

# Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Е. С. Селезнева, Е. И. Теньгаев, 2008

Е. С. Селезнева, Е. И. Теньгаев

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ АДАПТАЦИИ У *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* К СУЛЬФУРИЛЬНЫМ ПРОИЗВОДНЫМ БЕНАЗОЛИДОВ

Самарский государственный университет, Самара, Россия

Воздействуя нетоксичными дозами сульфурильных производных бензимидазола и бензотриазола на культуры *Staphylococcus aureus*, удалось создать состояние преадаптированности у него к высокотоксичной дозе этих соединений. Предварительное воздействие исходными бензазолидами – бензоимидазолом и бензотриазолом – на культуры *Staphylococcus aureus* также создавало состояние преадаптированности к токсичной дозе их сульфурильных производных. В экспериментах по перекрестной преадаптации, когда к сульфурильным производным бензимидазола преадаптация создавалась воздействием нетоксичной дозой бензотриазола и наоборот, было показано, что планарная структура двойного кольца бензазолида играет основную роль в активации систем репарации у *Staphylococcus aureus*. Математический анализ выявил высокую нелинейную корреляцию между способностью соединения создавать состояние преадаптированности у культур *Staphylococcus aureus* и такими физико-химическими свойствами как липофильность, молекулярная масса, молекулярный объем и энергия гидратации.

Ксенобиотики антропогенного происхождения изменяют процессы адаптиогенеза у организмов, подвергшихся их воздействию. Появление полирезистентности у широко распространенных патогенных микроорганизмов связывают с усиливающимся поступлением в окружающую среду органических соединений, способных в низких дозах активировать процессы адаптиогенеза. Последнее может стать причиной того, что используемые в медицине и сельском хозяйстве препараты становятся неэффективными, что, в свою очередь, оказывает воздействие на развитие микробиологической и фармакологической промышленности и может усиливать засорение окружающей среды. Именно поэтому внимание экологов обращено на исследование адаптиогенеза к антропогенным факторам.

Характерной чертой процесса адаптации является наличие ряда переходных состояний, определяемых не только дозой фактора адаптации, но и временем. Безусловно, что приспособление всегда реализуется на уровне фенотипа и направлено на восстановление функций клетки. Существуют многочисленные исследования, посвященные адаптации микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Пути адаптиогенеза можно грубо разделить на следующие:

а) снижение способности вещества проникать внутрь бактериальных клеток, что может быть следствием утраты или изменения специфических пермеаз, активной блокады поступления веществ в клетку, наличия факторов, активно “выбрасывающих” ксенобиотики из клеток [1, 2];

б) изменение метаболизма, приводящего к инаktivации соединений. Это может быть утрата звена обмен-

на, чувствительного к данному токсиканту, усиление синтеза ферментов, способных модифицировать яды, или приобретение специфических продуктов, снижающих токсичность ксенобиотиков [3]. В основе подобного пути могут лежать как физиологические, так и генетические механизмы адаптации.

Современные гипотезы, обсуждающие феномен многоуровневой организации в развитии адаптивного ответа, практически не учитывают проблему химического строения ксенобиотика. Между тем, выяснение механизмов адаптиогенеза на уровне “строение ксенобиотика — адаптация” позволило бы отчасти решить проблему полирезистентности микроорганизмов.

Для этого необходимо проведение модельных экспериментов для аналогичных соединений. Особый интерес в этом отношении представляют собой микроорганизмы, характеризующиеся своей космополитичностью и высокими адаптационными возможностями. К таким микроорганизмам относится *Staphylococcus aureus* — золотистый стафилококк.

Для того чтобы выяснить связь между строением ксенобиотика и способностью *Staphylococcus aureus* адаптироваться к нему, были выбраны бензазолиды, которые имеют структурное сходство с пуринами.

### Материал и методы

В таблице представлены названия и физико-химические свойства исследованных бензазолидов.

Для анализа воздействия бензазолидов на рост *Staphylococcus aureus* использовали спиртовые растворы в концентрации 0,001 и 10 мг/мл. Контролем служили размеры диаметров зоны ингибирования роста, кото-

рые образовывались вокруг тест-дисков, пропитанных 5 % изопропиловым спиртом.

Антибактериальную активность бензазолоидов оценивали в соответствии с методическими указаниями по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам по размеру диаметра зоны ингибирования роста [4]. Использовали штамм *Staphylococcus aureus* ATCC № 6578. Было проведено 4 серии экспериментов.

**1 серия.** Исследование способности исследуемых бензазолоидов в концентрации 10 мг/мл подавлять рост колоний *Staphylococcus aureus*.

Для этого суспензию *Staphylococcus aureus* разводили изотоническим раствором NaCl до мутности оптического стандарта ГПСК им Л. А. Тарасевича так, чтобы 1 мл смеси содержал  $5 \cdot 10^9$  микробных клеток. Затем на засеянный бактериальный газон помещали тест-диск диаметром 6 мм, пропитанные исследуемыми бензазолоидами в концентрации 10 мг/мл. Через сутки измеряли диаметр зоны ингибирования роста вокруг каждого тест-диска. Всего для каждого соединения было проведено 7 повторов.

**2 серия.** Исследование способности бензазолоидов в концентрации 0,001 мг/мл создавать преадаптацию у *Staphylococcus aureus* к последующему действию этими же соединениями в концентрации 10 мг/мл.

Исследовали 8 бензазолоидов. Для этого каждое соединение добавляли в стандартную культуральную среду так, чтобы их концентрация составила 0,001 мг/мл, после чего на среду сеяли *Staphylococcus aureus*. Таким образом было получено 8 культур и контроль. Суспензии каждой культуры засеивали стандартным способом на чашки Петри со стандартной средой, не содержащей исследуемых бензазолоидов, затем туда раскладывали тест-диск, пропитанные исследуемыми соединениями в концентрации 10 мг/мл. Например диск, пропитанные соединением II, помещали на чашки Петри, засеянные культурой, преадаптированной к соединению II.

**3 серия.** Изучение способности I в нетоксичной дозе (0,001 мг/мл) создавать преадаптацию к высокой дозе (10 мг/мл) сульфурильных производных I, и V в нетоксичной дозе (0,001 мг/мл) создавать преадаптацию к высокой дозе (10 мг/мл) сульфурильных производных V.

*Staphylococcus aureus*, выросший на среде, в которую было добавлено соединение либо I, либо V в концентрации 0,001 мг/мл, пересеивали на чистую среду.

Затем эти 2 культуры рассеивали на чашки Петри. Далее на чашки Петри, где были культуры, выросшие на среде с I, раскладывали тест-диск, пропитанные соединениями I – IV, а на культуры, выросшие на среде V, раскладывали тест-диск, пропитанные соединениями V – VIII. Всего для каждого соединения было проведено 7 повторов.

**4 серия.** Изучение способности I в нетоксичной дозе (0,001 мг/мл) создавать преадаптацию к высокой дозе (10 мг/мл) сульфурильных производных V, и V в нетоксичной дозе (0,001 мг/мл) создавать преадаптацию к высокой дозе (10 мг/мл) сульфурильных производных I.

*Staphylococcus aureus*, выросший на среде, в которую было добавлено соединение I или V в концентрации 0,001 мг/мл, пересеивали на чистую среду. Затем эти 2 культуры рассеивали на чашки Петри. Далее на чашки Петри, где были культуры, выросшие на среде с I, раскладывали тест-диск, пропитанные сульфурильными производными V, а для культур, выросших на среде V, раскладывали тест-диск, пропитанные сульфурильными производными I. Всего для каждого соединения было проведено 7 повторных измерений.

Достоверность различий между токсичностью соединений в опыте и контроле при прямом действии соединений и при действии с предварительной преадаптацией оценивали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа. Влияние строения соединения и его физико-химических параметров на антибактериальные свойства и способность индуцировать адаптации у *Staphylococcus aureus* оценивали с помощью корреляционного анализа [5].

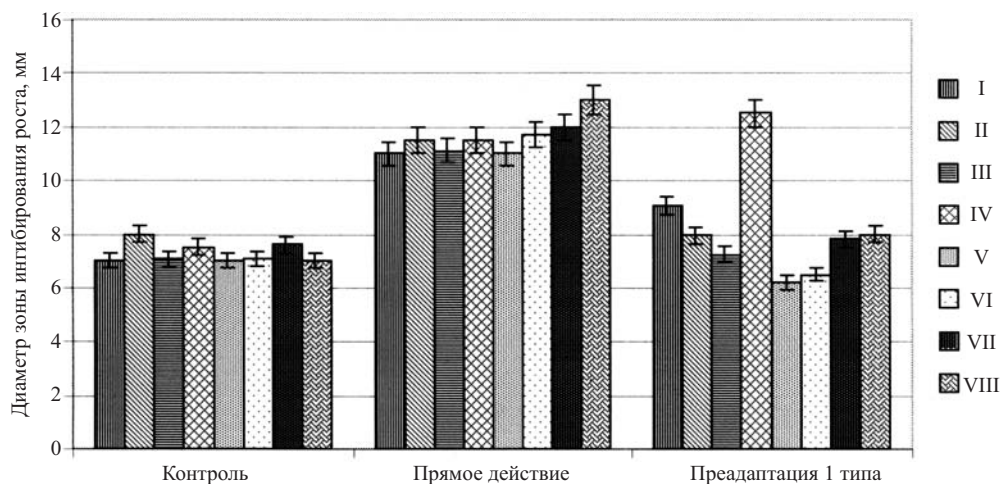
## Результаты и их обсуждение

Результаты антибактериального действия бензазолоидов в концентрации 10 мг/мл и способности малых доз этих же соединений индуцировать процессы адаптации у золотистого стафилококка представлены на рис. 1.

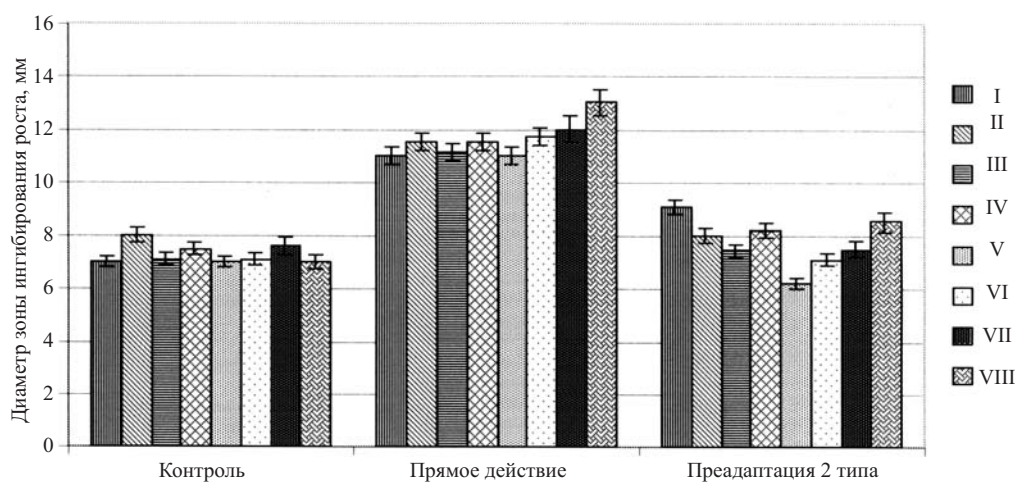
Как видно из представленных данных, все бензазолоиды ингибируют рост колоний *Staphylococcus aureus*,

## Строение и физико-химические свойства бензазолоидов

Бензаолоид	log P	$T_{пл}^*$ , °C	Молекулярная масса	Молекулярный объем	Энергия гидратации	Дипольный момент
I Бензимидазол	0,92	172 – 174	118,13	406,03	– 7,07	3,14
II N-бензимидазолида метансульфокислота	– 4,23	151 – 154	196,23	543,07	– 5,86	3,34
III N-бензимидазолида бензолсульфокислота	5,91	103 – 105	258,36	694,57	– 7,15	6,12
IV N-бензимидазолида толуолсульфокислота	5,91	187 – 189	272,33	695,72	– 6,87	3,98
V Бензотриазол	1,09	98 – 99	119,13	390,22	– 10,13	3,65
VI N-бензотриазолида метансульфокислота	4,40	92 – 93	197,22	531,92	– 7,47	3,43
VII N-бензотриазолида бензолсульфокислота	6,08	113 – 114	289,29	687,53	– 7,89	1,49
VIII N-бензотриазолида толуолсульфокислота	4,61	133 – 135	273,29	740,05	– 6,79	5,398



**Рис. 1.** Антибактериальная активность исследуемых бензазOLIDов (прямое действие — результаты опытов серии 1, преадаптация 1 — результаты опытов серии 2).



**Рис. 2.** Антибактериальная активность исследуемых бензазOLIDов (прямое действие — результаты опытов серии 1, преадаптация 2 — результаты опытов серии 3).

что выражается в увеличении зон ингибирования роста по сравнению с контролем.

Для сравнения антибактериальных свойств исследованных бензазOLIDов был проведен полный двухфакторный дисперсионный анализ, который показал, что соединения, содержащие метильную группу, — II, IV, VI, VIII достоверно ( $p < 0,01$ ) токсичнее своих аналогов, не имеющих метильного радикала (I, III, V, VII).

Для выявления способности малых доз синтезированных нами ксенобиотиков индуцировать процессы адаптации золотистый стафилококк выращивали в среде, в которую были добавлены исследуемые бензазOLIDы в концентрации 0,001 мг/мл. Таким образом было получено 8 культур стафилококка, преадаптированных, как было предположено, к высоко токсичным дозам, исследованным ранее (прямое действие). Было обнаружено (рис. 1), что выращивание *Staphylococcus aureus* в среде с добавлением исследуемых соединений в концентрации 0,001 мг/мл действительно создавало состояние преадаптации, что позволило предположить активацию систем резистентности

у *Staphylococcus aureus*, которые помогли справиться с токсичностью высокой дозы исследуемых бензазOLIDов, за исключением IV.

Для выяснения роли химических группировок анализируемых бензазOLIDов, определяющих развитие адаптивного ответа, была проведена серия экспериментов (серия 3), в которой создавалась преадаптация исходными бензазOLIDами к их сульфурильным производным (см. рис. 2).

В этой серии экспериментов выявлено появление резистентности у золотистого стафилококка, выращенного на среде с добавленным I, к сульфурильным производным I или на среде с добавленным V к его сульфурильным производным. Исходя из этого, можно предположить, что основным индуктором развития адаптивного ответа через поколение являются кольца I (для сульфурильных производных I) и кольца V (для сульфурильных производных V). Последующее воздействие бензазOLIDами в токсичной дозе оказывается достоверно ( $p < 0,01$ ) менее токсичным, чем воздейст-

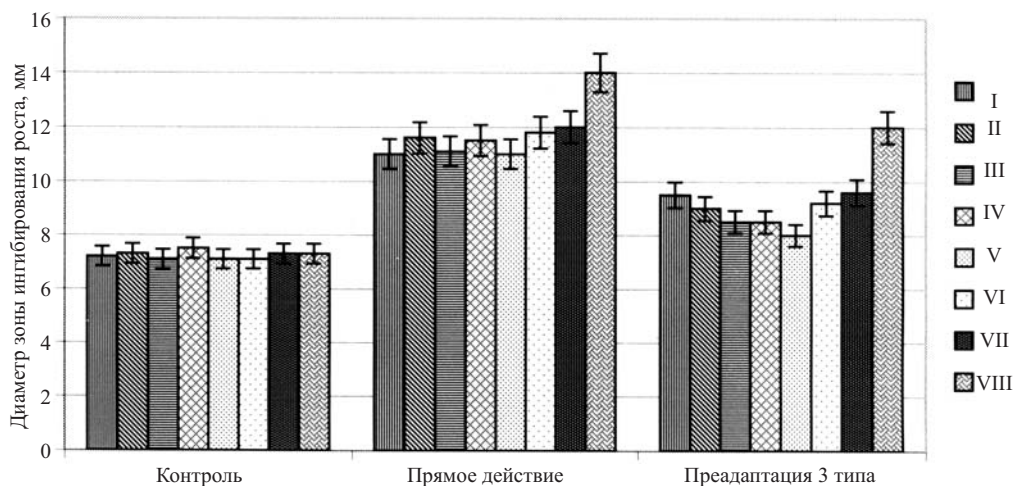


Рис. 3. Антибактериальная активность бензазolidов при перекрестной преадаптации (пояснения в тексте).

вие теми же соединениями без предварительной преадаптации (см. рис. 2).

По-видимому, исследованные бензазolidы, выступая как антиметаболиты пуринов, вмешиваясь в метаболизм последних, способны блокировать работу частично или полностью мембранных пуриновых рецепторов, благодаря которым пурины могли поступать в клетки из окружающей среды. Однако такое предположение свидетельствует о слабой специфичности поверхностных рецепторных систем для пуринов или пуриноподобных соединений.

Для выяснения роли специфичности в работе рецепторных систем в развитии адаптивного ответа была проведена перекрестная преадаптация (серия 4). В этой серии экспериментов культуру золотистого стафилококка, преадаптированную I в концентрации 0,001 мг/мл, подвергали воздействию токсическими дозами V – VIII и наоборот — культуру, преадаптированную V, подвергали воздействию токсическими дозами I – IV. Результаты приведены на рис. 3.

Как видно из полученных данных, развитие адаптивного ответа *Staphylococcus aureus* к антибактериальному действию сульфурильными производными не зависит от того, какими из исходных бензазolidов проведена преадаптация. Это доказывается достоверно меньшими диаметрами зон ингибирования роста возникающих вокруг тест-дисков, пропитанных растворами исследуемых бензазolidов по сравнению с размерами зон ингибирования роста при прямом действии веществ.

Можно предположить, что для развития адаптивного ответа важна структура, состоящая из 2 колец: бензольного и имидазольного или триазольного. Полученные результаты являются косвенным доказательством того, что развитие резистентности к исследуемым бензазolidам, антиметаболитам пуринов, связано с блокировкой поступления их в клетку. Первично попадая в клетку при воздействии нетоксичными дозами, используемые нами бензазolidы активировали как специфичность мембранных рецепторов, так и системы активного удаления ксенобиотиков из клеток.

Были проанализированы физико-химические свойства, которые могут влиять на развитие состояния адаптации помимо структурного сходства. Был также проведен корреляционный анализ связи между адаптивным ответом и физико-химическими свойствами, данные представлены в таблице. С этой целью подсчитывали разницу между величиной диаметра зоны ингибирования роста, образующейся при прямом действии исследуемыми бензазolidами и величиной диаметров после преадаптации (преадаптация 1), после чего был проведен корреляционный анализ между полученным рядом и исследуемыми физико-химическими параметрами. Оказалось, что корреляция носит нелинейный характер. С высокой степенью достоверности ( $p < 0,01$ ) способность соединений развивать состояние преадаптированности у *Staphylococcus aureus* нелинейно коррелировала с липофильностью ( $r_k = 0,98 \pm 0,04$ ), молекулярной массой ( $r_k = 0,85 \pm 0,01$ ), молекулярным объемом ( $r_k = 0,86 \pm 0,06$ ) и энергией гидратации ( $r_k = 0,93 \pm 0,14$ ). Остальные исследованные физико-химические параметры, такие как температура плавления и дипольный момент, не проявили корреляции ни линейной, ни криволинейной со способностью соединений развивать состояние преадаптации у *Staphylococcus aureus*.

Выявленная корреляция так же косвенно свидетельствует о влиянии структурных особенностей бензазolidа на развитие адаптивного ответа, так как анализ корреляции между способностью развивать состояние преадаптации во второй серии экспериментов (преадаптация 2) показало сходные закономерности.

Так как адаптация в конечном итоге является суммарным проявлением на фенотипическом уровне сложного процесса взаимодействия бактериальной клетки и окружающей среды, то на основании выявленных нами корреляций нельзя однозначно утверждать, что только исследованные физико-химические свойства влияют на развитие адаптивного ответа. Однако полученные результаты необходимо учитывать при создании лекарственных препаратов и пестици-

дов, в состав которых входят такие конденсированные циклы как бензимидазол и бензотриазол.

## ЛИТЕРАТУРА

1. J. R. Aeschlimann, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **42**(2), 335 – 340 (1999).
2. H. Nikaido, *J. Bact.*, **178**, 5853 – 5859 (1996).

3. Ю. Н. Карасевич, *Экспериментальная адаптация микроорганизмов*, Наука, Москва (1976).
4. *Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков*, Министерство здравоохранения СССР, Москва (1983).
5. Г. Ф. Лакин, *Биометрия*, Высшая школа, Москва (1990).

Поступила 13.11.06

## EXPERIMENTAL ADAPTATION OF *Staphylococcus aureus* TO SULFURYL DERIVATIVES OF BENZAZOLIDES

E. S. Selezneva and E. I. Ten'gaev

Samara State University, Samara, Russia

The state of pre-adaptation to highly toxic doses of sulfonyl derivatives of benzimidazole and benzotriazole was developed in *St. aureus* species by treating them with non-toxic doses of these compounds. Pretreatment of *St. aureus* with the initial benzazolides (benzimidazole and benzotriazole) on also created the pre-adaptation to their sulfonyl derivatives. The experiments on cross-preadaptation, where the pre-adaptation to sulfonyl derivatives of benzazolides was created by the action with non-toxic doses of benzotriazole and vice versa, showed that the planar structure of the double ring of benzazolidide plays a key role in activation of the reparation systems of *St. aureus*. Mathematical analysis revealed a high nonlinear correlation between, on the one hand, the ability of a compound to create the state of preadaptation in *St. aureus* culture and, on the other hand, the physical and chemical properties such as the lipophilicity, molecular weight and volume, and hydration energy.