

## АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ТЕЛЛУРОРГАНИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ НА КЛИНИЧЕСКИЕ ШТАММЫ *ESCHERICHIA COLI*

Русецкая Н.Ю.<sup>1</sup>, Саратцев А.В.<sup>2</sup>, Древки Б.И.<sup>3</sup>, Горошинская И.А.<sup>4</sup>, Бородулин В.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России», Саратов, Россия (410012, г. Саратов, ул. Большая Казачья, 112), e-mail: rusetskayanu@yandex.ru

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России», НИИ молекулярной медицины, Москва, Россия (119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2), e-mail: sarik1@ya.ru

<sup>3</sup>ГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова Минсельхоза России», Саратов, Россия (410012, г. Саратов, Театральная пл., 1), e-mail: drevkobi@mail.ru

<sup>4</sup>ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России», Ростов-на-Дону, Россия (344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14 линия, 63), e-mail: rnioi@list.ru

В работе изучалось антибактериальное действие соединения 1,5-дифенил-3-теллуropентандион-1,5 в концентрациях 0,0001-1 мг/мл и при инкубации 30, 60, 90, 120, 150 минут на клинические штаммы кишечной палочки (*Escherichia coli*), выделенные от больных с гнойными осложнениями, находящихся на лечении в травматолого-ортопедическом стационаре Саратовского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии (СарНИИТО). Теллуropорганический препарат значительно подавлял рост колоний в концентрациях 0,001-1 мг/мл. Антимикробная активность препарата возрастала при увеличении его концентрации и времени инкубации, достигая максимума в концентрациях 0,1-1 мг/мл, когда рост колоний подавлялся полностью. Механизм действия теллуropорганического соединения обусловлен его низкой молекулярной массой, гидрофобностью молекулы и значительной токсичностью, благодаря чему изученное соединение могло легко проникать через липополисахаридный слой внешней мембраны грамотрицательных бактерий и действовать как эффективный антибактериальный препарат.

Ключевые слова: антибактериальное действие, теллуropорганическое соединение, *Escherichia coli*.

## ANTIBACTERIAL ACTION OF TELLUROORGANIC COMPOUND ON CLINICAL STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI*

Rusetskaya N.Y.<sup>1</sup>, Sarattsev A.V.<sup>2</sup>, Drevko B.I.<sup>3</sup>, Goroshinskaya I.A.<sup>4</sup>, Borodulin V.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, Russia (410012, Saratov, B. Kazachya St., 112), e-mail: rusetskayanu@yandex.ru

<sup>2</sup>First Moscow State Medical University n.a. I.M. Sechenov, Institute of Molecular Medicine, Moscow, Russia (119991, Moscow, Trubetskaya St., 8, build. 2), e-mail: sarik1@ya.ru

<sup>3</sup>Saratov State Agrarian University n.a. N.I. Vavilov, Saratov, Russia (410012, Saratov, Theater Sq., 1), e-mail: drevkobi@mail.ru

<sup>4</sup>Rostov Research Oncological Institute, Rostov-on-Don (344037, Rostov-on-Don, 14 lain St., 63), e-mail: rnioi@list.ru

In work was studied the antibacterial effect of compound 1,5-difenil-3-telluropentandion-1,5 in concentration 0,0001-1 mg/ml and at the incubation 30, 60, 90, 120, 150 minutes on clinical strains of *Escherichia coli* extracted from patients with suppurative complications of traumatology and orthopedic hospital. The telluroorganic compound considerably suppressed the growth of colonies in concentration of 0,001-1 mg/ml. Antimicrobial activity of the compound was enhanced at the increase in its concentration and time of incubation, reaching a maximum in concentration of 0,1-1 mg/ml when growth of colonies is inhibited completely. The action mechanism of telluroorganic compound was caused by its low molecular weight, hydrophobic properties of a molecule and considerable toxicity thanks to what the studied compound can easily get through lipopolysaccharide layer of an external membrane of Gram-negative bacteria and operate as an effective antibacterial preparation.

Keywords: antibacterial action, telluroorganic compound, *Escherichia coli*.

В настоящее время в связи с появлением значительного количества штаммов бактерий, резистентных к антибиотикам широкого спектра действия, большую актуальность приобретают синтез новых антибактериальных препаратов и изучение механизмов их

действия. Наиболее перспективными в этом отношении являются органические соединения халькогенов – селена и теллура. На протяжении последнего десятилетия обнаружена антибактериальная активность ряда органических [3] и неорганических [7] соединений теллура. Например, гетероциклические производные дийодида дибензоилтеллура показали антибактериальную активность против грамположительных (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella typhi*) бактерий [3]. Ранее сообщалось, что теллуруорганические соединения, у которых атом теллура расположен у алифатического атома углерода, обладали лучшей активностью, чем соединения, имеющие атом теллура у ароматического кольца [3]. Это, вероятно, обусловлено более легким разрывом связи «С-Те» у алифатического атома углерода и последующим освобождением атома теллура в виде неорганического теллурит-аниона ( $\text{TeO}_3^{2-}$ ), который значительно токсичнее своей органической формы [1; 6]. На протяжении последних десяти лет проводится синтез и изучение биологической активности арилалифатических дикетонов, содержащих атомы халькогенов (селена и теллура) у алифатического атома углерода.

В связи с этим целью нашей работы явилось изучение антибактериального действия теллуруорганического соединения 1,5-дифенил-3-теллурупентандион-1,5 на клинические штаммы *Escherichia coli*.

#### Материалы и методы

В эксперименте использовали соединение 1,5-дифенил-3-теллурупентандион-1,5, синтезированное под руководством д.х.н., профессора Б.И. Древко (рис. 1).

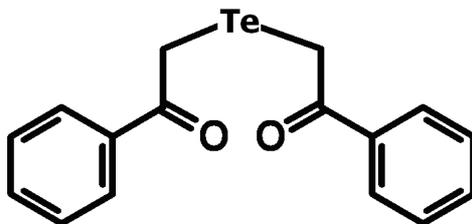


Рис. 1. Структурная формула 1,5-дифенил-3-теллурупентандион-1,5

Эксперимент проводили на десяти таксономически идентичных клинических штаммах *Escherichia coli* (*E. coli*). 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%-ного NaCl - проба 1 (1 мг/мл). В качестве контроля использовали 1 мл ДМФА с добавлением 9 мл 0,9%-ного 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). Из пробы 4 отбирали 100 мкл раствора, добавляли 900 мкл из контроля, получая пробу 5 (0,0001 мг/мл).

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

В качестве контроля использовали такие же количества бактериальной взвеси, разведенные в аналогичных пропорциях с контролем (ДМФА с 0,9%-ным NaCl), а также выдержанные в течение тех же промежутков времени. После этого бактериальные взвеси из каждой пробирки в количестве 100 мкл высевали на чашки Петри с твердой питательной средой (мясо-пептонный агар), которые затем помещали в термостат на 24 часа при 37 °С. 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 и их обсуждение**

Теллуруорганический препарат 1,5-дифенил-3-теллуropентандион-1,5 оказывал выраженную антибактериальную активность на клинические штаммы *E. coli* в концентрациях 0,0001-1 мг/мл. В минимальной концентрации 0,0001 мг/мл соединение не вызывало значительного подавления роста клеток кишечной палочки (таблица 1). В данной концентрации препарат достоверно подавлял рост колоний при инкубации 90 минут (на 23,9%) и 120 минут (на

21,8%). При других режимах инкубации с исследованным соединением рост колоний кишечной палочки не отличался достоверно от контроля.

**Таблица 1. Антибактериальное действие теллуруорганического соединения на клинические штаммы *E. coli***

		Количество колоний на твердых питательных средах					
		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	906 (806;978)	1(0;8) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$ .	67(28;453) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$	385(367;453) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$ .	562(458;567) $Z_k=3.51$ ; $p_k=0.000440$ .	872(845;897) $Z_k=0.90$ ; $p_k=0.364347$ .
	60	903 (867;1011)	0(0;0) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$ .	4(0;71) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$	304(209;390) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$ .	547(467;601) $Z_k=3.62$ ; $p_k=0.000285$ .	776(549;876) $Z_k=1.96$ ; $p_k=0.049367$ .
	90	938 (867;1045)	0(0;0) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$ .	0(0;0) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$	266(107;376) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$ .	385(311;483) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$ .	713(598;906) $Z_k=2.19$ ; $p_k=0.028366$ .
	120	926 (789;995)	0(0;0) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$ .	0(0;0) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$	178(84;205) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$ .	390(267;534) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$ .	724(503;892) $Z_k=2.19$ ; $p_k=0.028366$ .
	150	936 (879;1067)	0(0;0) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$ .	0(0;0) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$	67(29;206) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$ .	202(167;278) $Z_k=3.77$ ; $p_k=0.000157$ .	729(564;894) $Z_k=1.88$ ; $p_k=0.058878$

**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

При низкой концентрации 0,001 мг/мл теллуруорганическое соединение эффективно подавляло рост бактериальных колоний: на 37,9% (30 минут), 39,4% (60 минут), 58,9% (90 минут), 57,9% (120 минут), 78,4% (150 минут) соответственно по сравнению с контролем ( $P<0,001$ ).

В концентрации 0,01 мг/мл соединение 1 оказывало сравнительно большее антибактериальное действие, уменьшая число бактериальных колоний на 57,5% (30 минут), 66,3% (60 минут), 71,6% (90 минут), 80,8% (120 минут), 92,8% (150 минут) соответственно ( $P<0,001$ ).

Наибольший антибактериальный эффект наблюдался в максимальных концентрациях соединения 1 (1 и 0,1 мг/мл). Теллуруорганическое соединение в концентрации 0,1 мг/мл практически полностью подавляло рост штаммов кишечной палочки, уменьшая число бактериальных колоний на 92,6% при 30-минутной инкубации и на 99,6% при инкубации 60 минут ( $P < 0,001$ ). Более длительные периоды инкубации приводили к полному подавлению роста бактерий ( $P < 0,001$ ).

Максимальная концентрация соединения 1 (1 мг/мл) характеризовалась практически полным отсутствием роста бактериальных клеток кишечной палочки. При минимальной инкубации 30 минут рост бактерий подавлялся на 99,9% ( $P < 0,001$ ), а увеличение времени инкубации приводило к полному прекращению роста бактерий (таблица 1).

Достаточно высокие антибактериальные свойства исследуемого соединения обусловлены токсичностью атома теллура в его составе, который, как предполагается, может освобождаться из соединения с образованием неорганической формы теллура, обладающей большей токсичностью по сравнению с органической формой [6]. По мнению ряда авторов, молекулярные механизмы токсичности соединений теллура определяются сильной окислительной способностью по отношению к свободным тиольным группам в клетке [5; 8; 10] или выработкой супероксидных радикалов в процессе восстановления теллурит-аниона до элементарного теллура бактериальной клеткой ( $Te_3^{2-} + НАДФН + 3 H^+ + 2 O_2 \rightarrow Te^0 + 3 НАДФ^+ + 2 O_2^- + 3 H_2O$ ), что приводит к дисбалансу редокс-системы внутри клетки [4; 9].

Кроме того, необходимо учитывать, что для грамотрицательных бактерий характерно наличие сложной внешней мембраны, основу которой составляет липополисахарид. Липополисахаридный слой практически непроницаем для экзогенных гидрофильных соединений, к которым относится большинство питательных веществ (сахаров, аминокислот) и антибиотиков. Транспорт перечисленных соединений внутрь бактериальной клетки осуществляется через воронкообразные белковые структуры (пориновые каналы), встроенные в липополисахаридный слой.

Гидрофобные соединения (например, антибиотики хинолоны, макролиды и тетрациклины) способны диффундировать через липополисахаридный слой. Гликопептиды и природные пенициллины, которые можно отнести к высокомолекулярным антибиотикам, с трудом проникают через пориновые каналы грамотрицательных бактерий, чем и объясняется природная устойчивость данных микроорганизмов к перечисленным соединениям [2].

### **Заключение**

Можно предположить, что высокая антибактериальная активность теллуруорганического соединения обусловлена, в первую очередь, его физико-химическими свойствами, а именно низкой молекулярной массой, гидрофобностью молекулы и значительной токсичностью,

благодаря чему изученное соединение могло легко проникать через липополисахаридный слой внешней мембраны грамотрицательных бактерий и действовать как эффективный антибактериальный препарат.

*Авторы выражают сердечную благодарность за помощь в подготовке статьи старшему научному сотруднику отдела фундаментальных и клинико-экспериментальных исследований ФГБУ «СарНИИТО» Минздрава России, к.м.н. Бабушкиной И.В.*

### Список литературы

1. Садеков И.Д., Минкин В.И. Специфика реакционной способности теллуриорганических соединений // Успехи химии. - 1995. - Т. 64. - № 6. - С. 527-561.
2. Сидоренко С.В. Место бактерий в живой природе // Инфекции и антимикробная терапия. - 2000. - Т. 2. - № 2. - С. 32-34.
3. Antibacterial activity of some unsymmetrical diorganytellurium (IV) dichlorides / D. Soni, P.K. Gupta, Y. Kumar, T.G. Chandrashekhar // Indian Journal of Biochemistry and Biophysics. - 2005. - Vol. 42. - P. 398-400.
4. Catalases are NAD(P)H-dependent telluritereductases / I.L. Calderón, F.A. Arenas, J.M. Pérez, D.E. Fuentes, M.A. Araya, C.P. Saavedra, J.C. Tantaleán, S.E. Pichuantes, P.A. Youderian, C.C. Vásquez // PLoS ONE. - 2006; 1:e70.
5. Glutathione is a target in tellurite toxicity and is protected by tellurite resistance determinants in Escherichia coli / R.J. Turner, Y. Aharonowitz, J.H. Weiner, D.E. Taylor // Can. J. Microbiol. - 2001. - Vol. 47. - P. 33-40.
6. Sub-acute administration of (S)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate induces toxicity and oxidative stress in mice: unexpected effects of N-acetylcysteine / D.F. Meinerz, B. Comparsi, J. Allebrandt, D.O.C. Mariano, D.B. dos Santos, P.A.P. Zemolin, M. Farina, L.A. Dafre, J.B. Rocha, T. Posser, J.L. Franco // Springerplus. - 2013. - № 2. - P. 182-188.
7. Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance / T.G. Chasteen, D.E. Fuentes, J.C. Tantalean, C.C. Vasquez // FEMS Microbiol Rev. - 2009. - Vol. 33. - P. 820-832.
8. The role of cysteine residues in tellurite resistance mediated by the TehAB determinant / M. Dyllick-Brenzinger, Liu M., T.L. Winstone, D.E. Taylor, R.J. Turner // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2000. - Vol. 277. - P. 394-400.
9. Tremaroli V., Fedi S., Zannoni D. Evidence for a tellurite-dependent generation of reactive oxygen species and absence of a tellurite-mediated adaptive response to oxidative stress in cells of Pseudomonas pseudoalcali genes KF707 // Arch. Microbiol. - 2007. - Vol. 187. - P. 127-135.

10. Turner R.J., Weiner J.H., Taylor D.E. Tellurite-mediated thiol oxidation in Escherichia coli // Microbiology. - 1999. - Vol. 145. - P. 2549–2557.

**Рецензенты:**

Телесманич Н.Р., д.б.н., зам. директора по НИР ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», г. Ростов-на-Дону.

Внуков В.В., д.б.н., профессор, заведующий кафедрой биохимии и микробиологии ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону.