

СПЕКТР ТА РІВНІ ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ МОДИФІКОВАНИХ АМІНОКИСЛОТ

Осолодченко Т. П., Андрєєва І. Д., Завада Н. П.,
Рябова І. С., Волянський А.Ю.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І.
Мечникова Національної академії медичних наук
України»

Антибіотикорезистентність зростає до загрозливо високих рівнів у всьому світі і ставить під загрозу ефективну профілактику і лікування зростаючого числа інфекцій. Хоча в даний час ведеться розробка нових антибіотиків, жоден з них, як очікується, не буде ефективний проти найбільш небезпечних форм бактерій із стійкістю до антибіотиків [1, 2]. У 2015 р. Всесвітня асамблея охорони здоров'я затвердила Глобальний план дій щодо стійкості до протимікробних препаратів, який спрямований на забезпечення профілактики та лікування інфекційних хвороб за допомогою безпечних та ефективних ліків [3]. Пошук серед природних та синтетичних біологічно-активних речовин, які впливають на формування резистентності мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів клінічно-значущих штамів набуває все більшої актуальності [4]. Все частіше фахівці звертаються до природних засобів лікування, зокрема до біоструктурних речовин організму з активним та різноманітним впливом.

Мета роботи – мікробіологічне обґрунтування нових протимікробних засобів на основі модифікованих варіантів амінокислот.

Матеріали та методи

Досліджено ступень та рівні протимікробної активності 10 найбільш активних за результатами первинного скринінгового дослідження синтетичних похідних амінокислот [5]. Усі речовини були синтезовані та охарактеризовані на кафедрі фармакогнозії (завідувач Кошовий О. М.) Національного фармацевтичного університету МОЗ України. Серед обраних сполук було 5 похідних лізину – 6.1; 6.1.1; 6.1.2; 6.3; 6.6 та 5 похідні аргініну – 7.1.3; 7.1.5; 7.1.6; 7.1.7; 7.1.11. Дослідження спектру та рівнів протимікробної дії перспективних речовин виконано на 40 музейних та клінічних штамів мікроорганізмів, серед них 17 – грамположитивних, 13 штамів грамнегативних бактерій і 10 штамів грибів роду *Candida*. Для тестування протимікробної активності використанні грамположитивні палички, що утворюють спори – 2 штами *Bacillus spp.* та грамположитивні коки – штам *S. pneumonia* ATCC 49619 і 14 штамів *Staphylococcus spp.* Із грамнегативних бактерій в досліді використані: представник роду *Pseudomonas* (тест-штам *P. aeruginosa* ATCC 27853) та факультативно анаеробні грамнегативні палички різних родів родини *Enterobacteriaceae*, а саме: *E. coli* - 1 штам, *S. enteritidis* – 1 штам, *Shigella spp.* – 2 штами, *K. pneumoniae* – 1 штам, *E. aerogenes* – 1 штам, *P. vulgaris* – 2 штами, *R. aquatilis* – 4 штами. Визначено

активність 3 речовин, які виявили помірну протигрибкову дію за результатами первинного мікробіологічного скринінгу, а саме похідних лізину 6.1 та аргініну 7.1.5 та 7.1.11 щодо 10 музейних штамів грибів роду *Candida*, а саме *C. albicans* – 3 штами, *C. pseudotropicalis* – 1 штам, *C. kefyr* – 1 штам, *C. famata* – 1 штам, *C. rugosa* – 1 штам, *C. catenulata* – 1 штам, *C. parapsilosis* – 1 штам. Усі культури мікроорганізмів було одержано з лабораторії медичної мікробіології з Музеєм мікроорганізмів ДУ «ІМІ ім. І. І. Мечникова АМН України». Середовища для культивування застосовували відповідно до виду мікроорганізмів згідно з існуючими методичними розробками і рекомендаціями. Визначення протимікробної та протигрибкової дії нових сполук проводили стандартним методом двократних серійних розведень у поживному бульйоні (макрометод). Тестування проводилось в об'ємі 1 мл кожного розведення речовин з кінцевою концентрацією досліджуваного мікроорганізму приблизно 5×10^5 КУО/мл. Після інкубації протягом доби або 48-72 годин для культур *Candida spp.*, пробірки з посівами переглядали у промінному світлі для визначення наявності росту мікроорганізму. Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) встановлювалась за найменшою концентрацією досліджуваної речовини, яка пригнічувала видимий ріст культури. Для визначення мінімальної бактерицидної концентрації (МБ_нК) виконували дозовані висіви на тверде поживне середовище (агар Мюллер-Хінтона) культуральної рідини з усіх пробірок, у яких не спостерігали росту мікроорганізму. За МБ_нК вважали найнижчу концентрацію, яка викликала загибель не менше 99,9% бактерій. При постановці дослідів додатково проводили контролю росту культури в середовищі без досліджуваних речовин, у розчиннику; контролі чистоти суспензії мікроорганізму (шляхом висіву на неселективні середовища) та стерильності середовища. У якості порівняння взяті природні амінокислоти лізін та аргінін. Експерименти проведені у трьох повторях з метою одержання достовірних результатів. Статистична обробка отриманих даних проведена із використанням Excel (MS Office 2010, XP) та програми STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc., США) з визначенням медіани (*Me*) та вірогідності розбіжностей (*p*) показників груп.

Результати та обговорення

Визначено протимікробну активність 8 відібраних синтетичних похідних амінокислот, а саме: похідних лізину сполук 6.1, 6.1.1, 6.1.2 та похідних аргініну 7.1.3, 7.1.5, 7.1.6, 7.1.7, 7.1.11 щодо 17 штамів грамположитивних мікроорганізмів. Більшість досліджених сполук проявляли високу інгібуючу активність щодо штамів *Bacillus spp.* (МІК сполук у межах 3,9–15,6 мкг/мл), вищу за таку препаратів порівняння ($p < 0,05$) (таблиця 1). МБ_нК сполук знаходилась у межах 7,8–31,25 мкг/мл, що також здебільшого було вірогідно ($p < 0,05$) краще за показники контрольних препаратів. Найактивнішими були похідна лізину сполука 6.1 та похідна аргініну

сполука 7.1.5 ($p < 0,05$ по відношенню до природних амінокислот).
За результатами проведених досліджень було встановлено, що бактеріостатична дія речовин нового синтезу щодо *S. pneumonia* ATCC 49619 проявлялася у концентраціях 7,8–31,25 мкг/мл. Найактивнішими

щодо представника роду *Streptococcus* були похідна лізину 6.1 і похідна аргініну сполука 7.1.5, показники МІК та МБ_цК яких дорівнювали відповідно 7,8 мкг/мл та 15,6 мкг/мл.

Таблиця 1. Діапазони МІК модифікованих амінокислот щодо грампозитивних мікроорганізмів (мкг/мл)

Найменування штамів мікроорганізмів	Діапазони МІК модифікованих амінокислот (мкг/мл)	
	Похідні лізину	Похідні аргініну
<i>Bacillus spp.</i>	3,9–7,8	3,9–15,6
<i>S. pneumonia</i> ATCC 49619	7,8–31,25	7,8–31,25
<i>S. aureus</i>	3,9–31,25	3,9–31,25
Коагулазонегативні стафілококи	7,8–15,6	7,8–31,25

За результатами експериментів встановлена вища або співвідносна з відповідними природними амінокислотами активність модифікованих варіантів амінокислот щодо *Staphylococcus spp.* Інгібуючі концентрації досліджених речовин відносно штамів *S. aureus* знаходились у межах 3,9–31,25 мкг/мл.

Бактерицидні концентрації більшості речовин перевищували статичну на одне розведення і становили 7,8–62,5 мкг/мл. Серед досліджених сполук найактивнішою щодо *S. aureus* виявилась похідна аргініну 7.1.5, МІК якої щодо 90 % досліджених штамів знаходилася у межах 3,9–7,8 мкг/мл та МБ_цК – щодо усіх штамів *S. aureus* не перевищувала 15,6 мкг/мл ($p < 0,05$ відносно відповідних природних амінокислот). Близьку антистафілококову активність мала похідна лізину сполука 6.1.

Активність досліджених речовин щодо штамів коагулазонегативних стафілококів *S. epidermidis* та *S. haemolyticus* проявлялась у концентраціях 7,8 – 31,25 мкг/мл. Найвищу дію виявили похідна лізину сполука 6.1 і похідні аргініну сполуки 7.1.3 та 7.1.5, МІК та МБ_цК яких відповідно дорівнювали 7,8 мкг/мл та 15,6 мкг/мл ($p < 0,05$ у порівнянні з показниками природних амінокислот). Ступінь активності модифікованих амінокислот щодо метициліночутливих та метицилінорезистентних штамів *S. aureus* та коагулазонегативних стафілококів виявився практично однаковим та відповідав середнім показникам щодо *Staphylococcus spp.* взагалі. Отже, за результатами проведених досліджень встановлено, що синтезовані похідні лізину та аргініну володіють високою *in vitro* активністю щодо грампозитивних мікроорганізмів з показниками МІК у межах 3,9–31,25 мкг/мл. Серед досліджених речовин за ступенем їх впливу на грампозитивні мікроорганізми визначено найактивніші сполуки, а саме похідні лізину 6.1 та аргініну 7.1.5 (МІК та МБ_цК у межах 3,9–15,6 мкг/мл).

Досліджено протимікробну активність 4 найактивніших за результатами первинного мікробіологічного скринінгу модифікованих амінокислот – похідних лізину сполук 6.3, 6.6 та похідних аргініну сполук 7.1.5 та 7.1.6 щодо 13 штамів грамнегативних мікроорганізмів. В результаті

проведених досліджень було встановлено, що дія модифікованих амінокислот щодо штаму *P. aeruginosa* ATCC 27853 проявлялася у концентраціях 15,6–62,5 мкг/мл (таблиця 2). Серед усіх відібраних для поглибленого вивчення речовин найактивнішими виявились похідні лізину сполука 6.6 та аргініну сполука 7.1.6, які проявили достатньо високу активність щодо *P. aeruginosa* з МІК 15,6 мкг/мл та МБ_цК 31,25 мкг/мл, що достовірно ($p < 0,05$) перевищувало показники відповідних природних амінокислот.

Високо або помірно чутливою до модифікованих амінокислот була переважна більшість досліджених штамів ентеробактерій. За результатами проведених досліджень встановлено, що активність усіх досліджених модифікованих амінокислот була вірогідно ($p < 0,05$) вищою за природні амінокислоти щодо штаму *E.coli* ATCC 25922. МІК синтетичних похідних амінокислот щодо *E.coli* ATCC 25922 знаходилась у межах 7,8–15,6 мкг/мл, МБ_цК – 15,6–31,25 мкг/мл. Найактивнішими щодо тест-штаму *E.coli* виявились сполуки 6.3 та 7.1.5. Близькими за ступенем чутливості до модифікованих амінокислот виявились представники родів *Salmonella* та *Shigella*. Показники МІК синтезованих речовин щодо штамів *S. enteritidis* гр. P,Y/ratin №27, *S. flexneri* ДІСК 170 та *S. sonnei* ДІСК 5772 знаходились у діапазоні 15,6 – 31,25 мкг/мл. Бактерицидно на зазначені штамів ентеробактерій модифіковані амінокислоти діяли у концентрації 31,25 – 62,5 мкг/мл. Найактивнішими щодо представників родів *Salmonella* та *Shigella*, як і по відношенню до *E.coli*, виявились похідна лізину 6.3 та похідна аргініну 7.1.5 (МІК 15,6 мкг/мл та МБ_цК – 31,25 мкг/мл, $p < 0,05$ у порівнянні з показниками відповідних нативних амінокислот). Відносно інших досліджених представників родини *Enterobacteriaceae*, а саме *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris* та *R. aquatilis*, усі досліджені модифіковані амінокислоти проявили дещо меншу протимікробну активність. Показники МІК та МБ_цК досліджених речовин щодо штамів *E. aerogenes* 418 та *K. pneumoniae* K-7 NCTC 9127 знаходились у діапазоні 31,25 – 62,5 мкг/мл, причому жодна з досліджених нових речовин не

виявилась до зазначених тест-штамів активнішою за інші.

Таблиця 2. Діапазони МІК модифікованих амінокислот щодо грамнегативних мікроорганізмів (мкг/мл)

Найменування штамів мікроорганізмів	Діапазони МІК модифікованих амінокислот (мкг/мл)	
	Похідні лізину	Похідні аргініну
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	15,6–62,5	15,6–31,25
<i>E.coli</i> ATCC 25922	7,8–15,6	7,8
<i>S. enteritidis</i> гр. P,Y/ratin №27	15,6–31,25	15,6–31,25
<i>Shigella spp.</i>	15,6–31,25	15,6–31,25
<i>E. aerogenes</i> 418	31,25–62,5	31,25
<i>K. pneumoniae</i> K-7 NCTC 9127	31,25	31,25
<i>Proteus spp.</i>	62,5	31,25
<i>R.aquatillis</i>	31,25–62,5	31,25–62,5

Активність похідних лізину сполук 6.3 та 6.6 щодо *E. aerogenes* 418 та *K. pneumoniae* K-7 NCTC 9127 найчастіше співвідносилась з показниками природного лізину, похідні ж аргініну сполуки 7.1.5 та 7.1.6 були вірогідно ($p < 0,05$) активнішими за природний аргінін. Щодо тест-штамів *P. vulgaris* обидві похідні аргініну сполуки 7.1.5 та 7.1.6 виявились активнішими за похідні лізину (МІК та МБ_цК відповідно 31,25 та 62,5 мкг/мл, $p < 0,05$ відносно показників природного аргініну). Щодо усіх досліджених тест-штамів *R. aquatilis* модифіковані амінокислоти виявили помірну протимікробну активність з показниками МІК у межах 31,25 – 62,5 мкг/мл та МБ_цК – 62,5 – 125,0 мкг/мл, при цьому жодна з досліджених модифікованих амінокислот не виявилась активнішою за інші. Отже, за результатами проведеного дослідження встановлено високу або помірну активність модифікованих амінокислот щодо грамнегативних мікроорганізмів – *P. aeruginosa* та 12 представників родини *Enterobacteriaceae*. Серед досліджених синтетичних похідних амінокислот щодо *P. aeruginosa* ATCC 27853 найактивнішими були похідні лізину 6.6 та аргініну 7.1.6. Щодо представників родини *Enterobacteriaceae* штамів *E.coli* ATCC 25922, *S. enteritidis* гр. P,Y/ratin №27, *S. flexneri* ДІСК 170 та *S. sonnei* ДІСК 5772 найактивнішими були похідні лізину 6.3 та аргініну 7.1.5.

Визначено активність 3 речовин, а саме похідних лізину 6.1 та аргініну 7.1.5 та 7.1.11, щодо 10 музейних штамів грибів роду *Candida*. За результатами проведених досліджень встановлено невисоку *in vitro* активність модифікованих амінокислот щодо дріжджеподібних грибів роду *Candida*. МІК досліджених речовин знаходились в діапазоні 62,5–125,0 мкг/мл, МФ_цК – 125,0–250,0 мкг/мл. За ступенем протигрибкової активності жодна серед досліджених речовин не проявила себе краще за інші, хоча за рівнем протигрибкової активності досліджувані нові

речовини були вірогідно активнішими за відповідні природні амінокислоти.

Отримані результати підтвердили перспективність подальших поглиблених досліджень модифікованих амінокислот з кінцевою метою створення на їх основі нових протимікробних засобів. Для подальшого вивчення біологічних властивостей нових речовин було відібрано найперспективніші сполуки, а саме похідні лізину 6.1, 6.3 та 6.6 і похідні аргініну 7.1.5 та 7.1.6.

Висновки

1. За результатами вивчення спектру та ступеню протимікробної активності модифікованих амінокислот на розширеному колі мікроорганізмів встановлено, що синтезовані похідні лізину та аргініну володіють високою *in vitro* активністю щодо грамнегативних мікроорганізмів з показниками МІК у межах 3,9–31,25 мкг/мл. Серед досліджених речовин за ступенем їх впливу на грамнегативні мікроорганізми найактивнішими сполуками виявились похідні лізину 6.1 та аргініну 7.1.5.
2. При визначенні спектру та ступеню протимікробної активності модифікованих амінокислот стосовно грамнегативних мікроорганізмів встановлено, що щодо *P. aeruginosa* ATCC 27853 найактивнішими були похідні лізину 6.6 та аргініну 7.1.6. Щодо представників родини *Enterobacteriaceae* найактивнішими були похідні лізину 6.3 та аргініну 7.1.5.
3. Активність модифікованих амінокислот щодо дріжджеподібних грибів роду *Candida* була невисокою (МІК та МФ_цК відповідно 62,5–125,0 та 125,0–250,0 мкг/мл).
4. Доведено доцільність та перспективність подальшого поглибленого дослідження властивостей модифікованих амінокислот з кінцевою метою розробки на їх основі нових протимікробних засобів.

Spectrum and levels of antimicrobial activity of modified amino acids

Osolodchenko T. P., Andreieva I. D., Zavada N. P., Ryabova I. S., Volyansky A. Yu.

Introduction. Antimicrobial resistance threatens the effective prevention and treatment of an ever-increasing range of infections and is rising to dangerously high levels in all parts of the world. The search among the natural and synthetic biologically active compounds that influence the development of resistance in against antibacterial agents in the clinically relevant strains acquires increasingly greater significance. **Material & methods.** Were studied the spectrum and levels of antimicrobial activity of 10 synthetic amino acid derivatives, the most active according to the results of the primary screening study. Investigations of the degree and spectrum of antimicrobial activity selected on the basis of screening of promising substances were performed on 40 museum and clinical strains of microorganisms, among them 17 gram-positive, 13 strains of gram-negative bacteria and 10 strains of fungi of the genus *Candida*. Determination of antimicrobial and anticandidosis effects of new compounds was carried out using the standard method of double serial dilutions. **Results & discussion.** It has been established that synthesized derivatives of lysine and arginine possess high in vitro activity against gram-positive microorganisms with MIC values in the range of 3.9-31.25 µg / ml. Among the investigated substances, the most active compounds, namely the derivatives of lysine 6.1 and arginine 7.1.5 (MIC and MBCB in the range 3.9-15.6 µg / ml), were determined according to their degree of influence on gram-positive microorganisms. The effect of modified amino acids relative to *P. aeruginosa* ATCC 27853 was demonstrated at concentrations of 15.6-62.5 µg / ml. The MIC synthetic derivatives of amino acids relative to *E.coli* ATCC 25922 were within the range of 7.8-15.6 µg / ml. Indicators of MIC of synthesized substances for strains *S. enteritidis* gr. P, Y / ratin No. 27, *S. flexneri* DSIK 170 and *S. sonnei* DISK 5772 were in the range of 15.6 - 31.25 µg / ml., The most active for strain *P. aeruginosa* ATCC 27853 were derivative of lysine 6.6 and derivative of arginine 7.1.6. For representatives of the *Enterobacteriaceae* family were the most active derivative of lysine 6.3 and derivative of arginine 7.1.5. The activity of modified amino acids relative to fungi of the genus *Candida* was not high. The inhibitory growth of the concentrations of the tested substances was in the range of 62.5-125.0 µg / ml. According to the degree of antifungal activity, none of the studied substances did not show better than others. **Conclusion.** The obtained results confirmed the promising research of modified amino acids with the ultimate goal of creating new antimicrobial agents on their basis.

Keywords: modified amino acids; microorganisms; antimicrobial activity

References

1. World Health Organization. World health statistics overview 2019: monitoring health for the SDGs,

sustainable development goals. 2019. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/311696>.

2. World Health Organization World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. 2018. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272596>.

3. World Health Organization. Antibiotic resistance. 2018 URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.

4. Todosiychuk TS, Izdebska TI, Gromyko OM, Fedorenko VO Current state and perspectives of biotechnological production of antibiotics. *Studia Biologica*. 2011. Vol. 5. N. 1. P. 159-172.

5. Osolodchenko TP, Andreieva ID, Ponomarenko SV et al. Primary microbiological screening of amino acids and their modified variants. *Annals of Mechnikov Institute*. 2019. N. 1. P. 40-46. http://www.imiamn.org.ua/journal/1_2019/PDF/9.pdf.