8], а также соединения новых классов — бактериоцины [17], скиламицины [15], нитроксиды [10], фураноны [12] и др.

Заслуживают внимания также новые производные арилалифатических аминоспиртов, которые в экспериментах *in vitro* проявили выраженные антимикробные свойства в отношении планктонных форм бактерий. Целью представленной работы было изучить чувствительность биопленочных форм микроорганизмов к действию впервые синтезированных соединений.

Материалы и методы

Эксперименты проведены с использованием клинического штамма *S. aureus* 042012, чувствительного к действию гентамицина, тобрамицина, амикацина, левофлоксацина, меропенема, клиндамицина, цефтазидима и хлорамфеникола.

Антибактериальное действие производных арилалифатических аминоспиртов по отношению к планктонной форме *S. aureus* определяли методом серийных разведений и оценивали по показателю минимальной ингибирующей

концентрации (МИК) [4]. Плотность инокулята составляла 10^5 КОЕ/мл питательной среды. Эксперименты проведены с использованием бульона Мюллера-Хинтон.

Способность производных арилалифатических аминоспиртов влиять на процесс формирования биопленки исследовали на 1-суточной культуре бактерий, разрушать сформированные биопленки — на 3-суточной культуре микроорганизмов. Исследования проведены в полистироловых планшетах для иммуноферментного анализа [5]. Для исследования влияния соединений на пленкообразование, их растворы вносили одновременно с суспензией бактерий, на сформированные биопленки — через 72 ч после внесения культуры микроорганизмов. Плотность инокулята составляла 10^7 КОЕ/мл питательной среды. После добавления соединений планшеты выдерживали при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. После окончания срока инкубации вносили 0,1 % раствор генцианвиолета на 45 мин, затем промывали лунки дистиллированной водой и осуществляли экстракцию красителя 96,0 % этанолом. Измерения оптической плотности проводили на автоматическом фотометре для микропланшет ELx×800 (BioТек®, США). Контролем служила культура золотистого стафилококка, выращенная при тех же условиях, без добавления соединений и препаратов сравнения.

Производные арилалифатических аминоспиртов синтезированы в Институте органической химии канд. фарм. наук Ю.В. Коротким. Препаратами сравнения в исследованиях служили «Ципрофлоксацин» производства ЗАО ФФ «Дарница» (Украина) и «Цефтриаксон» производства «Борисовского завода медицинских препаратов» (Российская Федерация).

Для исследования антибиопленочной активности на модели инфицированного катетера использовали 3-суточную культуру *S. aureus*. Эксперименты проведены на урогенитальных катетерах из поливинилхлоридного материала типа Нелатон, размер 16 Fr (Jiangsu Suyun Medical Materials Co., КНР).

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью компьютерной программы «Statistica 6.0». Для оценки достоверности различий использовали критерий Даннета.

Работа выполнена под руководством д-ра мед. наук, зав. отделом фармакологии противомикробных средств ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины» Н.А. Врынчану

Результаты и их обсуждение

Проведенными экспериментами установлено, что МИК соединений КВМ-194, КВМ-204, КВМ-261, КВМ-262 и КВМ-263 в отношении планктонной культуры *S. aureus* 042012 составляет 10,0 мкг/мл. Поскольку значительное количество инфекционных заболеваний связано именно с образованием биопленок, показатель МИК относительно планктонных микроорганизмов не в полной мере характеризует перспективность применения препарата в клинической практике. Поэтому на следующем этапе мы исследовали влияние соединений на пленкообразование.

При изучении влияния производных арилаллифатических аминоспиртов на образование биопленки *S. aureus* соединения использовали концентрации 1,0 МИК, 2,5 МИК и 5,0 МИК.

Полученные результаты приведены на рис. 1.

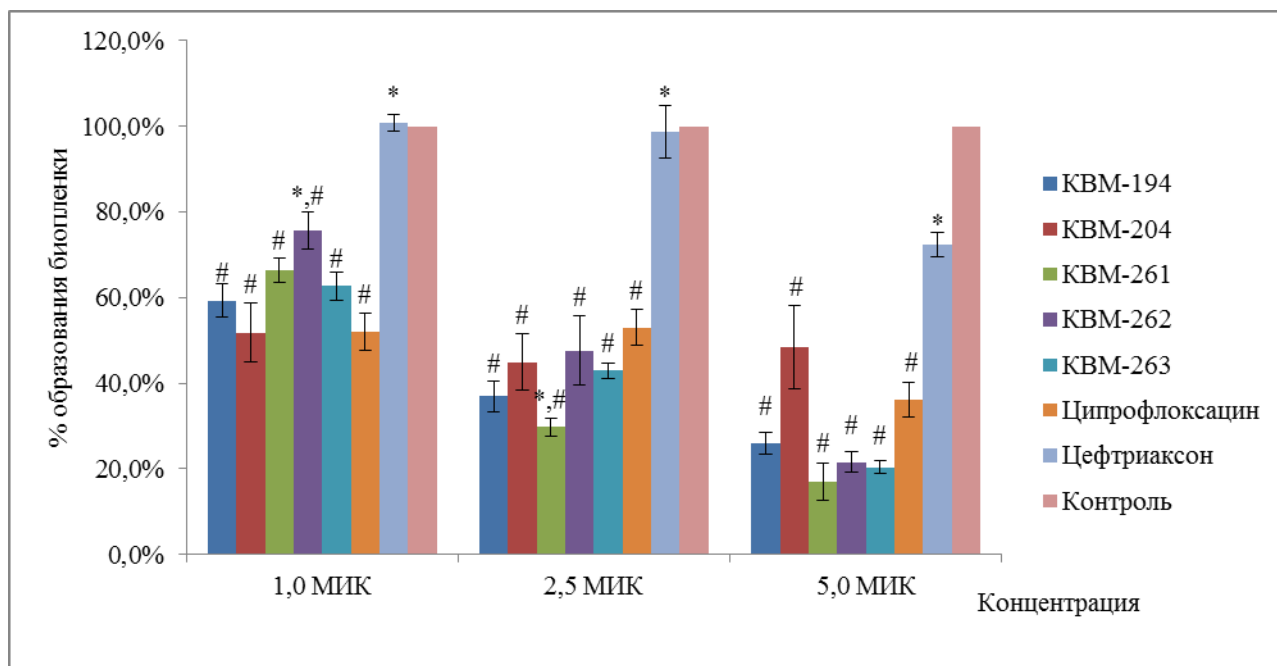


Рисунок 1. Формирование биопленки *S. aureus* 042012 в присутствии производных арилалифатических аминоспиртов (% образования).

Примечания:

* — $P < 0,05$ по отношению к ципрофлоксацину;

— $P < 0,05$ по отношению к цефтриаксону.

Данные рис. 1 свидетельствуют, что соединения КВМ-194, КВМ-204, КВМ-261, КВМ-262 и КВМ-263 проявляют активность по отношению к биопленкам золотистого стафилококка, степень угнетения пленкообразования зависит от концентраций исследуемых веществ. Так, в концентрации 1,0 МИК нарушение процесса образования биопленки *S. aureus* в большей степени наблюдается при действии соединений КВМ-194 и КВМ-204, угнетение пленкообразования составляет 40,7 % и 48,1%, соответственно (относительно контроля). В концентрации 2,5 МИК наиболее выраженный ингибирующий эффект зарегистрирован при действии соединений КВМ-194 и КВМ-261 — 63,0 % и 70,2 % соответственно. При действии производных арилалифатических аминоспиртов в концентрации 5,0 МИК ингибирующее действие соединений КВМ-194, КВМ-261, КВМ-262 и КВМ-263 составляло 73,9 %, 83,0 %, 78,4 % и 79,6% соответственно. По степени проявления эффекта все протестированные соединения имеют преимущества перед препаратом сравнения цефтриаксоном и не уступают ципрофлоксацину.

Известно, что сформированные биопленки являются значительно менее чувствительными к действию антимикробных веществ, поэтому в дальнейших экспериментах по изучению влияния производных арилалифатических аминоспиртов на сформированную (3-суточную) биопленку использовали более высокие концентрации соединений (10,0 МИК, 25,0 МИК и 50,0 МИК).

Полученные результаты исследований приведены на рис. 2.

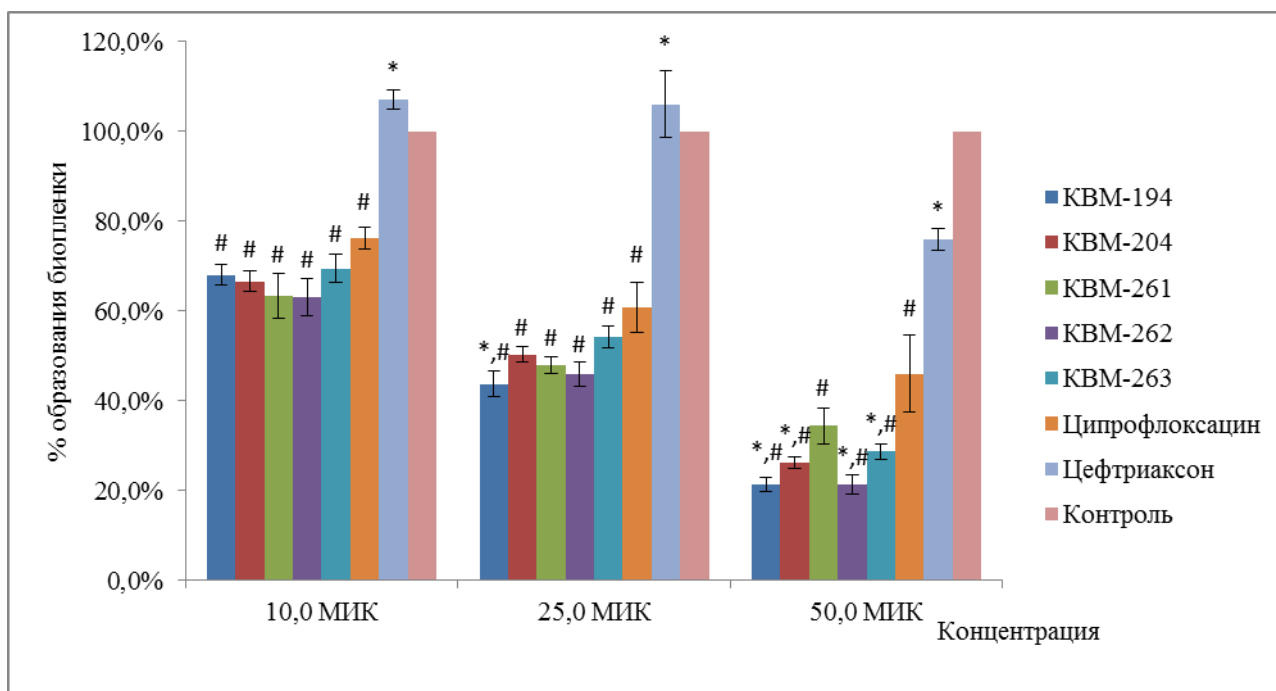


Рисунок 2. Чувствительность биопленки *S. aureus* к действию производных арилалифатических аминоспиртов (% образования биопленки)

Примечания:

* — $P < 0,05$ по отношению к ципрофлоксацину;

— $P < 0,05$ по отношению к цефтриаксону.

Результаты проведенных экспериментов по влиянию новых производных арилалифатических аминоспиртов на сформированную молодую биопленку золотистого стафилококка показали, что *S. aureus* проявляет чувствительность к действию всех исследуемых соединений (рис. 2). Ингибирующий эффект изученных веществ при концентрации 10,0 МИК составляет 31,9—37,0 % (в зависимости от соединения). Все изученные вещества имеют преимущества перед препаратом сравнения цефтриаксоном и не уступают ципрофлоксацину.

Наиболее активным соединением при действии в концентрации 25,0 МИК является КВМ-194, степень разрушения биопленки — 56,3 %. Ингибирующий эффект КВМ-194 статистически достоверно превышает действие препаратов сравнения.

Ингибирующее действие производных арилалифатических аминоспиртов наиболее отчетливо проявляется при концентрации 50,0 МИК, антибиопленочная активность соединений КВМ-194, КВМ-204, КВМ-262, КВМ-263 близка и составляет 78,7 %, 73,8 %, 78,7 %, 71,3 % соответственно. Все изученные соединения имеют преимущества перед препаратами сравнения.

Таким образом, исследование влияния впервые синтезированных производных арилалифатических аминоспиртов на биопленки *S. aureus* показало, что соединения способны дозозависимо нарушать пленкообразование и разрушать сформированную молодую биопленку. Наиболее выраженное ингибирующее действие обнаружено у соединения КВМ-194, которое и было выбрано для дальнейших углубленных исследований.

Для оценки перспективности создания на основе соединения КВМ-194 нового антимикробного средства мы провели исследования ингибирующего действия вещества на модели инфицированного *S. aureus* катетера. Специфическую антимикробную активность КВМ-194 изучали в концентрациях 1,0 МИК, 5,0 МИК и 10,0 МИК.

Полученные результаты приведены на рис. 3.

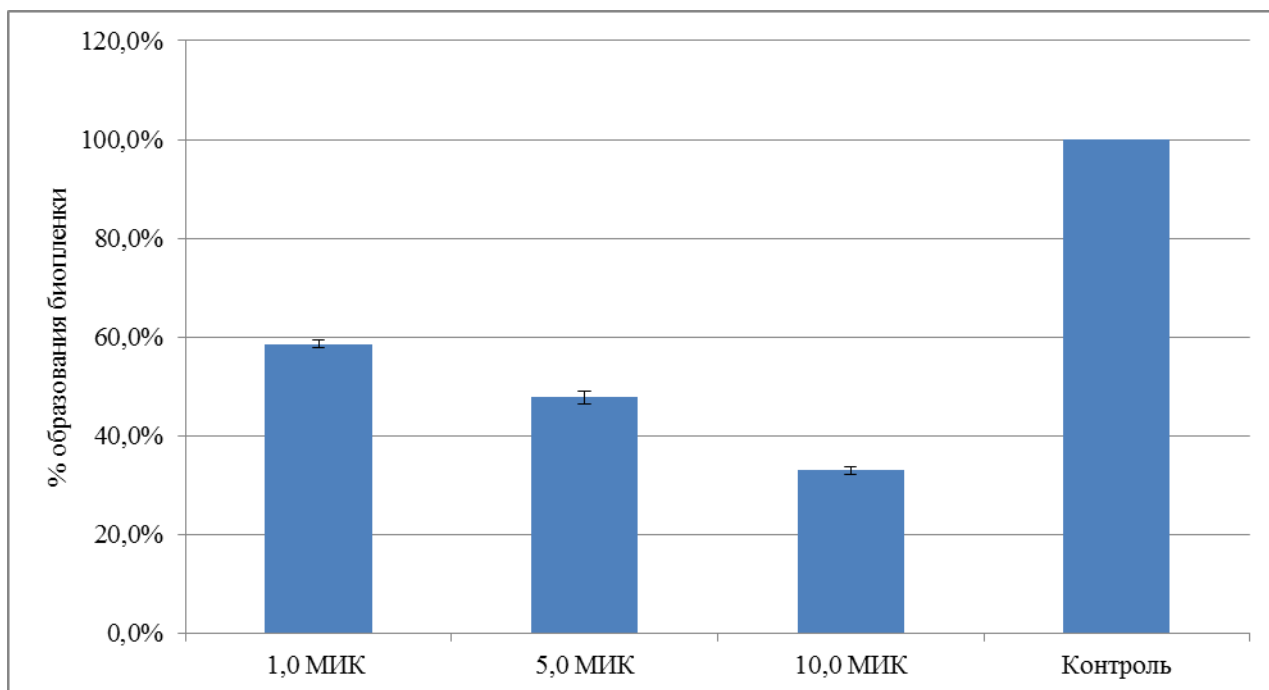


Рисунок 3. Чувствительность биопленки *S. aureus* к действию KBM-194 на модели инфицированного катетера (% образования биопленки)

Данные рис. 3 свидетельствуют, что активность соединения KBM-194 по отношению к 3-суточным биопленкам *S. aureus*, сформированным на катетере из поливинилхлоридного материала, наиболее выражена при действии в концентрации 10,0 МИК — степень разрушения биопленки составляет 67,0 %. При снижении концентрации до 5,0 МИК и 1,0 МИК ингибирующее действие вещества уменьшается, степень разрушения составляет 52,2 % и 41,5 % соответственно.

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что впервые синтезированные производные арилалифатических аминоспиртов проявляют активность по отношению к золотистому стафилококку, ингибируют рост и размножение как планктонных микроорганизмов, так и бактерий в форме биопленок. Установлено, что арилалифатические аминоспирты способны влиять на процесс пленкообразования и разрушать уже сформированные биопленки *S. aureus*. К действию новых соединений более чувствительны микроорганизмы, которые находятся на стадии формирования биопленки, что свидетельствует о профилактической направленности действия и перспективности создания препаратов для предупреждения

пленкообразования. При воздействии в высоких концентрациях впервые синтезированные производные арилалифатических аминоспиртов имеют преимущества перед препаратами сравнения цефтриаксоном и ципрофлоксацином.

Список литературы:

1. Бережанский Б.В., Жевнерев А.А. Катетер-ассоциированные инфекции кровотока // Клинический микробиологический журнал. — 2006. — Т. 8, № 2. — С. 130—144.
2. Голуб А.В. Бактериальные биопленки — новая цель терапии? // Клинический микробиологический журнал. — 2012. — Т. 14, № 1. — С. 23—29.
3. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биопленки и инфекции // Журнал инфектологии. — 2010. — Т. 2, № 3. — С. 4—15.
4. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам [Методические указания МУК 4.2.18-90-04] // Клинический микробиологический журнал. — 2004. — Т. 6, № 4. — С. 306—359.
5. Романова Ю.М. Образование биопленок — пример социального поведения бактерий // Микробиология. — 2006. — Т. 75, № 4. — С. 556—661.
6. Сидоренко С.В. Инфекции, связанные с центральным венозным катетером // Инфекции и антимикробная химиотерапия. — 2001. — Т. 3, № 2. — С. 47—49.
7. Чеботарь И.В. Антибиотикорезистентность биоплёночных бактерий // Клинический микробиологический журнал. — 2012. — Т. 14, № 1. — С. 51—58.
8. Чернявский В.И. Бактериальные биопленки и инфекции (лекция) // Annals of Mechnikov Institute. — 2013. — № 1. — С. 86—90.
9. Barber K.E., Werth B.J., McRoberts J.P. et al. 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. — Vol. 58, № 5. — P. 2989—2992.

10. De la Fuente-Núñez C. Effect of Nitroxides on Swarming Motility and Biofilm Formation, Multicellular Behaviors in *Pseudomonas aeruginosa* // Antimicrob. Agents Chemother. — 2013. — Vol. 57, № 10. — P. 4877—4877.
11. Jefferson K.K., Goldmann D.A., Gerald B. Use of Confocal Microscopy To Analyze the Rate of Vancomycin Penetration through *Staphylococcus aureus* Biofilms // Antimicrob. Agents Chemother. — 2005. — Vol. 49, № 6. — P. 2467—2473.
12. Kuehl R. Furanone at Subinhibitory Concentrations Enhances Staphylococcal Biofilm Formation by luxS Repression // Antimicrob. Agents Chemother. — 2009. — Vol. 53, № 10. — P. 4159—4166.
13. Lin M.-H. Inhibitory Effects of 1,2,3,4,6-Penta-*O*-Galloyl- β -d-Glucopyranose on Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* // Antimicrob. Agents Chemother. — 2011. — Vol. 55, № 3. — P. 1021—1027.
14. Mihailescu R. High Activity of Fosfomycin and Rifampin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm In Vitro and in an Experimental Foreign-Body Infection Model // Antimicrob. Agents Chemother. — 2014. — Vol. 58, № 5. — P. 2547—2553.
15. 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* // Antimicrob. Agents Chemother. — 2014. — Vol. 58, № 2. — P. 1092—1099.
16. Nickel J.C., Ruseska I., Wright J.B. et al. Tobramycin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Cells Growing as a Biofilm on Urinary Catheter Material // Antimicrob. Agents Chemother. — 1985. — Vol. 27, № 4. — P. 619—624.
17. Okuda K. Effects of Bacteriocins on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm // Antimicrob. Agents Chemother. — 2013. — Vol. 57, № 11. — P. 5572—5579.

References:

1. Berezanskii B.V., Zhevnerov A.A. Catheter-related bloodstream infections. *Klin. mikrobiol. antimikrob. khimioter.* [Clinical microbiology of antimicrobial chemotherapy], 2006, vol. 8, no. 2, pp. 130—144 (In Russian).
2. Golub A.V. Bacterial biofilms - a new target therapy? *Klin. mikrobiol. antimikrob. khimioter.* [Clinical microbiology of antimicrobial chemotherapy], 2012, vol. 14, no. 1, pp. 23—29 (In Russian).
3. Gostev V.V., Sidorenko S.V. Bacterial biofilm formation and infections. *Zhurnal infektologii.* [Journal of infectology], 2010, vol. 2, no. 3, pp. 4—15 (In Russian).
4. Determination of the sensitivity of microorganisms to antibiotics [Guidelines of MUK 4.2.18-90-04], *Klin. mikrobiol. antimikrob. khimioter.* [Clinical microbiology of antimicrobial chemotherapy], 2004, vol. 6, no. 4, pp. 306—359 (In Russian).
5. Romanova Iu.M. The formation of biofilms - the example of social behavior of bacteria. *Mikrobiologiya.* [Microbiology], 2006, vol. 75, no. 4, pp. 556—661 (In Russian).
6. Sidorenko S.V. Infections associated with central venous catheter. *Infektsii i antimikrob. khimioter.* [Infections and antimicrobial chemotherapy], 2001, vol. 3, no. 2, pp. 47—49 (In Russian).
7. Chebotar' I.V. Antibiotic resistance of membrane bio bacteria. *Klin. mikrobiol. Antimikrob. khimioter.* [Clinical microbiology of antimicrobial chemotherapy], 2012, vol. 14, no. 1, pp. 51—58 (In Russian).
8. Cherniavskii V.I. Bacterial biofilms and infections (lecture). *Annals of Mechnikov Institute.* [Annals of Mechnikov Institute], 2013, no. 1, pp. 86—90 (In Russian).
9. Barber K.E., Werth B.J., McRoberts J.P. 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, vol. 58, no. 5, pp. 2989—2992.

10. De la Fuente-Núñez C. Effect of Nitroxides on Swarming Motility and Biofilm Formation, Multicellular Behaviors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, vol. 57, no. 10, pp. 4877—4877.
11. Jefferson K.K., Goldmann D.A., Gerald B. Use of Confocal Microscopy To Analyze the Rate of Vancomycin Penetration through *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, no. 6, pp. 2467—2473.
12. Kuehl R. Furanone at Subinhibitory Concentrations Enhances Staphylococcal Biofilm Formation by luxS Repression. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, vol. 53, no. 10, pp. 4159—4166.
13. Lin M.-H. Inhibitory Effects of 1,2,3,4,6-Penta-*O*-Galloyl- β -d-Glucopyranose on Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, vol. 55, no. 3, pp. 1021—1027.
14. Mihailescu R. High Activity of Fosfomycin and Rifampin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm In Vitro and in an Experimental Foreign-Body Infection Model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, vol. 58, no. 5, pp. 2547—2553.
15. 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*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, vol. 58, no. 2, pp. 1092—1099.
16. Nickel J.C., Ruseska I., Wright J.B. Tobramycin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Cells Growing as a Biofilm on Urinary Catheter Material. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1985, vol. 27, no. 4, pp. 619—624.
17. Okuda K. Effects of Bacteriocins on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, vol. 57, no. 11, pp. 5572—5579.