

І. О. Бойко¹, Л. В. Музичка², Н. О. Вринчану¹, О. Б. Смолій²

Антимікробна активність функціоналізованих (піримідин-5-іл)трифенілфосфонієвих солей

¹Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ

²Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В. П. Кухаря НАН України, м. Київ

Ключові слова: антимікробна активність, антибіотикорезистентність, грампозитивні бактерії, грамнегативні бактерії, трифенілфосфонієві солі, піримідини

Одним з досягнень ХХ століття стало відкриття та впровадження в клінічну практику антибіотиків, що врятувало мільйони людських життів і дало не тільки надію, але й впевненість щодо можливості викорінення багатьох інфекцій. Успіхи антибіотикотерапії стали стимулом розробки та впровадження в клінічну практику нових препаратів. Нині, через багато десятиліть після того, як перші пацієнти отримали лікування антибіотиками, бактеріальні інфекції знову становлять загрозу для людства, антибіотикорезистентність сьогодні є глобальною проблемою та загрожує національній безпеці всіх країн світу. Згідно з даними Центрів з контролю та профілактики захворювань (CDC), тільки в США кількість стійких до дії антимікробних препаратів (АМП) збільшилась у 2020 році порівняно з 2019 роком на 15 % [1]. Летальність від захворювань, спричинених антибіотикорезистентними штамми, у 2019 році становила понад 1,2 млн осіб [2]. Резистентність має й економічні наслідки, лише в США для лікування пацієнтів з хворобами, зумовленими пеніцилін- та метицилінрезистентними штамми бактерій, щорічно витрачається близько 20 млрд доларів бюджетних коштів [3, 4].

Саме стримування розповсюдження резистентних штамів збудників, раціональне використання АМП, стабільні інвестиції в дослідження та розробку АМП є одними з 5 стратегічних задач, які визначені в документах «Глобальний план дій щодо стримування розповсюдження стійкості до антимікробних препаратів» (ВООЗ, 2015 р.) та «Національний план дій боротьби зі стійкістю до протимікробних препаратів» (КМ України, 2019 р.) [5–7].

Таким чином, поширення резистентності мікроорганізмів до АМП призвело до необхідності пошуку нових ефективних речовин з антибактеріальною активністю. Чималий інтерес до сполук онієвої природи, зокрема фосфонієвих похідних, зумовлений широким спектром антимікробної активності четвертинних фосфонієвих солей [8, 9]. Серед сполук трифенілфосфонію маловивченими нетепер залишаються антимікробні властивості фосфонієвих солей гетероциклічного ряду, зокрема функціонально заміщених похідних піримідину.

Мета дослідження – оцінити специфічну антибактеріальну дію функціоналізованих (піримідин-5-іл)трифенілфосфонієвих солей щодо планктонних клітин мікроорганізмів з різною чутливістю до АМП.

Матеріали та методи. У дослідженні використані функціоналізовані (піримідин-5-іл)трифенілфосфонієві солі (М-1711, М-1717 та М-1729) (рисунок),

що були синтезовані в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії ім. В. П. Кухаря НАН України шляхом циклізації продуктів приєднання трифенілфосфораніліденацетонітрилу до ацилізотіоціанатів з подальшим S-алкілюванням [10, 11]. Оскільки досліджувані сполуки є нерозчинними у воді, то для приготування розчинів використано 10 % диметилсульфоксид. Концентрація вихідного розчину становила 0,4 мг/мл. Препаратами порівняння були: ципрофлоксацин (Ciprofloxacin, виробництва Sigma-Aldrich, Co., USA, серія LRAD2244); азитроміцин (Azithromycin, виробництва Sigma-Aldrich, Co., USA, серія LRAC6480); гентаміцин (Gentamicin Sulfate, виробництва Sigma-Aldrich, Co., USA, серія LRAD6098); меропенем (Meropenem, виробництва Sigma-Aldrich, Co., USA, серія LRAD4417).

Антимікробну активність (піримідин-5-іл)трифенілфосфонієвих солей щодо планктонних клітин бактерій визначали загальноприйнятим методом з визначенням мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) [12–16]. У дослідженні використано 1-добові культури мікроорганізмів, які вирощено в аеробних умовах за (35–37) °С. За МІК приймали максимальне розведення сполуки, при якому візуально ріст мікроорганізмів не реєструвався. Вивчення антимікробної активності сполук проводили

методом серійних мікророзведень у Мюллер-Хінтон бульйоні (МХБ) та триптон-соевому бульйоні (ТСБ) (рН 7,3). Густина інокуляту при визначенні МІК складала $1-2 \cdot 10^5$ колонієутворюючих одиниць на 1,0 мл (КУО/мл) поживного середовища. 96-лункові мікропланшети з культурами бактерій інкубували в аеробних умовах у термостаті за 35–37 °С упродовж 18–24 год. У дослідженні використані тест-мікроорганізми з різною чутливістю до АМП, грампозитивні: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923, *S. aureus* 222, *S. aureus* NCTC 12493, *S. aureus* ATCC 43300; грамнегативні: *Escherichia coli* (*E. coli*) 3, *E. coli* 311, *E. coli* 2104, *E. coli* 2102, *E. coli* 2029, *E. coli* 2025; *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) 449, *P. aeruginosa* 16, *P. aeruginosa* 13 п, *P. aeruginosa* 3844, *P. aeruginosa* 424, *P. aeruginosa* 24.

Використані в дослідженні мікроорганізми виділені від хворих гнійно-запальними захворюваннями й ідентифіковані морфологічними та біохімічними методами (окрім *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* NCTC 12493 та *S. aureus* NCTC 12493).

S. aureus 222 є метицилінрезистентним штамом (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA). Резистентність до метициліну оцінювали згідно з рекомендаціями CLSI [17, 18]. *S. aureus* 222 стійкий до оксациліну, цефокси-

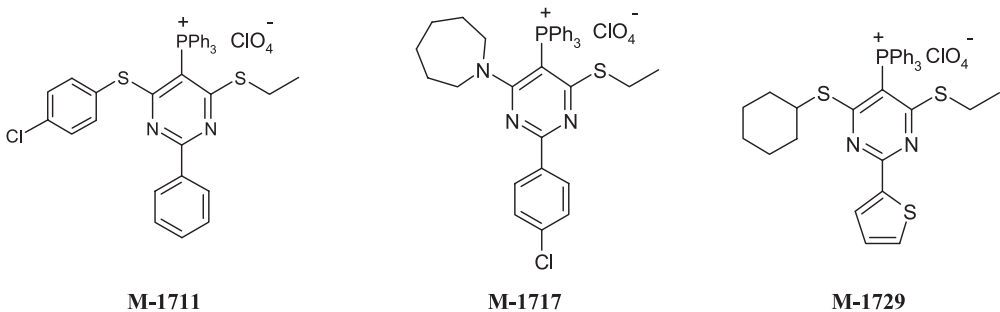


Рисунок. Структура функціоналізованих (піримідин-5-іл)трифенілфосфонієвих солей

тину, чутливий до ванкоміцину та кліндаміцину. У тест-штамі є наявним ген *tesA*, що підтверджено молекулярно-генетичними методами. *S. aureus* NCTC 12493 та *S. aureus* NCTC 12493 – еталонні метицилін-резистентні штами, *S. aureus* ATCC 25923 – еталонний тест-штам, чутливий до метициліну. Клінічні ізоляти *E. coli* та *P. aeruginosa* характеризуються різною чутливістю до АМП.

Усі експерименти проведено в трьох повторях з контролем росту культури (позитивний контроль) і культуральним середовищем (негативний контроль).

Результати та їх обговорення. Дослідження чутливості планктонних клітин бактерій до дії (піримідин-5-іл)трифенілфосфонієвих солей показали, що сполуки виявляють інгібуючу дію щодо стафілококів з різною чутливістю до АМП, значення МІК у діапазоні від 0,195 мкг/мл до 25,0 мкг/мл (табл. 1).

Згідно з отриманими даними, сполуки М-1711, М-1717 і М-1729, як і азитроміцин, виразно інгібують метицилінрезистентний *S. aureus* 222, МІК у межах 0,31–1,56 мкг/мл. За значенням МІК зазначені сполуки переважають дію фторхінолонового антибіотика ципрофлоксацину (МІК 2,0 мкг/мл). Чутливим до дії сполук є також метицилінрезистентний *S. aureus* NCTC 12493, МІК у межах 0,78–25,00 мкг/мл. Щодо чутливості

метицилінрезистентного тест-штаму *S. aureus* ATCC 43300 до дії досліджуваних сполук, то значення МІК дещо вищі і складають 12,5–25,0 мкг/мл.

Досліджувані сполуки виявили також активність і до грамнегативних бактерій кишкової групи – *E. coli* (табл. 2).

Дані дослідження впливу сполук на кишкову паличку свідчать, що їхня активність дещо поступається такій щодо золотистого стафілококу, МІК у межах 2,7–50,0 мкг/мл. За ступенем інгібувального ефекту речовини поступаються дії меропенему.

Для визначення активності (піримідин-5-іл)трифенілфосфонієвих солей щодо синьогнійної палички використано сполуки, які у скринінгових дослідженнях виявили найвиразнішу дію щодо тест-штаму *P. aeruginosa* 449, а саме М-1717 і М-1729.

Згідно з отриманими даними (табл. 3), сполуки М-1717 і М-1729 пригнічують ріст і розмноження всіх тест-штамів синьогнійної палички в межах концентрацій 10,0–100,0 мкг/мл залежно від штаму. Слід відмітити активність досліджуваних сполук щодо полірезистентних штамів, а саме, *P. aeruginosa* 16 і *P. aeruginosa* 24. За вираженістю інгібувальної дії щодо цих мікроорганізмів сполуки переважають ципрофлоксацин, гентаміцин і меропенем (*P. aeruginosa* 24).

Таблиця 1

Антибактеріальна активність функціоналізованих (піримідин-5-іл) трифенілфосфонієвих солей щодо грампозитивних мікроорганізмів

Мікро-організми	Мінімальна інгібуюча концентрація, мкг/мл				
	М-1711	М-1717	М-1729	Ципрофлоксацин	Азитроміцин
<i>S. aureus</i> 222	0,63	1,56	0,31	2,0	0,25
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,195	0,39	0,39	0,25	0,195
<i>S. aureus</i> NCTC 12493	25,0	0,78	0,78	0,063	100,0
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	25,0	25,0	12,5	0,25	200,0

Антибактеріальна активність фосфонієвих солей щодо факультативно анаеробних грамнегативних мікроорганізмів

Мікро-організми	Мінімальна інгібуюча концентрація, мкг/мл					
	М-1711	М-1729	М-1717	Ципро-флоксацин	Гентаміцин	Меропенем
<i>E. coli</i> 311	6,25	2,7	25,0	31,25	1,0	1,0
<i>E. coli</i> 2104	12,5	12,5	25,0	6,25	6,25	1,0
<i>E. coli</i> 2102	12,5	12,5	12,5	6,25	3,12	0,5
<i>E. coli</i> 2029	12,5	12,5	12,5	6,25	3,12	1,0
<i>E. coli</i> 3	50,0	25,0	12,5	6,25	6,25	0,024
<i>E. coli</i> 2025	6,25	6,25	3,12	25,0	0,195	0,024

Таблиця 3

Антибактеріальна активність сполук М-1717 і М-1729 щодо грамнегативних неферментуючих аеробних мікроорганізмів

Мікроорганізми	Мінімальна інгібуюча концентрація, мкг/мл				
	М-1717	М-1729	Ципро-флоксацин	Гентаміцин	Меропенем
<i>P. aeruginosa</i> 449	10,0	10,0	0,5	0,25	4,0
<i>P. aeruginosa</i> 16	25,0	18,75	125,0	200,0	6,25
<i>P. aeruginosa</i> 13 п	100,0	50,0	0,195	0,5	8,0
<i>P. aeruginosa</i> 3844	50,0	37,5	31,3	0,78	6,25
<i>P. aeruginosa</i> 424	12,5	25,0	100,0	32,0	16,0
<i>P. aeruginosa</i> 24	25,0	25,0	31,3	200,0	200,0

Таким чином, проведені дослідження показали, що функціоналізовані (піримідин-5-іл)трифенілфосфонієві солі (М-1711, М-1717 і М-1729) виявляють виразну антимікробну дію щодо збудників гострих запальних процесів – планктонних клітин бактерій. Найчутливішими до дії сполук є грам-позитивні мікроорганізми. За ступенем інгібувальної дії та спектром активності найактивнішими є сполуки М-1717 і М-1729, до дії яких чутливі метицилінрезистентні стафілококи та полірезистентні штами синьогнійної палички. Ці дані є надзвичайно важливими, оскільки *P. aeruginosa* та *S. aureus* віднесено до групи мікроорганізмів з критичним і високим рівнем пріоритету щодо розробки нових ефективних і безпечних лікарських засобів антимікробної дії [6].

Висновки

Дослідження показали, що функціоналізовані (піримідин-5-іл)трифенілфосфонієві солі (М-1711, М-1717 і М-1729) виявляють активність щодо грам-позитивних і грамнегативних мікроорганізмів. Найчутливішими до їхньої дії є *S. aureus*, як метицилін-чутливі, так і метицилінрезистентні штами. Сполуки М-1717 і М-1729 виявляють виразний пригнічувальний ефект щодо чутливих і полірезистентних штамів *P. aeruginosa* та переважають ципрофлоксацин і гентаміцин. Отримані дані свідчать про доцільність подальших поглиблених досліджень сполук М-1717 і М-1729 з метою розробки нового АМП для ефективної фармакотерапії патологій, що спричинені резистентними штамми патогенів.

1. Centers for disease control and prevention, national center for emerging and zoonotic infectious diseases, division of healthcare quality promotion. COVID-19: U.S. Impact on Antimicrobial Resistance, Special Report 2022. 2022. <https://doi.org/10.15620/cdc:117915>.
2. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. C. J. Murray, K. S. Ikuta, F. Sharara et al. *Lancet*. 2022. V. 399. Is. 10325. P. 629–655. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0).
3. Fair R. J., Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem*. 2014. V. 6. P. 25–64. <https://doi.org/10.4137/PMC.S14459>.
4. Prestinaci F., Pezzotti P., Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog. Glob. Health*. 2015. V. 109, No. 7. P. 309–318. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>.
5. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016–2017. Geneva: World Health Organization. 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241513449>.
6. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Geneva: World Health Organization; 2017. URL: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
7. Вринчану Н. О., Бухтіарова Т. А. Проблема резистентності мікроорганізмів – виклик людству. *Фармацевтичний журнал*. 2021. Т. 76, № 1. С. 57–71. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.1.21.07>.
8. Design, synthesis and preliminary evaluation of the cytotoxicity and antibacterial activity of novel triphenylphosphonium derivatives of betululin. M. Grymel, A. Lalik, A. Kazek-Kęsik et al. *Molecules*. 2022. V. 27. P. 5156. .
9. Membrane-targeting triphenylphosphonium functionalized ciprofloxacin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). S. Kang, K. Sunwoo, Y. Jung et al. *Antibiotics*. 2020. V. 9. P. 758.
10. Van Meervelt L., Smolii O. B., Mishchenko N. I. A challenging syntetic approach to phosphonium ylides-betaines of the pyrimidine series. *Tetrahedron*. 1996. V. 26. P. 8835–8852. .
11. Muzychka L. V., Smolii O. B., Drach B. S. Syntheses of functionalized pyrimidines from the products of addition of triphenylphosphoranylideneacetonitrile to acyl isothiocyanates. *J. Gen. Chem*. 2004. V. 74. P. 1115–1121.
12. Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems – susceptibilty testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. Part 1: Reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases (ISO 20776-1:2006). Geneva : ISO, 2006. 19 p.
13. ESCMID – European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2008. (2023b, January 2). eucast: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics. URL: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints.
14. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: методичні рекомендації; під ред. Ю. Л. Волянського, І. С. Гриценко, В. П. Широбокова та ін. Київ, 2004. 38 с.
15. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices Part 1: Broth microdilution reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. (2022, October 25). URL: <https://www.iso.org/standard/70464.html>.
16. Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів»: наказ МОЗ України від 05.04.2007 № 167.
17. CLSI. Performance Standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from Animals. 3rd ed. CLSI supplement VET01S, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015.
18. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute.

Фінансування: роботу виконано за фінансової підтримки Національного фонду досліджень України в рамках проєкту 2021.01/0022.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

І. О. Бойко, Л. В. Музичка, Н. О. Вринчану, О. Б. Смолій
Антимікробна активність функціоналізованих (піримідин-5-іл)
трифенілфосфонієвих солей

Значне поширення антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів, зниження ефективності антимікробної хіміотерапії потребують пошуку нових сполук і розробки препаратів, які здатні інгібувати ріст і розмноження збудників інфекційного процесу.

Мета дослідження – оцінити специфічну антибактеріальну дію функціоналізованих (піримідин-5-іл)трифенілфосфонієвих солей щодо планктонних клітин з різною чутливістю до антимікробних препаратів.

Антимікробну дію (піримідин-5-іл)трифенілфосфонієвих солей щодо планктонних клітин бактерій *S. aureus*, *E. coli* та *P. aeruginosa* вивчали загальноприйнятими методами з визначенням мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Тест-штамами мікроорганізмів були еталонні тест-штами та клінічні ізоляти як чутливі до дії антимікробних препаратів, так і полірезистентні штами.

Отримані результати свідчать, що функціоналізовані (піримідин-5-іл)трифенілфосфонієві солі виявляють активність щодо грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів. До їхньої дії чутливі метицилінрезистентні штами *S. aureus* та полірезистентні штами *P. aeruginosa*. Згідно з отриманими даними, сполуки М-1711, М-1717 і М-1729 виявляють переваги перед азитроміцином щодо метицилінрезистентних тест-штамів *S. aureus* NCTC 12493 та *S. aureus* ATCC 43300. За значенням МІК сполуки переважають дію ципрофлоксацину (МІК 2,0 мкг/мл). Дані дослідження впливу сполук на *E. coli* свідчать про те, що їхня активність дещо поступається такій щодо золотистого стафілококу, МІК у межах 2,7–50,0 мкг/мл. За спектром інгібувальної активності найвиразніший ефект зареєстрований у сполук М-1717 і М-1729.

Таким чином, отримані результати дослідження свідчать про перспективність подальшого фармакологічного вивчення сполук М-1717 і М-1729 з метою оцінки доцільності створення на його основі нового антимікробного препарату.

Ключові слова: антимікробна активність, антибіотикорезистентність, грампозитивні бактерії, грамнегативні бактерії, трифенілфосфонієві солі, піримідини

I. O. Boiko, L. V. Muzychka, N. O. Vrynchanu, O. B. Smolii

Antimicrobial activity of functionalized (pyrimidin-5-yl)triphenylphosphonium salts

A significant spread of antibiotic-resistant strains of microorganisms and a decrease in the effectiveness of antimicrobial chemotherapy require the search for new compounds and the development of drugs that can inhibit the growth and reproduction of pathogens of the infectious process.

The aim of the study is to evaluate the specific antibacterial effect of functionalized (pyrimidin-5-yl)triphenylphosphonium salts against planktonic cells with different sensitivity to antimicrobial drugs.

The antimicrobial effect of functionalized (pyrimidin-5-yl)triphenylphosphonium salts in relation to planktonic cells of bacteria *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* was studied using generally accepted methods with the determination of MIC. Test strains of microorganisms served reference test strains and clinical isolates, both sensitive to the action of antimicrobial drugs and multiresistant strains.

The results obtained indicate that functionalized (pyrimidin-5-yl)triphenylphosphonium salts show activity against gram-positive and gram-negative microorganisms. Methicillin-resistant strains of *S. aureus* and multiresistant strains of *P. aeruginosa* are susceptible to their action. According to data obtained, compounds M-1711, M-1717 and M-1729 show advantages over azithromycin against methicillin-resistant *S. aureus* NCTC 12493 and *S. aureus* ATCC 43300. According to the MIC value, these compounds outweigh the effect of ciprofloxacin (MIC 2.0 µg/ml). The study of the antimicrobial effects of the functionalized (pyrimidin-5-yl)triphenylphosphonium salts on *E. coli* showed, that their activity is somewhat inferior to that against *Staphylococcus aureus*, MIC in the range of 2.7–50.0 µg/ml. According to the spectrum of inhibitory activity, the most pronounced effect was recorded in compound M-1717 and M-1729.

Thus, the data obtained indicate the prospects of further pharmacological study of the compounds M-1717 and M-1729 in order to assess the feasibility of creating a new antimicrobial drug.

Key words: antimicrobial activity, antibiotic resistance, gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, triphenylphosphonium salts, pyrimidines

Надійшла: 22 серпня 2023 р.

Прийнята до друку: 16 жовтня 2023 р.

Контактна особа: Вринчану Ніна Олексіївна, доктор медичних наук, лабораторія фармакології протимікробних засобів, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 78 62.