

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ СТЕРЕОІЗОМЕРІВ ПОХІДНИХ ХОЛАНОВОЇ КИСЛОТИ В ПОРІВНЯННІ З ХОЛЕВОЮ КИСЛОТОЮ

Барсук Д. О., Савченко Д. С., Криськів О. С,
Коваленко С. М.

Національний фармацевтичний університет

У статті представлено результати вивчення антимікробної активності ацильованих похідних 3 α та 3 β аміно холанових кислот. Сполуки виявили вищу антимікробну активність у порівнянні з їх попередниками. Наявність та спектр антимікробної активності виявляли методом серійних розведень у щільному поживному середовищі та показали як бактеріостатичний так і бактеріцидний ефекти.

Ключові слова: жовчні кислоти, 3-ацильовані α - та β стереоізомери 3-аміно-7 α ,12 α -дигідрокси-5 β -холанової кислоти, антимікробна активність.

Поява багатьох штамів бактерій з множинною лікарською стійкістю загострила актуальність створення новітніх протимікробних препаратів. Катіонні пептидні антибіотики, що були виділені з різних організмів, отримали значну увагу через їх широкий спектр дії [1]. Як правило, мембрани бактерій були об'єктами дії цих антибіотиків [2]. Серія мембрано-активних катіонних похідних холевої кислоти з антимікробною дією можуть мати спільні аспекти механізму дії з раніше знайденими катіонно-пептидними антибіотиками [3,4]. Бактерицидна дія деяких із цих сполук була виявлена для широкого спектра грам-негативних і грам-позитивних мікроорганізмів, інші похідні холевої кислоти були слабо активні відносно грам-негативних мікроорганізмів, але ефективно проникали через зовнішні мембрани і підвищували чутливість бактерій

до гідрофобних антибіотиків, таких як еритроміцин і рифампіцин. Для охарактеризування сполук групи хоанової кислоти було визначено антибактеріальну активність проти бактерій з множинною лікарською стійкістю, у тому числі як грам-негативних, так і грам-позитивних мікроорганізмів. Крім того, було охарактеризовано здатність усіх похідних жовчних кислот за різним ступенем сенсibiliзації грам-негативних бактерій з множинною лікарською стійкістю. Вищезгадана здатність холевих кислот може бути використана для збільшення сили дії антибіотиків проти цих організмів [5].

Негативною особливістю мембрано-активних протимікробних агентів є частий прояв гемолітичної властивості, що може бути перешкодою для їх широкого практичного застосування [2]. Рівень гемолітичності похідних жовчних кислот варіював від високої гемолітичності до слабкої гемолітичності [3].

Метою роботи було вивчити нові стереомерні сполуки — похідні жовчної кислоти з слабкою гемолітичною активністю та потенційно потужною антимікробною дією [3].

Жовчні кислоти мають супресивну дію на мікрофлору, тому було цікаво дослідити активність похідних раніше синтезованих стереоізомерів α/β -аміно похідних жовчних кислот і з'ясувати вплив таксономічно різних представників мікрофлори [1-9]. Згідно раніше проведеного дослідження відносно оптичної будови і фармакологічної дії α/β -аміно стереоізомерів похідних сполук, було виявлено, що жовчні кислоти змінюють свої фармакологічні властивості в залежності від стерео-конфігурації, через це для продовження аналізу жовчних кислот було взято похідні вже досліджених стереоізомерів амінофункціоналізованої холевої кислоти [10]. 3D структури 3 β -аміно-7 α ,12 α -дигідрокси-5 β -холанової кислоти і 3 α -аміно-7 α ,12 α -дигідрокси-5 β -холанової кислоти представлені на рис. 1 та рис. 2, побудовані за допомогою програми "ChemBioOffice ChemBio3D Ultra 12.0".

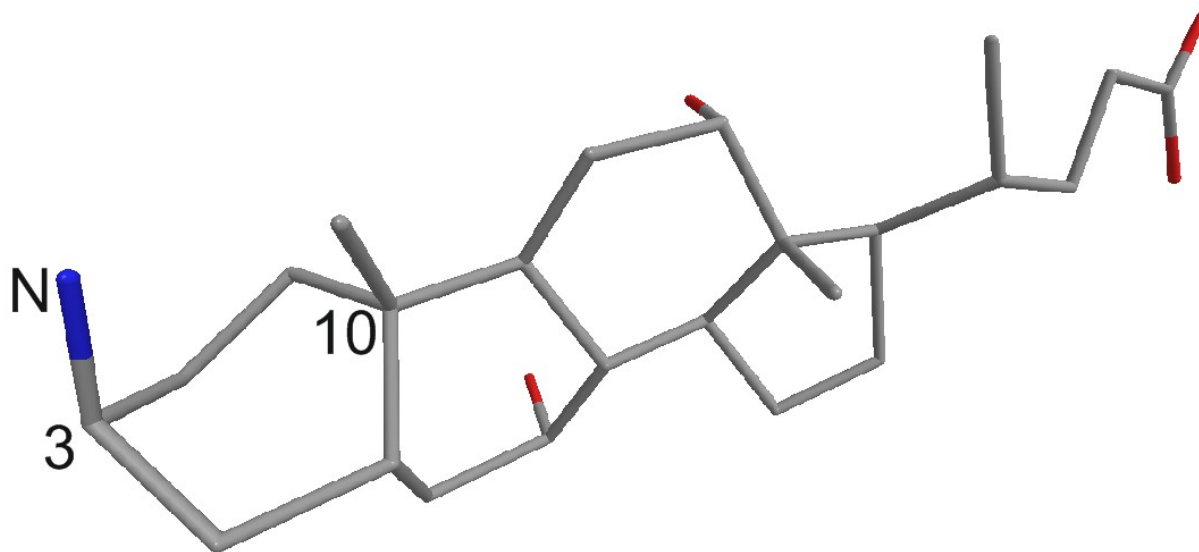


Рисунок 1. Просторова структура 3 β -аміно-7 α ,12 α -дигідрокси-5 β -холанової кислоти

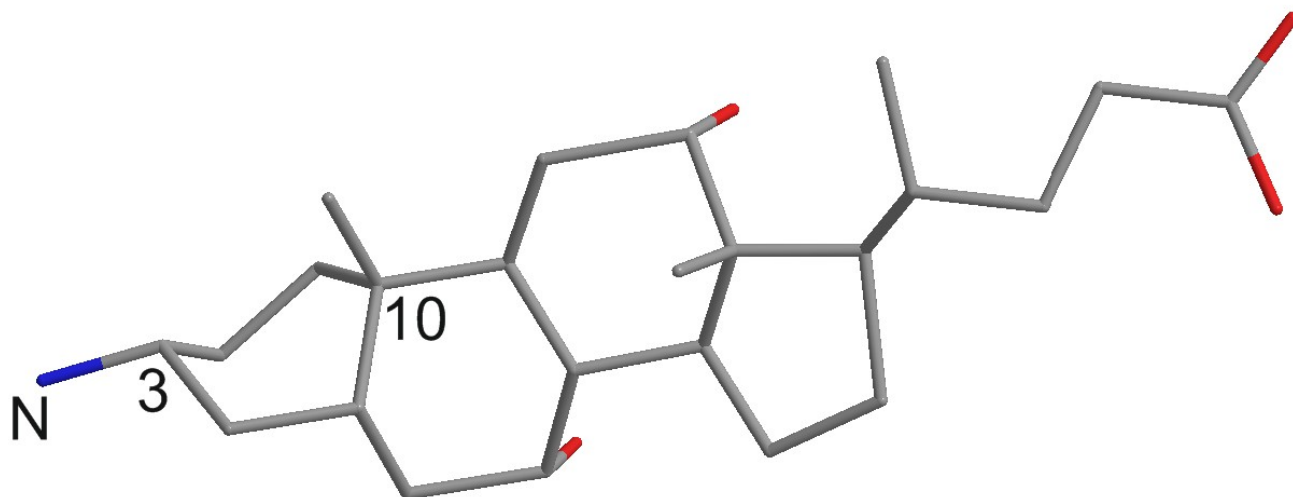


Рисунок 2. Просторова структура 3α-аміно-7α,12α-дигідрокси-5β-холанової кислоти

В 3D-моделі 3β-аміно-7α,12α-дигідрокси-5β-холанова кислота має більш несприятливе положення аміногрупи при 3-му атомі карбону та потребує більш великої кількості енергії активації та жорсткіших умов реакції, ніж 3α-ізомер, що вірогідно може обумовити блокування бактеріального метаболізму. Так реакції за участю 3β-аміногрупи ускладнені через її екранування об'ємним замісником у положенні 10 стеранового фрагменту – групою CH₃ (рис. 1) на відміну від 3α-аміногрупи, яка спрямована у протилежний бік.

Матеріали та методи

Вивчення антибактеріальних властивостей сполук проводили методом дифузії в агар в лабораторії кафедри мікробіології Національного фармацевтичного університету. Відповідно до рекомендацій ВООЗ для оцінки активності препаратів використовували референтні тест-штами: *Staphylococcus aureus* ATCC 26923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 885/653, *Proteus vulgaris* ATCC 4636. Мікробне навантаження складало 1,5x10⁸ мікробних клітин на 1 мл середовища та встановлювалось за стандартом (0.5)McFarland. В роботі використовували 18-24 годинну культуру мікроорганізмів. Для досліджень використовували агар Мюллер-Хінтона (Дагестанський НДІ поживних середовищ). За методикою «колодязів» проводили визначення антибактеріальної активності на двох шарах щільного живильного середовища, розлитого в чашки Петрі. У нижньому шарі використовували «голодні» не засіяні середовища, складові: агар-агар, вода, солі. Нижній шар представляє собою підкладку висотою 10 мм, на яку горизонтально встановлювали 3-6 тонкостінних циліндрів з неіржавкої сталі діаметром 8 мм і висотою 10 мм. Навколо циліндрів заливали верхній шар, що складався з живильного агаризованого середовища, розплавленого та охолодженого до 40-45 °С, в яке вносили відповідну дозу добової культури тест-мікроба. Попередньо верхній шар добре перемішувався до утворення однорідної суспензії. Після застигання верхнього шару циліндри стерильним пінцетом витягали з лунки, що утворилась, вносили випробовану речовину з урахуванням її об'єму. Діаметр

середовища для верхнього шару коливався від 14 до 16 мм. Чашки підсушували 30-40 хвил. при кімнатній температурі та ставили в термостат при температурі 37±0,5 °С впродовж 18-24 годин для бактерій, для дріжджоподібного гриба *Candida albicans* – протягом 24-48 годин. Вихідний «стандарт» мікробної суспензії становив 1,5 x 10⁸ мікробних клітин в 1 мл. При оцінці антибактеріальних властивостей враховували наступні критерії:

- відсутність зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунки, а також зони затримки до 10 мм оцінювали як показник нечутливості мікроорганізмів до внесеного в лунку зразку речовини;
- зони затримки росту діаметром 10-15 мм оцінювали як малу чутливість культури до випробовуваної концентрації антибактеріальної речовини;
- зони затримки росту діаметром 15-25 мм оцінювали як показник помірної чутливості мікроорганізму до досліджуваного зразку речовини;
- зони затримки росту, діаметр яких перевищує 25 мм, оцінювали як показник високої чутливості мікроорганізмів до досліджуваного зразку речовини.

Кількісну оцінку антимікробної дії визначали методом серійних розведень. Сутність методу полягає у визначенні мінімальної пригнічуючої концентрації (МПК), що характеризує бактеріостатичні властивості об'єктів дослідження. В першу пробірку вносили концентрацію досліджуваної речовини у бульоні, яка складала 1000,0 мкг/мл, потім потім методом послідовних розведень знижували кожен наступну концентрацію. Експериментальна концентрації речовин складали 1) 500,0 мкг/мл; 2) 250,0 мкг/мл; 3) 125,0 мкг/мл; 4) 62,5 мкг/мл; 5) 31,2 мкг/мл; 6) 15,6 мкг/мл; 7) 7,8 мкг/мл; 8) 3,9 мкг/мл; 9) 2,0 мкг/мл; 10) 1,0 мкг/мл. В кожен пробірку вносили 0,1 мл мікробних клітин тест-штамів (*S. aureus* ATCC 26923, *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. albicans* ATCC 653/885, *P. vulgaris* ATCC 4636). Культивували при температурі (37±0,5)°С впродовж 24-48 год. В пробірках із найбільшим розведенням речовини, де був відсутній ріст (немає помутніння), визначали їх МПК. З останніх 3-х пробірок, в яких не було ознак росту тест-штама, робили висів на

поживний агар і визначали МБК (мінімальну бактерицидну концентрацію) [11-13].

Вихідні речовини (похідні 3 α - та 3 β -аміно-7 α -12 α -дигідрокси-5 β -холанові кислоти) були отримані

шляхом послідовного стереохімічного синтезу у лабораторії Національного фармацевтичного університету. Основні структурні фрагменти подані на рисунку 3.

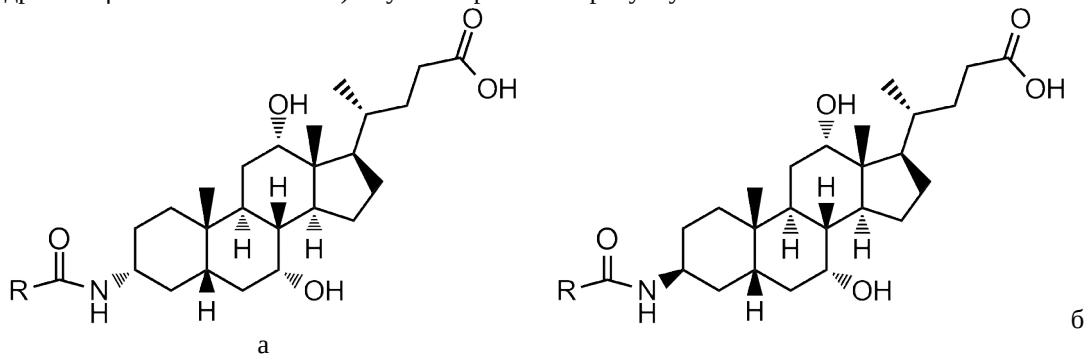


Рисунок 3. Основні структурні фрагменти похідних 3 α -амінохоланових кислот(а) та 3 β -амінохоланових кислот.

Назви речовин та структури замісників подані у таблиці 1. Статистичну обробку проводили за допомогою програми Microsoft Excel 2007

Таблиця 1-Будова R-3 α / β -аміно-7 α ,12 α -дигідрокси-5 β -холанових кислот з поданими замісниками

Назва сполук	Структура замісника R(Ch - місце з'єднання з кислотою)
N(4-хлорфеніл)-3 β - та N(4-хлорфеніл)-3 α -аміно-7 α ,12 α -дигідрокси-5 β -холанова кислоти(β 4Cl-Ph, α 4Cl-Ph)	
N(3,4-диметилфеніл)-3 β - та N(4-хлорфеніл)-3 α -аміно-7 α ,12 α -дигідрокси-5 β -холанова кислоти(β 3,4(Me) ₂ Ph, α 3,4(Me) ₂ Ph)	
N(циклобутил)-3 β та N(циклобутил)-3 α -аміно-7 α ,12 α -дигідрокси-5 β -холанова кислоти(β CyclBut, α CyclBut)	
N(3-метилфеніл)-3 β - та N(3-метилфеніл)-3 α -аміно-7 α ,12 α -дигідрокси-5 β -холанова кислота(β 3Me-Ph, α 3Me-Ph)	

Результати і обговорення

Для порівняння впливу просторової конфігурації на антимікробну дію речовин було використано 8 сполук (4 α -стереоізомери та 4 β -стереоізомери) з однаковими замісниками, що були отримані синтезом відповідної α / β -аміно холанової з відповідними ацилхлоридами. На рис 3 наведено структури самих 3 α / β аміно-7,12-дигідроксихоланових кислот.

Подані у табл. 2 результати антимікробної активності свідчать, що усі досліджувані препарати характеризуються широким спектром антибактеріальних властивостей у відношенні штамів різних таксономічних груп бактерій та грибів *S. albicans* та вищим ступенем затримки росту порівняно з їх 3 α / β попередниками [10]. Всі досліджувані зразки виявили різні спектри дії, але абсолютно превалюючої субстанції встановлено не було.

Таблиця 2-Антимікробна активність субстанцій щодо бактерій та грибів

Субстанції	Тест культури, Діаметри зон затримки росту мікроорганізмів, мм					
	<i>Staphylococcus aureus</i> АТСС 26923	<i>Escherichia coli</i> АТСС 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> АТСС 27853	<i>Proteus vulgaris</i> АТСС 4636	<i>Bacillus subtilis</i> АТСС 6633	<i>Candida albicans</i> АТСС 653/885
β4Cl-Ph	24.40±1.10	23.30±1.2	16.40±1.1	21.50±1.2	22.70±1.1	21.60±0.45
β3,4(Me)₂Ph	31.30±0.8	28.20±1.0	15.40±0.7	21.30±1.2	23.40±1.2	22.00±0.5
βCyclBut	26.40±1.0	26.10±1.1	16.70±1.1	27.10±1.0	26.50±1.2	24.60±1.1
β3Me-Ph	32.30±1.3	24.70±0.9	18.40±0.9	23.60±0.9	27.10±1.2	25.10±1.1
α4Cl-Ph	22.00±0.9	25.30±1.2	17.10±0.95	19.60±0.95	17.50±1.05	20.10±1.15
α3,4(Me)₂Ph	20.10±1.1	26.50±1.1	17.90±1.0	20.20±0.9	19.10±0.7	23.40±1.0
αCyclBut	29.30±1.1	28.70±0.7	19.50±1.1	24.70±1.1	20.40±0.9	27.60±0.9
α3Me-Ph	21.40±1.1	24.90±1.1	16.10±1.0	21.50±0.9	20.70±0.9	23.30±0.8
холева кислота	16.00±0.57	18.20±0.1	17.00±0.7	6.50±0.76	08.50±0.29	09.85±0.46

Примітка. n=3

Майже усі α ізомери виявили слабшу антимікробну дію відносно *P. vulgaris*, *B. subtilis*, *S. aureus* порівняно з їх β аналогами та у абсолютному значенні. Розмір зон затримки росту сполук-ізомерів мав суттєву різницю, їх розбіг коливався у межах 2-9 мм.

Відносно інших штамів ізомери виявили співставний ступінь дії, але слід зауважити, що спостерігалась тенденція зростання активності за відповідну активність холевої кислоти. Дані щодо антибактеріальної дії холевої кислоти співпали з раніше проведеними дослідженнями інших дослідників[9]. Як і було вже раніше продемонстровано, існує різниця у впливі різних ізомерів на мікрофлору[16].

Згідно таблиці 2, на якій проілюстровано вплив різних зразків на тестові штами мікроорганізмів, було встановлено, що до *Candida albicans*, *Escherichia coli* та *Pseudomonas aeruginosa* αCyclBut виявив більший вплив на затримку росту, β3Me-Ph — що до *Bacillus subtilis* та *Staphylococcus aureus*, а βCyclBut — що до *Proteus vulgaris*.

Визначені значення МПК (табл. 3) ілюструють бактеріостатичні властивості наведених сполук по відношенню до аеробних бактерій та грибів, що узгоджується з даними літератури про антимікробну активність похідних жовчних кислот [10].

Таблиця 3-Визначення МПК відносно аеробних бактерій та грибів

Субстанції	Тест культури, МПК, мкг/мл					
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.vulgaris</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C.albicans</i>
β4Cl-Ph	400±21.2	350±11.5	550±23.5	450±10.8	450±14.5	450±18.3
β3,4(Me)₂Ph	250±18.4	300±17.5	500±21.5	400±16.0	400±21.5	400±15.7
βCyclBut	200±17.4	250±19.6	400±14.4	350±15.7	350±22.0	350±18.4
β3Me-Ph	250±23.5	200±19.3	350±21.5	400±15.7	300±18.0	350±15.4
α4Cl-Ph	450±15.8	350±17.5	550±19.1	600±17.4	550±16.2	400±21.1
α3,4(Me)₂Ph	450±13.5	400±18.1	600±17.5	450±18.4	500±16.9	450±17.4
αCyclBut	200±21.5	350±13.5	450±17.4	350±14.4	300±17.4	350±14.8
α3Me-Ph	300±17.5	450±16.0	700±21.5	550±13.5	500±18.3	450±21.5
холева кислота	550±17.4	350±15.3	500±18.5	>1000	>1000	850±13.5

Примітка. n=3

За результатами наших досліджень вдалося підтвердити літературні данні відносно МПК холевої кислоти [9]. Усі зразки проявили бактеріостатичну дію до *P. vulgaris* та *B. subtilis* на відміну від холевої кислоти, а до *C. albicans* значення МПК для всіх речовин були у 2 рази нижче ніж у вихідної холевої кислоти з якої вони були отримані.

Згідно значення МПК для деяких зразків досліджених ізомерів антимікробна дія в 2 рази перевищила дію холевої кислоти. Зважаючи на доволі велику різницю у масах молекул речовин складно порівнювати їх абсолютну ефективність, найменша молекулярна маса у βCyclBut та αCyclBut, відповідно їх МПК був менший. Для усіх сполук, якщо провести порівняння МПК та молекулярної маси,

прослідковується залежність: чим більша маса тим більше МПК. Тому можемо припустити що в перерахунку на кількість речовини, їх антимікробна дія може бути співставною.

Висновки

1. Всі сполуки виявили широкий спектр антимікробної дії та можуть бути використані як потенційні антибактеріальні препарати
2. α CyclBut, β CyclBut, β 3Me-Ph викликали більшу затримку росту мікроорганізмів

References

1. Hancock, R. E. Cationic bactericidal peptides[Text]/ R. E.Hancock, W., Falla, T. M. Brown // *Advances in Microbial Physiology* – 1995 -.37.-P. 135–75.
2. Shai, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides[Text]/ Y. Shai // *Biochimica et Biophysica Acta*-1999- 1462- P. 55–70.
3. Hazra Braja G. Bile acid amides derived from chiral amino alcohols: novel antimicrobials and antifungals [Text]/Braja G. Hazra, Vandana S. Pore, Sanjeev Kumar Dey, Suchitra Datta, Mahendra P. Darokar, Dharmendra Saikia, S.P.S. Khanuja, AnupP. Thakur// *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 14, Issue 3, 9 February -2004-P. 773-777.
4. Design and synthesis of bile acid-based amino sterols as antimicrobial agents [Text]/Nilkanth G. Aher, Vandana S. Pore, Nripendra N. Mishra, Praveen K. Shukla, Rajesh G. Gonnade, // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 19, Issue 18, 15 September 2009 - P. 5411-5414.
5. Erica J. Schmidt, J. Scott Boswell, Joshua P. Walsh, Matthew M. Schellenberg, Timothy W. Winter, Chunhong Li, Glenn W. Allman, and Paul B. Savage/ Activities of cholic acid-derived antimicrobial agents against multidrug-resistant bacteria[Text]// *J. Antimicrob. Chemother.* -2006- 47,-5-P.671-674.
6. Barsuk D. O. Preparation and microbiological activity of derivatives of bile acids [Text]/ Barsuk D. O., Stremouhov A. A. // *Actual questions of pharmacy*, 23-24 Apr. -2009, Kharkiv:NUPh publishing ,p. 27.
7. Silverman J. Bile acids; co-mutagenic activity in the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test: brief communication[Text] / J. Silverman, A. W. Andrews // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2007. – 65. – P. 1557-1559.
8. Antibacterial activity of organometallic complexes of cholic acid.[Text] / Tripathi Kishu, Kumar T. Siva// *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*-2010- Vol. 5, No 3, July-September 2010 - P. 763-770.
9. Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats[Text]/Vicente Lorenzo-Zúñiga, Ramón Bartolí, Ramón Planas, Alan F. Hofmann, Belén Viñado, Lee R. Hagey, José M. Hernández, Josep Mañé, Marco A. Alvarez, Vicente Ausina and Miquel Angel Gassull//, *Hepatology*, March 2007 - V. 37, Issue 3 –P. 551–557.
10. Barsuk D.O.,Antimicrobial activity of cholanic acids' stereoisomers compared to cholic acid on the test cultures of microorganisms/ Barsuk D.O., Stremouhov O.O., Kovalenko S.M.//*Mechnikov's Annals* -2014 -2 - P. 35-39.
11. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement// M100-S9.- 1999.- 19.-1 - P.1-8

12. Sidorenko, S.V. Antibiotic susceptibility testing: disc-diffusion method. Results interpretation. [Text] / Sidorenko S.V., Kolupaev E.V. – М. “Arina”. – 1999. –33 p. – 1000 copies. – ISBN 5-93235-005-9.

13. Guidelines for susceptibility testing of Microorganisms to Antibacterial agents[Text] /Semina N.A., Sidorenko S. V., Rezvan S. P., Grudinina S. A.// *Clin mircobiol antimic therapy.* – 2004.-6-P.10-15.

14. Methodological guidelines "Determination of the sensitivity of microorganisms to antibiotics"// Ministry of Public Health of Ukraine, Kiev – 2007, № MB 9.9.5-143-2007.-P.24

15. Bacteriological control of culture media. //Newsletter Ministry of Public Health of Ukraine № 05.4.1/1670, Kiev, 2001. – 45 p.

UDC 615.281:547.93:547.466

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF STEREOISOMERS of CHOLANIC ACIDS' DERIVATIVES COMPARED TO CHOLIC ACID.

Barsuk D.O., Savchenko D.S., Kryskiv O.S., Kovalenko S.M.

A series of membrane-active cationic derivatives of cholic acid with antimicrobial activity may have common aspects of the action mechanism with previously found cationic-peptide antibiotics. Bactericidal action of some substances was found for a wide range of gram-negative and gram-positive microorganisms, other derivatives cholic acid were weakly active against gram-negative microorganisms, but effectively penetrated through the outer membrane and increased the sensitivity of bacteria to hydrophobic antibiotics. The negative feature of membrane-active antimicrobial agents is a frequent expression of hemolytic properties that may be an obstacle to their regular use. Level haemolyticity of bile acids derivatives ranged from very weakly hemolytic to high hemolytic. The aim of this work was to explore new stereomeric compounds: derivatives of bile acids with weak hemolytic activity and potentially high antimicrobial effect. According to previously conducted research on optical structure and pharmacological action of stereoisomers stereoisomers α / β -amino, it was found that bile acids change their pharmacological properties depending on the stereo-configuration therefore to continue the analysis of bile acid derivatives it were taken already studied stereoisomers amino functionalized cholic acid. In 3D-models of 3 β -amino-7 α , 12 α -dihydroxy-5 β -cholanic acid has a more unfavorable position of the amino group at the 3rd carbon atoms and requires a large amount of activation energy and reaction conditions are more stringent than 3 α -isomer need, so therefore bacterial metabolism blocking is possible through this mechanism. Thus reactions involving 3 β -amino group are complicated because of its shielding by voluminous substituent at 10th position steranic fragment(CH₃ group) in contrast to 3 α -amino which is directed in the opposite direction.

Materials and methods. The antimicrobial activity was measured by the method of serial dilutions in a solid nutrient medium. To compare the effects of spatial configuration on the antimicrobial activity of substances we used 8 compounds (4 α -stereoisomers and 4 β -stereoisomers) with the same substituents, which were

obtained by synthesis of corresponding α/β -amino cholanic acid with acylchloride.

Result and discussions. The results of antimicrobial activity show that all studied drugs can be characterized by a wide spectrum of antibacterial properties against strains of aerobic bacteria and fungi and they have higher rate of growth delay compared to their $3\alpha/\beta$ predecessors. α CyclBut showed a greater influence on growth delay of *Candida albicans*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Almost all of α isomers showed weaker antimicrobial activity against *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* compared with their β analogues and in absolute values.

Conclutions. All compounds have showed a wide range of antimicrobial activity and might be used as potential antibiotics. α CyclBut, β CyclBut, β 3Me-Ph caused the greatest growth delay of microorganisms.

Keywords: bile acid, 3-acylated α - stereoisomers and β 3-amino-7 α , 12 α -dyhydroxy-5 β -cholanic acid antimicrobial activity.