

УДК [616.98:579.861.2:57.063.8-085.281:546.23:546.16].001.6(045)

## АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФТОРСОДЕРЖАЩЕГО СЕЛЕНООРГАНИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА КЛИНИЧЕСКИЕ ШТАММЫ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

<sup>1</sup>Русецкая Н.Ю., <sup>1</sup>Димидов Д.П., <sup>2</sup>Саратцев А.В., <sup>3</sup>Горошинская И.А., <sup>1</sup>Бородулин В.Б.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России», Саратов, e-mail: rusetskayanu@yandex.ru;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, НИИ молекулярной медицины, Москва;

<sup>3</sup>ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России», Ростов-на-Дону

В работе изучено действие селеноорганического соединения 1,5-ди-(п-фторфенил)-3-селенапентандион-1,5 на штаммы *Staphylococcus aureus*, выделенные от больных с гнойными осложнениями травматолого-ортопедического стационара. Выявлено, что соединение в концентрации 0,0001 мг/мл подавляет рост бактерий на 25–81,7%, в концентрации 0,001 мг/мл – на 41,3–98,6%, а 0,01 мг/мл – на 72–100% в зависимости от времени воздействия (от 30 до 150 минут) по сравнению с контролем. Полное подавление роста колоний золотистого стафилококка отмечалось при концентрациях 1 и 0,1 мг/мл и при длительной инкубации 90–120 минут. Антибактериальная активность исследованного соединения, вероятно, объясняется наличием в его структуре двух атомов фтора, благодаря которым соединение приобретает проокислительные свойства и, как следствие, выраженную антибактериальную активность.

**Ключевые слова:** золотистый стафилококк, селен, антибактериальное действие

## ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF FLUORINATED SELENORGANIC COMPOUND ON THE CLINICAL STRAINS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS

<sup>1</sup>Rusetskaya N.Y., <sup>1</sup>Dimidov D.P., <sup>2</sup>Sarattsev A.V., <sup>3</sup>Goroshinskaya I.A., <sup>1</sup>Borodulin V.B.

<sup>1</sup>Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, e-mail: rusetskayanu@yandex.ru;

<sup>2</sup>First Moscow State Medical University n.a. I.M. Sechenov, Institute of Molecular Medicine, Moscow;

<sup>3</sup>Rostov Research Oncological Institute, Rostov-on-Don

Action of selenorganic compound 1,5-di-(p-fluorophenyl)-3-selenapentadion-1,5 on strains of *Staphylococcus aureus*, selected from patients with purulent complications of a traumatologo-orthopedic hospital is studied. It is revealed, that concentration of compound 0.0001 mg/ml suppresses growth of bacteria on 25–81,7% depending on influence time, 0,001 mg/ml – on 41,3-98,6% and 0,01 mg/ml – on 72–100% depending on influence time (from 30 to 150 minutes) in comparison with control. Full suppression of *Staphylococcus aureus* colonies growth was marked at concentration 1 and 0,1 mg/ml and at incubation time 90-120 minutes. Antibacterial activity of the investigated compound, possibly, is explained by the presence in its structure of two fluorine atoms thanks to which compound gets prooxidant properties and, as consequence, the expressed antibacterial activity.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, selenium, antibacterial activity

Повсеместно увеличивается число инфекций, вызванных патогенными резистентными бактериями. Низкая антимикробная активность лекарственных препаратов (или полное ее отсутствие) обусловлена развитием лекарственной устойчивости к синтетическим антибиотикам или препаратам, полученным из лекарственных растений. В связи с этим синтез и изучение биологической активности новых антимикробных агентов, к которым бы не развивалась лекарственная устойчивость, является чрезвычайно актуальным в современной биологии и медицине. В настоящее время активно изучается биохимия и фармакология селеноорганических соединений. На протяжении нескольких последних лет установлена противоопухолевая, противовирусная, антимикробная, антиоксидантная, антитоксическая активность органиче-

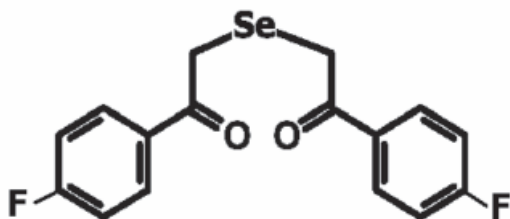
ских соединений селена [1, 3–6]. Например, селеноорганический препарат эбселен (2-фенил-1,2-бензиселеназол-3(2H)-он) обладает антимикробной активностью против грамположительных и грамотрицательных бактерий при низкой концентрации (MIC = 2–32 мкг/мл) [7].

В животноводстве и птицеводстве ряда регионов России в настоящее время применяется селеноорганический препарат диацетофенилселенид (ДАФС-25), который позволяет нормализовать деятельность иммунной, антиоксидантной и детоксицирующей систем организма животных и птиц, приводит к увеличению яичной и мясной продукции [2].

В связи с этим целью работы явилось изучение антимикробного действия фторированного производного диацетофенилселенида на клинические штаммы *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

### Материалы и методы исследования

В эксперименте использовали препарат 1,5-ди-(*p*-фторфенил)-3-селенапентандион-1,5 – фторпроизводное диацетофенилселенида в концентрациях от 0,0001 до 1 мг/мл (рисунком).



Структурная формула исследуемого препарата – 1,5-ди-(*p*-фторфенил)-3-селенапентандион-1,5 (соединение 1)

Препарат любезно предоставлен профессором, докт. хим. наук Б.И. Древки.

Эксперимент проводили на клинических штаммах *S. aureus*. Штаммы бактерий выделяли от больных с гнойными осложнениями, находящихся на лечении в травматолого-ортопедическом стационаре Саратовского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии (СарНИИТО). Видовую идентификацию штаммов проводили на основании изучения фенотипических свойств. Бактерии обладали резистентностью к пяти и более профильным антибиотикам: бета-лактамам (цефалоспорины 1–2 поколения, оксациллин, метициллин), макролидам (эритромицин), фторхинолонам (ципрофлоксацин, левофлоксацин), аминогликозидам (гентамицин) и ванкомицину.

Суспензию бактерий готовили по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича, путём последовательных разведений до конечной концентрации бактерий –  $3 \cdot 10^5$  клеток в 1 мл.

1 мг соединения растворяли в 100 мкл ДМФА (диметилформамида), добавляли 900 мкл 0,9%-го NaCl – проба 1 (1 мг/мл). В качестве контроля использовали 1 мл ДМФА + 9 мл 0,9%-го NaCl. Затем из пробы 1 отбирали 100 мкл, добавляли 900 мкл из контрольной пробирки, получая пробу 2 (0,1 мг/мл). Из пробы 2 отбирали 100 мкл содержимого, добавляли 900 мкл из контроля, получая пробу 3 (0,01 мг/мл). Из пробы 3 отбирали 100 мкл раствора, добавляли 900 мкл из контроля, получая пробу 4 (0,001 мг/мл).

В пробирки с разведениями препарата добавляли по 100 мкл конечной суспензии ( $3 \cdot 10^5$  КОЕ/мл) микроорганизмов, встряхивали и инкубировали в течение 30, 60, 90, 120, 150 мин при комнатной температуре.

В качестве контроля использовали такие же количества бактериальной взвеси, разведенные в аналогичных пропорциях с контролем (ДМФА с 0,9%-м NaCl), а также выдержанные в течение тех же промежуточных времени. После этого бактериальные взвеси из каждой пробирки в количестве 100 мкл высевали на чашки Петри с твердой питательной средой (мясопептонный агар), которые затем помещали в термостат на 24 часа при 37°C. Подсчет колоний производили на следующий день.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли при помощи пакета программ

Statistica 6.0. Проверяли гипотезы о виде распределений (критерий Шапиро–Уилкса). Большинство данных не соответствуют закону нормального распределения, поэтому для сравнения значений использовался U-критерий Манна–Уитни, на основании которого рассчитывался Z-критерий Фишера и показатель достоверности *p*. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05.

### Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что характер влияния изученного соединения на рост колоний клинических штаммов *S. aureus* и выраженность антибактериального эффекта зависят от концентрации препарата и времени воздействия на бактериальную взвесь.

Соединение проявляло выраженную антибактериальную активность в широком диапазоне концентраций (от 1 до 0,0001 мг/мл) при разном времени инкубации (30–150 минут).

В минимальной концентрации 0,0001 мг/мл исследованное соединение подавляло рост колоний клинических штаммов *S. aureus* при разном времени инкубации: на 25,4% (30 минут), 33,6% (60 минут), 61,4% (90 минут), 66,4% (120 минут), 81,9% (150 минут) соответственно по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ) (таблица).

В концентрации 0,001 мг/мл данное соединение проявляло более выраженные антибактериальные свойства, снижая рост колоний золотистого стафилококка на 41,3% (30 минут), 50,1% (60 минут), 76,3% (90 минут), 87,0% (120 минут) и на 98,6% (150 минут) соответственно ( $p < 0,001$ ).

При более высокой концентрации 0,01 мг/мл соединение значительно подавляло рост колоний *S. aureus* при разном времени инкубации на 72,9% (30 минут) ( $p < 0,05$ ), 77,4% (60 минут), 86,2% (90 минут), 98,7% (120 минут), а при максимальной времени инкубации 150 минут исследованный препарат полностью подавлял рост колоний *S. aureus* ( $p < 0,001$ ).

Изученное соединение как антибактериальный агент было наиболее эффективно в отношении клинических штаммов *S. aureus* в высоких концентрациях 1 и 0,1 мг/мл. В этих концентрациях при инкубации 90–120 минут не наблюдалось роста бактерий, а при инкубации 30 и 60 минут отмечалось значительное уменьшение числа клеточных колоний на 92,3% (30 минут), 99,7% (60 минут) в концентрации 0,1 мг/мл и на 91,9% (30 минут), 97,6% (60 минут) в максимальной концентрации 1 мг/мл (см. табл. 1).

Следовательно, исследованное соединение 1,5-ди-(*p*-фторфенил)-3-селена-

пентандион-1,5 оказывало значительное антимикробное действие даже в низких концентрациях и краткосрочной инкубации. Антибактериальная активность этого препарата возрастала с увеличением концентрации препарата и времени инкубации.

#### Антибактериальное действие соединения 1 на клинические штаммы *S. aureus*

		Количество колоний на твердых питательных средах, КОЕ					
		Контроль (ДМФА и физ. р-р)	Опытные группы, концентрация вещества, мг/мл				
			1	0,1	0,01	0,001	0,0001
Время воздействия, мин	30	959 (895; 980)	78 (56; 104) $Z_k = 3,77$ ; $p_k = 0,000157$	74 (45; 208) $Z_k = 3,77$ ; $p_k = 0,000157$	260 (159; 278) $Z_k = 3,09$ ; $p_k = 0,001940$	563 (563; 590) $Z_k = 3,47$ ; $p_k = 0,000507$	715 (487; 895) $Z_k = 2,34$ ; $p_k = 0,01911$
	60	866 (785; 905)	21 (0; 54) $Z_k = 3,77$ ; $p_k = 0,000157$	3 (0; 19) $Z_k = 3,77$ ; $p_k = 0,000157$	196 (102; 328) $Z_k = 3,09$ ; $p_k = 0,001940$	432 (342; 459) $Z_k = 3,77$ ; $p_k = 0,000157$	575 (414; 784) $Z_k = 2,41$ ; $p_k = 0,01556$
	90	891 (769; 1148)	0 (0; 3) $Z_k = 3,77$ ; $p_k = 0,000157$	0 (0; 8) $Z_k = 3,77$ ; $p_k = 0,000157$	123 (74; 279) $Z_k = 3,77$ ; $p_k = 0,000157$	211 (115; 387) $Z_k = 3,51$ ; $p_k = 0,000440$	344 (261; 632) $Z_k = 3,17$ ; $p_k = 0,00149$
	120	875 (794; 1134)	0 (0; 0) $Z_k = 3,77$ ; $p_k = 0,000157$	0 (0; 0) $Z_k = 3,77$ ; $p_k = 0,000157$	11 (2; 34) $Z_k = 3,77$ ; $p_k = 0,000157$	114 (18; 289) $Z_k = 3,77$ ; $p_k = 0,000157$	294 (118; 451) $Z_k = 3,17$ ; $p_k = 0,00149$
	150	904 (898; 985)	0 (0; 0) $Z_k = 3,77$ ; $p_k = 0,000157$	0 (0; 0) $Z_k = 3,77$ ; $p_k = 0,000157$	0 (0; 0) $Z_k = 3,77$ ; $p_k = 0,000157$	13 (9; 98) $Z_k = 3,77$ ; $p_k = 0,000157$	163 (87; 321) $Z_k = 3,70$ ; $p_k = 0,00021$

Примечания: в каждом случае приведены средняя величина (медиана – Me), нижний и верхний квартили (25;75 %).  $Z_k$ ,  $p_k$  – различия по сравнению с группой контроля.

#### Заключение

В результате проведенных экспериментов было выявлено выраженное антибактериальное действие соединения 1,5-ди-(п-фторфенил)-3-селенапентандион-1,5 (фторированное производное диацетофенонилселенида) на клетки клинических штаммов *S. aureus*. Значительно уменьшалось число колоний на твердых питательных средах при использовании низких концентраций вещества. Полученные данные позволяют предполагать перспективность использования данного соединения как антибактериального средства в отношении антибиотикорезистентных штаммов *S. aureus*.

Антибактериальная активность исследованного соединения 1, вероятно, объясняется наличием в его структуре двух атомов фтора, благодаря которым этот препарат приобретает токсичность,

проокислительные свойства и, как следствие, выраженную антибактериальную активность.

Авторы выражают сердечную благодарность за помощь в подготовке статьи профессору, доктору химических наук Древки Б.И. и канд. мед. наук Бабушкиной И.В.

#### Список литературы

1. Гоголева И.В., Громова О.А. Селен. Итоги и перспективы применения в педиатрии // Практика педиатра. – 2009. – № 3. – С. 6–9.
2. Патент РФ № 93045743/15, 24.09.1993. Древки Б.И., Антипов В.А., Жуков О.И., Фоменко Л.А., Маркова Л.И., Древки Р.И., Родионова Т.Н., Ефремов В.И., Харченко В.Г. Средство для лечения и профилактики болезней, вызываемых недостаточностью селена в организме сельскохозяйственных животных и птиц // Патент России // 2051681.1996. Бул. № 1.
3. Cao S., Durrani F.A., Rustum Y.M. Selective modulation of the therapeutic efficacy of anticancer drugs by selenium containing compounds against human tumor xenografts // Clin Cancer Res. – 2004. – Vol. 10. – № 7. – P. 2561–2569.

4. Fujisawa S., Kadoma Y. Kinetic studies of the radical-scavenging activity of ebselen, a seleno-organic compound // *Anticancer Res.* – 2005. – Vol. 25. – № 6. – P. 3989–3994.

5. Holl V., Coelho D., Silbernagel L., Keyser J.F., Waltzinger C., Dufour P., Bischoff P.L. Prevention of nitrogen mustard-induced apoptosis in normal and transformed lymphocytes by ebselen // *Biochem. Pharmacol.* – 2000. – Vol. 60. – № 11. – P. 1565–1577.

6. Inglot A.D., Młochowski J., Zielińska-Jencyzyk J., Piasecki E., Ledwoń T.K., Kloc K. Seleno-organic compounds as immunostimulants: an approach to the structure-activity relationship // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. – 1996. – Vol. 44. – № 1. – P. 67–75.

7. Młochowski J., Kloc K., Lisiak R., Potaczek P., and Wojtowicz H. Developments in the chemistry of selenaheterocyclic compounds of practical importance in synthesis and medicinal biology // *Issue in Honor of Prof. Jan Epsztajn. Arkivoc.* – 2007. – Vol. 6. – P. 14–46.

### References

1. Gogoleva I.V., Gromova O.A. *Practikahediatra – Practice of the podiatrist*, 2009, pp. 6–9.

2. The patent of the Russian Federation № 93045743/15, 24.09.1993. Drevko B.I., Antipov V.A., Zhukov O.I., Fomenko L.A., Markova L.I., Drevko R.I., Rodionova T.N., Efremov V.I., Kharchenko V.G. *The Patent of Russia*. no. 2051681. 1996. *Bulletin* no. 1.

3. Cao S., Durrani F.A., Rustum Y.M. Selective modulation of the therapeutic efficacy of anticancer drugs by selenium containing compounds against human tumor xenografts // *Clin Cancer Res.* 2004. Vol. 10. no. 7. pp. 2561–2569.

4. Fujisawa S., Kadoma Y. Kinetic studies of the radical-scavenging activity of ebselen, a seleno-organic compound // *Anticancer Res.* 2005. Vol. 25. no. 6. pp. 3989–3994.

5. Holl V., Coelho D., Silbernagel L., Keyser J.F., Waltzinger C., Dufour P., Bischoff P.L. Prevention of nitrogen mustard-induced apoptosis in normal and transformed lymphocytes by ebselen // *Biochem. Pharmacol.* 2000. Vol. 60. no. 11. pp. 1565–1577.

6. Inglot A.D., Młochowski J., Zielińska-Jencyzyk J., Piasecki E., Ledwoń T.K., Kloc K. Seleno-organic compounds as immunostimulants: an approach to the structure-activity relationship // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. 1996. Vol. 44. no. 1. pp. 67–75.

7. Młochowski J., Kloc K., Lisiak R., Potaczek P., and Wojtowicz H. Developments in the chemistry of selenaheterocyclic compounds of practical importance in synthesis and medicinal biology // *Issue in Honor of Prof. Jan Epsztajn. Arkivoc.* 2007. Vol. 6. pp. 14–46.

### Рецензенты:

Микашинович З.И., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой общей и клинической биохимии № 1, ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону;

Бондаренко Т.И., д.б.н., профессор кафедры биохимии и микробиологии ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону.

Работа поступила в редакцию 03.06.2013.