

О.Ю. Зінченко, Н.В. Шматкова, І.Й. Сейфулліна, В.О. Лерер

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: farmikr@ukr.net

ВПЛИВ ПОХІДНИХ ІЗОНІАЗИДУ НА ЧУТЛИВІСТЬ ЛАКТАМАЗПРОДУКУВАЛЬНИХ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ДО ПЕНІЦИЛІНУ

Мета. Виявлення здатності до синтезу β -лактамаз у штамів *S. aureus*, виділених з верхніх дихальних шляхів людей, а також визначення впливу ізонікотиноїлгідрозон *n*-диметиламінобензальдегіду та комплексу стануму (IV) з ізонікотиноїлгідрозоном 2-гідрокси-1-нафтальдегіду на чутливість цих штамів до пеніциліну. **Методи.** В роботі використовували мікробіологічні методи: диско-дифузійний, метод подвійних дисків та серійних розведень, а також статистичні методи аналізу даних. **Результати.** З верхніх дихальних шляхів здорових людей виділено 33 штами *S. aureus*, у яких найбільший рівень резистентності спостерігався до пеніцилінів і цефалоспоринів 3–4 покоління. У п'яти штамів виявлено продукцію β -лактамаз. Показано, що за присутності досліджуваного гідрозону та комплексу стануму (IV) МІК пеніциліну для штаму *S. aureus* 17, стійкого до II з використаних β -лактамів, знижувалася в 32 рази. **Висновки.** Досліджений гідрозон та комплекс Sn (IV) мають потенційну здатність до подолання стійкості грампозитивних бактерій до β -лактамних антибіотиків.

Ключові слова: резистентність, β -лактамаза, *Staphylococcus aureus*, мінімальна інгібувальна концентрація (МІК), інгібітор, ізоніазид, гідрозони, комплекси стануму (IV).

Провідною групою антибіотиків, що застосовуються в клініці, є β -лактами. Саме β -лактами стали першими антибактеріальними препаратами, до яких у мікроорганізмів виникли захисні механізми. На сьогодні найбільш поширеним механізмом стійкості до β -лактамних антибіотиків є їх ферментативна інактивація в результаті гідролізу одного із зв'язків β -лактамного кільця ферментами лактамазами [7].

Останнім часом до 90% стійких штамів бактерій, виділених від пацієнтів, здатні до вироблення β -лактамаз. В Україні ситуація погіршується вільним доступом населення до антибіотиків в аптечній мережі та досить частим неналежним їх використанням [2].

Одним із шляхів подолання бактеріальної резистентності, пов'язаної з ферментативною інактивацією антибіотиків, є застосування комбінованих препаратів, до складу яких поряд з діючою речовиною входить інгібітор лактамази.



Зазвичай інгібітором виступає антибіотик з групи β -лактамів, у якого відсутня або слабка антибактеріальна активність, але останнім часом почався пошук інгібіторів серед сполук з іншою хімічною будовою, зокрема, гідразонів [12–14].

Раніше нами було досліджено вплив похідних ізоніазиду – ізонікотиноїлгідразонів ароматичних альдегідів і нових відповідних комплексів стануму (IV) на ріст умовно-патогенних бактерій [1] та виявлено серед них дві сполуки, які виявляють низьку антибактеріальну активність щодо стандартного штаму *S. aureus* ATCC 25923. Це є важливим фактором, оскільки визначення інгібувальної дії на β -лактамази сполук з високою антибактеріальною активністю щодо тест-штамів неможливе внаслідок пригнічення росту бактеріальних культур.

Метою даної роботи було виявлення здатності до синтезу β -лактамаз у штамів *S. aureus*, виділених з верхніх дихальних шляхів людей, а також визначення впливу ізонікотиноїлгідразон *n*-диметиламінобензальдегіду та комплексу стануму (IV) з ізонікотиноїлгідразоном 2-гідрокси-1-нафтальдегіду на чутливість цих штамів до пеніциліну.

Матеріали та методи

Виділення стафілококів проводили з поверхні мигдаликів та порожнини носа здорових осіб. Ідентифікацію проводили за стандартною схемою [8]. Визначення чутливості виділених штамів до β -лактамних антибіотиків здійснювали диско-дифузійним методом [11].

Для виявлення синтезу виділеними штамми лактамаз використовували метод подвійних дисків [7]. В центрі чашки Петрі з агаром Мюлера-Хінтона, засіяного суспензією тест-штаму, розміщували диск з амоксициліном/клавуланатом, з боків від нього – диски з цефотаксимом і цефепімом (рис. 1). Про синтез β -лактамаз свідчила поява розширених зон пригнічення росту між одним або декількома дисками з β -лактамами і диском, який містив клавуланову кислоту.

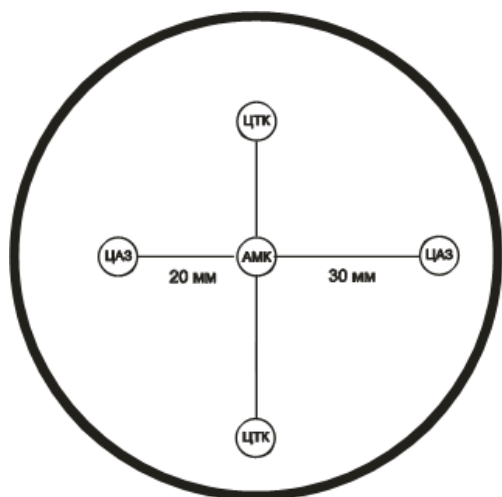


Рис. 1. Схема розташування дисків при постановці тесту з виявлення продукції БЛРС методом «подвійних дисків».

Примітка: АМК – амоксицилін/клавуланат; ЦТК – цефотаксим; ЦАЗ – цефепім.

Fig. 1. The scheme of arrangement of the disks with antibiotics

Note: АМК – amoxicillin/clavulanate, ЦТК – cefotaxime, ЦАЗ – cefepime.

В роботі використовували ізонікотиноїлгідрозон 4-N, N-диметиламіно-бензальдегіду (сполука I), отриманий реакцією конденсації гідразиду ізонікотинової кислоти “осч” с альдегідом “хч” за методикою [9] (рис. 2). Його чистоту та індивідуальність контролювали методом тонкошарової хроматографії і за тпл. Комплекс стануму (IV) з ізонікотиноїлгідрозоном 2-гідрокси-1-нафтальдегіду (сполука II) синтезовано на кафедрі загальної хімії та полімерів ОНУ імені І.І. Мечникова доц. Шматковою Н.В. за загальною розробленою методикою [5] (рис. 2). Його склад і будова доведені сукупністю фізико-хімічних методів дослідження, а молекулярну та кристалічну структуру встановлено рентгено-структурним аналізом [4].

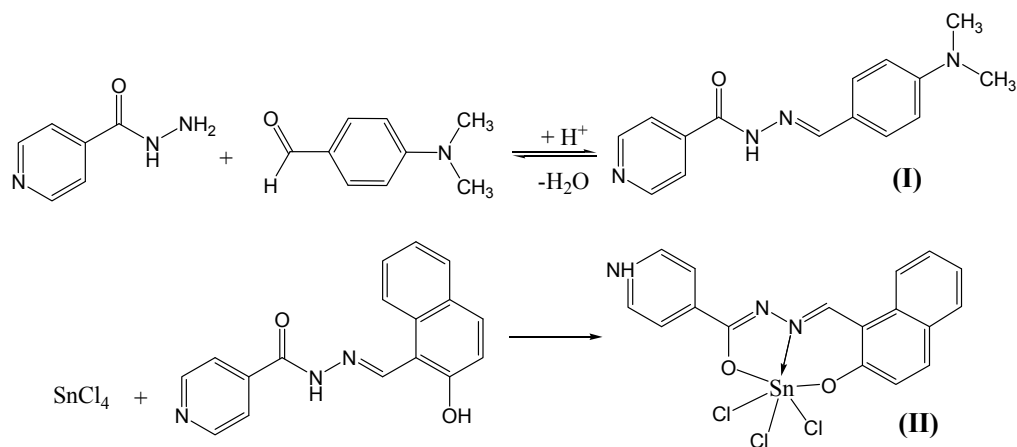


Рис. 2. Схема синтезу та будови сполук I і II

Fig. 2. The scheme of synthesis and structure of compounds I and II

Для визначення комбінованого впливу досліджуваних сполук I, II та антибіотиків на ріст мікроорганізмів попередньо визначали мінімальні інгібувальні концентрації антибіотиків та I, II методом серійних розведень [8].

У подальшому вивчали сумісну дію антибіотиків та сполук I, II. Для цього тест-мікроорганізми вирощували у середовищі Гісса з індикатором Андреде, до якого одночасно додавали антибіотики та I, II у концентраціях, менших за МК. Кількість паралелей у кожному експерименті дорівнювала 5, експерименти повторювали тричі.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного та кореляційного аналізу. Розраховували середні значення показників (\bar{X}) та їх стандартну помилку ($S_{\bar{X}}$). Вірогідність відмінностей між середніми визначали за критерієм Стьюдента, оцінюючи вірогідність отриманих результатів на рівні значимості не менше 95 % ($p \leq 0,05$) [3].

Математичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel.



Результати дослідження та їх обговорення

У ході дослідження з поверхні мигдаликів та носової порожнини 76 здорових людей виділено 33 штами *S. aureus*, чутливі до іміпенему, меропенему, цефазоліну, цефаклору, цефоперазону/сульбактаму, тикарциліну/клавуланату та амоксициліну/клавуланату (рис. 3).

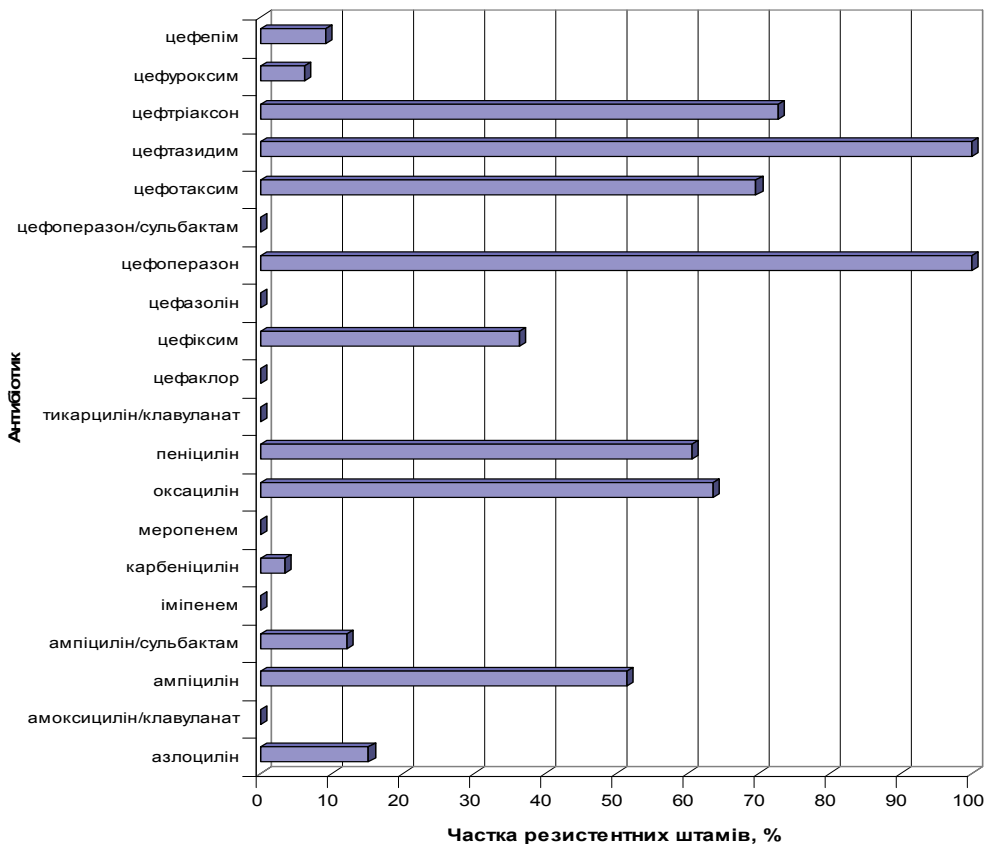


Рис. 3. Резистентність виділених штамів *S. aureus* до β -лактамних антибіотиків

Fig. 3. Resistance of isolated *S. aureus* strains to β -lactam antibiotics

Серед виділених культур 15,2% були резистентні до азлоциліну, 51,5% – до ампіциліну, 12,1% – до ампіциліну/сульбактаму, 3,3% – до карбеніциліну, 63,6% – до оксациліну, 60,6% – до пеніциліну, 36,4% – до цефіксиму, 100% – до цефоперазону, 69,7% – до цефотаксиму, 100% – до цефтазидіму, 72,7% – до цефтріаксону, 6,1% – до цефуросиму, 9,1% – до цефепіму (рис. 3).

Таким чином, найбільший рівень резистентності спостерігався до пеніцилінів і цефалоспоринів 3–4 покоління. До цефалоспоринів 1 та 2 поколінь, карбапенемів та інгібіторозахищених β -лактамів були чутливі 100% культур.

Для визначення у виділених штамів здатності до синтезу β -лактамаз відібрали культури, резистентні щонайменш до третини використаних антибіотиків. Таких культур було шість.

При визначенні продукції β -лактамаз методом подвійних дисків позитивний результат показали 5 штамів (рис. 4, а–е), негативним був лише один (рис 4, f)

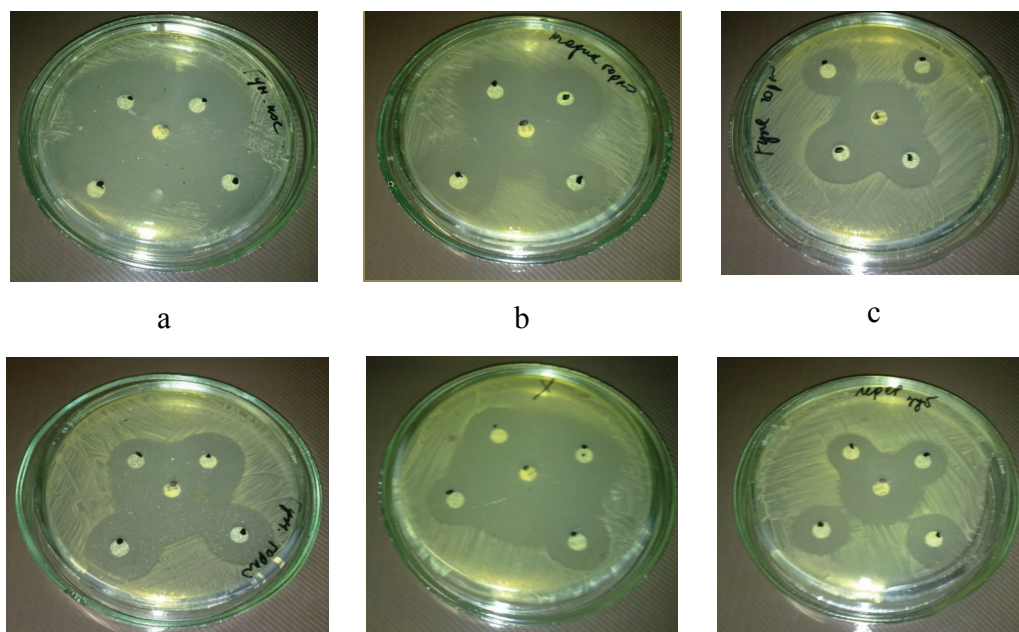


Рис. 4. Визначення здатності до синтезу β -лактамаз у виділених штамів *S. aureus*
Примітка: а–е – позитивний результат тесту, f – негативний результат тесту, схема розташування дисків наведена на рис. 1.

Fig. 4. The detection of inhibitor-resistant β -lactamases in isolated *S. aureus* strains
Note: a–e – positive result of the test, f – negative result of the test, the scheme of disk arrangement is shown on Fig. 1.

Розширені зони пригнічення росту між одним або декількома дисками з β -лактамами і диском, який містить клавуланову кислоту, вказує на вироблення β -лактамаз. Незалежно від абсолютних значень діаметрів зон пригнічення росту штамми, які продукують подібні ферменти, вважаються резистентними до всіх пеніцилінів, цефалоспоринів (за виключенням цефаміцинів) і монобактамів [6].

Для подальших досліджень відібрали штам *S. aureus* 17, який виявив резистентність до 11 використаних β -лактамів. Як тест-антибіотик було обрано пеніцилін. Показано, що МІК пеніциліну для тест-штаму складала 48 мкг/мл. МІК сполуки I дорівнювала 160 мкМ, сполуки II – 80 мкМ.

Культуру тест-штаму вирощували за присутності комбінацій різних концентрацій пеніциліну, які були меншими за МІК, та досліджуваних сполук I і II в концентраціях 10 та 20 мкМ. У результаті цих досліджень було визначено комбінації, які викликали повне пригнічення росту *S. aureus* 17.

Установлено, що за присутності досліджуваних сполук МІК пеніциліну знижувалася до 1,5 мкг/мл, тобто, у 32 рази (рис. 5).

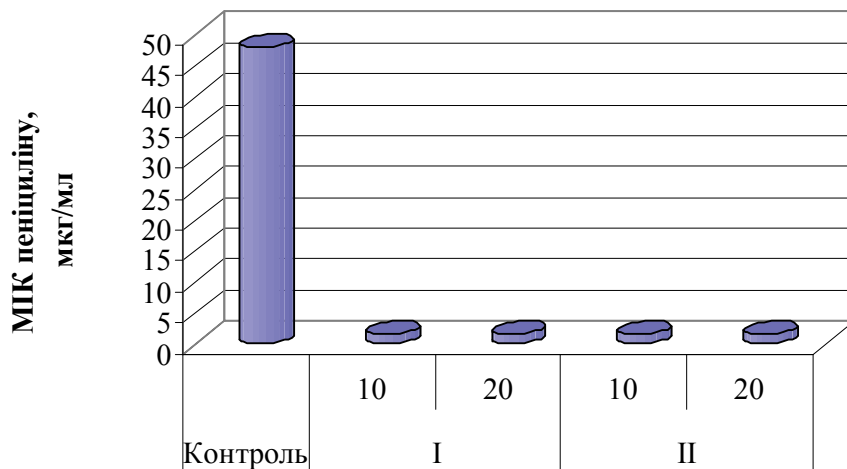


Рис. 5. Вплив досліджуваних сполук на МІК пеніциліну щодо тест-штаму *S. aureus* 17

Примітка: I, II – сполуки I та II,
10, 20 – концентрація сполук I та II, мкМ.

Fig. 5. The influence of studied compounds on MIC of penicillin for test-strain *S. aureus* 17

Note: I, II – compounds I and II,
10, 20 – the concentration of compounds I and II, μM .

На сьогоднішній день коло інгібіторів, здатних пригнічувати ферментативну інактивацію β -лактамних антибіотиків, дуже обмежене. Крім того, за своєю хімічною будовою інгібітори належать до β -лактамів, що може викликати виникнення у мікроорганізмів здатності до руйнування й самої молекули інгібітора [10]. У зв'язку з цим пошук інгібіторів серед сполук з принципово іншим типом будови цілком виправданий. У роботах Siemann та співавт. [15] доведено ефективність аурилсульфонілгідразонів як інгібіторів метало- β -лактамаз. Цими дослідниками показано здатність гідразонів проявляти афінитет до атому цинку, тобто, блокувати активний центр ферменту. Наявність подібної активності у комплексу стануму (IV) з ізонікотиноїлгідразоном 2-гідроксинафталдегіду також цілком ймовірна.

Крім того, відомо, що гени, які кодують лактамази грампозитивних бактерій, зазвичай іммобілізовані на позахромосомних генетичних елементах [6, 10], тому іншим вірогідним механізмом підвищення чутливості тест-штаму до пеніциліну є взаємодія з плазмідною ДНК.

Таким чином, в ході дослідження з верхніх дихальних шляхів здорових людей виділено 33 штами *S. aureus*, у яких найбільший рівень резистентності спостерігався до пеніцилінів і цефалоспоринів 3-4 покоління. У п'яти штамів виявлено здатність до синтезу β -лактамаз. Показано, що за присутності дослідженого гідразону та комплексу стануму (IV) МІК пеніциліну для штаму

S. aureus 17, стійкого до 11 з використаних β-лактамів, знижувалася в 32 рази. Отже, використані в роботі сполуки N-диметиламінобензальдегіду (сполука I), комплекс стануму (IV) з ізонікотиноілгідразоном 2-гідрокси-1-нафтальдегіду (сполука II) мають потенційну здатність до подолання стійкості грампозитивних бактерій до β-лактамних антибіотиків.

УДК 615.012.1:547.789/.793

**О.Ю. Зинченко, Н.В. Шматкова, И.И. Сейфуллина,
В.А. Лерер**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
e-mail: farmikr@ukr.net

**ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ИЗОНИАЗИДА
НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЛАКТАМАЗАПРОДУЦИРУЮЩИХ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS К ПЕНИЦИЛЛИНУ**

Реферат

Цель. Выявление способности к синтезу β-лактамаз у штаммов *S. aureus*, выделенных из верхних дыхательных путей людей, а также определение изоникотиноилгидразона *n*-диметиламинобензальдегида и комплекса олова с изоникотиноилгидразоном 2-гидроксинафтальдегида на чувствительность этих штаммов к пенициллину. **Методы.** В работе использовали микробиологические методы: диско-диффузионный, метод двойных дисков и серийных разведений, а также статистические методы анализа данных. **Результаты.** Из верхних дыхательных путей здоровых людей выделены 33 штамма *S. aureus*, у которых самый высокий уровень резистентности наблюдался к пенициллинам и цефалоспорином 3–4 поколения. У пяти штаммов выявлена способность к выработке β-лактамаз. Показано, что в присутствии исследуемого гидразона и комплекса олова (IV) МИК пенициллина для штамма *S. aureus* 17, устойчивого к II из использованных β-лактамов, снижается в 32 раза. **Выводы.** Исследованный гидразон и комплекс олова (IV) обладают потенциальной способностью преодолевать устойчивость грамположительных бактерий к β-лактамным антибиотикам.

Ключевые слова: резистентность, β-лактамаза, *Staphylococcus aureus*, минимальная ингибирующая концентрация (МИК), ингибитор, гидразоны, комплексы олова (IV).



O.Yu. Zinchenko, N.V. Shmatkova, I.Y. Seifullina, V.O. Lerer

Odesa Mechnykov Naional University,
2, Dvorjanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: farmikr@ukr.net

INFLUENCE OF IZONIAZIDE DERIVATIVES ON LACTAMASE-PRODUCING *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SENSITIVITY TO PENICILLIN

Summary

Aim. The detection of the ability of *S. aureus* strains isolated from human upper airways to β -lactamase production and determination of the effect of *p*-dimethylaminobenzaldehyde isonicotinoylhydrazone and Sn(IV) complex with 2-hydroxyinaphthaldehyde isonicotinoylhydrazone on the sensitivity of lactamase-producing strains to penicillin.

Methods. We have used the microbiological methods: disc-diffusion, double-disc and serial dilution methods and statistical data analysis. **Results.** 33 *S. aureus* strains with the highest resistance to penicillins and III-IV generation cephalosporins have been isolated from the upper airways of healthy people. The ability to synthesize β -lactamases has been detected in 5 strains. It has been shown 32-fold decrease of MIC of penicillin for *S. aureus* 17 in the presence of studied hydrazone and Sn (IV) complex. **Conclusions.** Studied hydrazone and Sn (IV) complex have the potential ability to overwhelm the resistance of Gram-positive bacteria to β -lactam antibiotics.

Key words: resistance, β -lactamase, *Staphylococcus aureus*, minimum inhibitory concentration (MIC), inhibitor, hydrazone, Sn (IV) complex.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Зинченко О.Ю., Шматкова Н.В., Сейфуллина И.И., Галкин Б.Н., Филлипова Т.О. Антимикробная активность производных изоникотиновой кислоты и комплексов олова(IV) на их основе // Микробиология и биотехнология. – 2013. – № 2. – С. 69–78.
2. Лазоришинець В.В., Мрієвський В.Ф., Салманов А.Г. та ін. Антибіотикорезистентність клінічних штамів *Enterobacter spp.* в хірургічних стаціонарах України в 2010 році // Ліки України. – 2011. – № 2 (5). – С. 34–38.
3. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2001. – 260 с.
4. Сейфуллина И.И., Шматкова Н.В. Новый этап в развитии координационной химии ароил-(пиридиноил)гидразонов замещенных бенз-(1-нафт)альдегидов // Вісник ОНУ. – 2008. – Т. 13, № 2. – С. 5–26.
5. Сейфуллина И.И., Шматкова Н.В., Зубатюк Р.И., Шишкин О.В., Мазена А.В. Комплексы Sn(IV) с пикотиноилгидразонами 2-гидроксибенз-(2-гидроксиафт)альдегидов (H_2Ps , H_2Pnf). Кристаллическая структура $[SnCl_3(Ps\ H)]CH_3OH$ и $[SnCl_3(Pnf\ H)]CH_3OH$ // Журнал неорган. химии. – 2013. – Т. 58, № 1. – С. 29–35.



6. Сидоренко С.В. Метициллинрезистентные стафилококки // Антибиотики и химиотерапия. – 1995. – № 11. – С. 57–69.
7. Сидоренко С.В. β-лактамазы расширенного спектра: клиническое значение и методы детекции // Инфекция и антимикробная терапия. – 2002. – Т. 4, № 6. – С. 15–28.
8. Унифицированные схемы методов лабораторных исследований при выделении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. – Оренбург: МЗ СССР, 1988. – С. 42.
9. Шматкова Н.В., Сейфулліна И.И., Зинченко О.Ю. Синтез, строение и противомикробная активность хелатов SnCl_4 с пиридинойгидразонами ароматических альдегидов // Укр. хим. журнал. 2013. – Т. 79, № 3. – С. 33–39.
10. Bradford P. Extended-Spectrum-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat // Clinical Microbiology Reviews. – 2001. – Vol. 14, No. 4. – P. 933–951.
11. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement // CLSI document M100-S17. – 2007. – Vol. 27, No. 1. – 180 p.
12. Gunjan J., Bhadauria R.S., Diwaker A.K. Synthesis, spectral and biological valuation of some hydrazone derivatives // IJARPB. – 2012. – Vol. 1, № 1. – P. 25–38.
13. López-Torres E., Zani F., Mendiola M.A. Antimicrobial activity of organotin(IV) complexes with the ligand benzil bis(benzoylhydrazone) and 4,4'-bipyridyl as coligand // J. Inorg. Biochem. – 2011. – Vol. 105. – P. 600–608.
14. Rashan L.J., Aziz A.A., Sulayman K.D. Antibacterial activity of diorganotin (IV) complexes of some Schiff-base derivatives // Asian J. Chem. – 1998. – Vol. 10. – P. 338–341.
15. Siemann S., Evanoff D.P., Marrone L., Clarke A.J., Viswanatha T., Dmitrienko G.I. N-arylsulfonyl hydrazones as inhibitors of IMP-1 metallo-beta-lactamase // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2002. – Vol. 46, No. 8. – P. 2450–2457.

Стаття надійшла до редакції 07.07.2014 р.

