


DOI 10.36074/grail-of-science.22.07.2022.082

# ПОКРОКОВА МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ МІНІМАЛЬНОЇ ІНГІБУЮЧОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ ГІДРОФОБНОЇ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНОЇ СПОЛУКИ МЕТОДОМ РОЗВЕДЕННЯ З БУЛЬЙОНОМ

Людмила Антипенко 

Канд. фарм. наук, науковий фрілансер  
Запоріжжя, Україна

Оксана Ребець 


Завідувач бактеріологічної лабораторії  
Запорізька обласна клінічна лікарня, Україна

Ірина Карнаух

Лаборант-бактеріолог  
Запорізька обласна клінічна лікарня, Україна

Олексій Антипенко 

Канд. фарм. наук, доцент, Кафедра органічної і біоорганічної хімії  
Запорізький державний медичний університет, Україна

Сергій Коваленко 

Доктор фарм. наук, професор, завідувач кафедри  
органічної і біоорганічної хімії  
Запорізький державний медичний університет, Україна

**Анотація.** Враховуючи специфіку наукової роботи під час воєнного стану у місті Запоріжжя, Україна, поблизу зони активних бойових дій, було вирішено запропонувати оптимальний метод визначення мінімальної інгібуючої концентрації нових гідрофобних біологічно активних сполук, який би економив ресурси та час вчених, але відповідав стандартам EUCAST (Європейського комітету з тестування чутливості до антимікробних засобів).

**Ключові слова:** мінімальна інгібуюча концентрація, *S. albicans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *C. albicans*, 4-(5-метил-5,6-дигідротетразоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)бензойна кислота

**Вступ:** З 2007 року основним нормативним документом, який регламентував методи визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків і

містив референтні значення, щодо яких проводилося порівняння та визначення резистентних штамів, був Наказ Міністерства охорони здоров'я (МОЗ) України «Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» від 05.04.2007 року № 167 [1]. Проте, значення щодо медично важливих збудників інфекцій, внесені до цього наказу, суттєво відрізнялися від європейських стандартів чутливості Європейського комітету з тестування антимікробної чутливості (EUCAST) [2]. Так, згідно EUCAST за категоріями чутливості мікроорганізмів до антибіотиків, виділяли «чутливий при підвищеній експозиції» (I), «чутливий у стандартній дозі» (S) та резистентний (R). Вже у 2018 році у МОЗ України був затверджений Наказ «Про внесення змін до додатка 4 до Методики розробки та впровадження медичних стандартів медичної допомоги на засадах доказової медицини» № 1752 від 26.09.2018 року, відповідно до якого перелік джерел клінічних настанов доповнювався матеріалами EUCAST [3]. Більш того, у наступному 2019 році Кабінетом Міністрів України був затверджений «Національний план дії щодо боротьби зі стійкістю до протимікробних препаратів» [4], що привело до визнання у 2021 році низки нормативних документів, в тому числі і Наказу № 167, такими, що втратили чинність [5].

**Мета:** Підтримання стабільності у всіх сферах життя є одним із пріоритетів сьогодення, через те, що на даний час на Україні йде війна з російською федерацією [6]. Незважаючи на те, що максимальні ресурси спрямовані на прискорення перемоги та забезпечення Збройних Сил і безпеки мирного населення, навіть у місті Запоріжжя, яке розташоване на кордоні із зоною активних бойових дій [7], було вирішено продовжити займатися науковою діяльністю та розробляти методику визначення мінімальної інгібуючої концентрації з використанням оптимальної мінімальної кількості реагентів і матеріалів.

**Матеріали та методи:** Метод серійних розведень (2-254 mg/L) на м'ясо-пептонному бульйоні [9], проведений у бактеріологічній лабораторії КНП «Запорізька обласна клінічна лікарня» ЗОР проти *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 F-49, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27863, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* та *Candida albicans* ATCC 885-653 на прикладі нової біологічно активної сполуки, 4-(5-метил-5,6-дигідротетразоло[1,5-с]-хіназолін-5-іл)бензойної кислоти (лабораторний шифр №295), синтезованої на кафедрі Органічної і біоорганічної хімії Запорізького державного медичного університету. Тому що, нещодавно, за допомогою *in silico* молекулярного докінгу було виявлено спорідненість 5,6-дигідротетразоло[1,5-с]хіназолінів до рибосомального 50S білка L2P (PDB ID: 2QEX) [10], що спонукає до перевірки протимікробних властивостей ряду цих сполук.

**Результати та їх обговорення:** Серед стандартизованих методів визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків розрізняють методи серійних розведень та дифузійні [1,8]. Методи серійних розведень базуються на прямому визначенні мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) препарату, яка пригнічує видимий ріст досліджуваного мікроорганізму в бульйонній культурі або на щільному поживному середовищі. Для визначення величини МІК певні

концентрації сполуки вносять у поживне середовище, в яке потім засівають культуру досліджуваного мікроорганізму і після інкубації оцінюють наявність або відсутність видимого росту.

Враховуючи гідрофобні властивості нових синтезованих сполук було вирішено використовувати ДМСО (диметилсульфоксид) у якості первинного розчинника субстанції згідно прикладів EUCAST [11]. Так, для дослідження протигрибкової активності останній рекомендує діапазон концентрацій 0.25-128 mg/L. При цьому для флюканазолу допустимий діапазон концентрацій проти *C. albicans* F 8555: 32-128 mg/L. У нашому випадку експериментально було виявлено, що для визначення нових біологічно-активних сполук ряду 5-феніл-5,6-дигідротетразоло[1,5-с]хіназолінів концентрація 2-254-mg/L є оптимальною, бо для створення комбінаторних бібліотек з відомою *in vitro* активністю, наявність речовин навіть з незначною біологічною дією, покращить майбутній *in silico* дизайн та аналіз кількісного зв'язку структура-активність (QSAR) протимікробних лікарських субстанцій.

Таким чином, пропонується наступна методика визначення МІК з використанням інокулюма, що був отриманий з 3-5 однотипних, чітко ізольованих колоній, які виростили на неселективних щільних середовищах після 16-24 год. інкубації. Кінцевий об'єм суміші було обрано 2 мл для більш кращої інтерпретації результатів.

*Покрокова методика визначення МІК нової гідрофобної біологічно активної сполуки.*

- В одному штативі позначте стерильні пробірки від **1** до **8**; зазначте номер досліджуваної сполуки на пробірці **1**;

- '**початковий розчин сполуки №'** - початковий розчин досліджуваної сполуки із зазначеним її лабораторним номером, якого вистачить для дослідження на 5 культурах;

- '**культура'** – суспензія культури, розведена у 100 разів з мікробіологічної суспензії із стандартною каламутністю за МакФарландом.

- '**КС'** – контроль поживного середовища (м'ясо-пептонний бульйон);

- '**КК'** – контроль росту культури;

- '**ККД'** – контроль росту культури з ДМСО;

- В пробірку '**початковий розчин сполуки №'** додайте 9500 µL бульйону.

- В пробірку '**культура'** додайте 9900 µL бульйону

- В пробірку **КС** додайте 2000 µL бульйону.

- В пробірки **2-8** та **КК** додайте по 1000 µL бульйону.

- В пробірку **ККД** додайте 950 µL бульйону.

- В пробірку **ККД** додайте 50 µL ДМСО.

**Приготування початкового розчину:** Зважте 0,0512 грам досліджуваної сполуки, додайте 5000 µL ДМСО, ретельно розчиніть. З цього розчину 500 µL додайте до підготовленої пробірки '**початковий розчин сполуки №'** з бульйоном. (Концентрація початкового розчину - 512 mg/L (10 mL) для одночасного визначення на 5 культурах.)

- До пробірки **1** додайте 2000 µL "**початкового розчину сполуки №**". (Якщо Ви визначаєте МІК на 5 культурах, то можете додати його у кожен пробірку **1** на різних штативах.)

• Перенесіть 1000  $\mu\text{L}$  з пробірки **1** у пробірку **2**. Ретельно перемішайте вміст цієї пробірки та перенесіть 1000  $\mu\text{L}$  у третю пробірку.

• Продовжуйте розведення так само, включаючи останню пробірку № **8**.

• Видаліть 1000  $\mu\text{L}$  з пробірки **8**, щоб в ній залишився 1 mL.

**Підготовка культури:** Для кожної добової культури необхідно починати з її стандартної каламутності за МакФарландом та розчиняти у 100 разів у ізотонічному розчині натрій хлориду. Інокулюм слід використовувати не пізніше 15 хв. після його приготування.

• Так, до пробірки 'культура' з бульйоном додайте 100  $\mu\text{L}$  суспензії бактеріальної культури (каламутність за МакФарландом бактеріальної суспензії 0,5 ( $1,5 \cdot 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>), та 2,0 - для *S. albicans* ( $6,0 \cdot 10^8$  КУО/см<sup>3</sup>), щоб в результаті отримати 10 mL розчину з  $1,5 \cdot 10^6$  КУО/см<sup>3</sup> для бактерій, та –  $6,0 \cdot 10^6$  КУО/см<sup>3</sup> для *S. albicans*).

• Додайте по 1000  $\mu\text{L}$  розведеної суспензії культури до пробірок **1-8**, **КК**, **ККД** (щоб отримати фінальну концентрацію  $7,5 \cdot 10^5$  КУО/см<sup>3</sup> для бактерій, та  $3,0 \cdot 10^6$  КУО/см<sup>3</sup> для *S. albicans* у 2 mL суміші).

• Інкубуйте пробірки при  $35 \pm 1$  °C протягом 24 год.

• Огляньте пробірки на наявність видимих ознак росту бактерій.

• Сфотографуйте кожен ряд десяти пробірок **1-8**, **КК**, **КС** на темному фоні у світлі, що проходить, як на прикладі (Рис. 1).

• У таблиці зазначте хрестик, де ріст мікроорганізмів (опалесценція) присутня (Табл. 1). Найвище розведення без зростання і є мінімальна інгібуюча концентрація сполуки.

Так, у нашому прикладі, МІК сполуки №295 дорівнює 32 mg/L проти *S. aureus*, 254 mg/L проти *E. coli* та *C. albicans* (Рис.1,2; Табл. 1). Варто зазначити, що для азотмісних сполук у випадку прояву протигрибкової активності, МІК є найнижчою концентрацією препарату, що призводить до пригнічення росту на  $\geq 50\%$  від рівня контролю [11], тобто сполуку №295 слід дослідити детальніше методом дифузії у агар.

Таблиця 1

Приклад зведеної таблиці згідно результатів на Рис. 1.

Номер сполуки	Назва штаму	Номер пробірки / Концентрація сполуки, mg/L								КК	КС
		1	2	3	4	5	6	7	8		
		254	128	64	32	16	8	4	2		
295	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>E. coli</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>K. aerogenes</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>C. albicans</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Концентрація ДМСО у пробірці **ККД** (контролю культури з ДМСО) відповідає концентрації у пробірці **1** у запропонованій методиці, яка надалі зменшується при розведеннях. Так, перевірка впливу 50  $\mu\text{L}$  ДМСО (2,5%) на ріст досліджуваних штамів мікроорганізмів у 2 mL поживної суміші показала їх нечутливість до цього розчинника (Рис. 2). Тобто при повному відтворенні цієї

методику та використанні таких самих штамів, можна виключити пробірку ККД для економії часу та реагентів.

Крім того, у випадку, якщо суміш у пробірці 1, 2, тощо, все ще має опалесценцію внаслідок гідрофобності досліджуваної сполуки при додаванні м'ясо-пептонного бульйону, потрібно зберігати додатковий негативний контроль відповідних розведень у холодильнику (замінити додавання розчину культури на 1000  $\mu\text{L}$  бульйону, щоб мати таку ж фінальну концентрацію) для порівняння оптичної густини до та після додавання інокуляту.

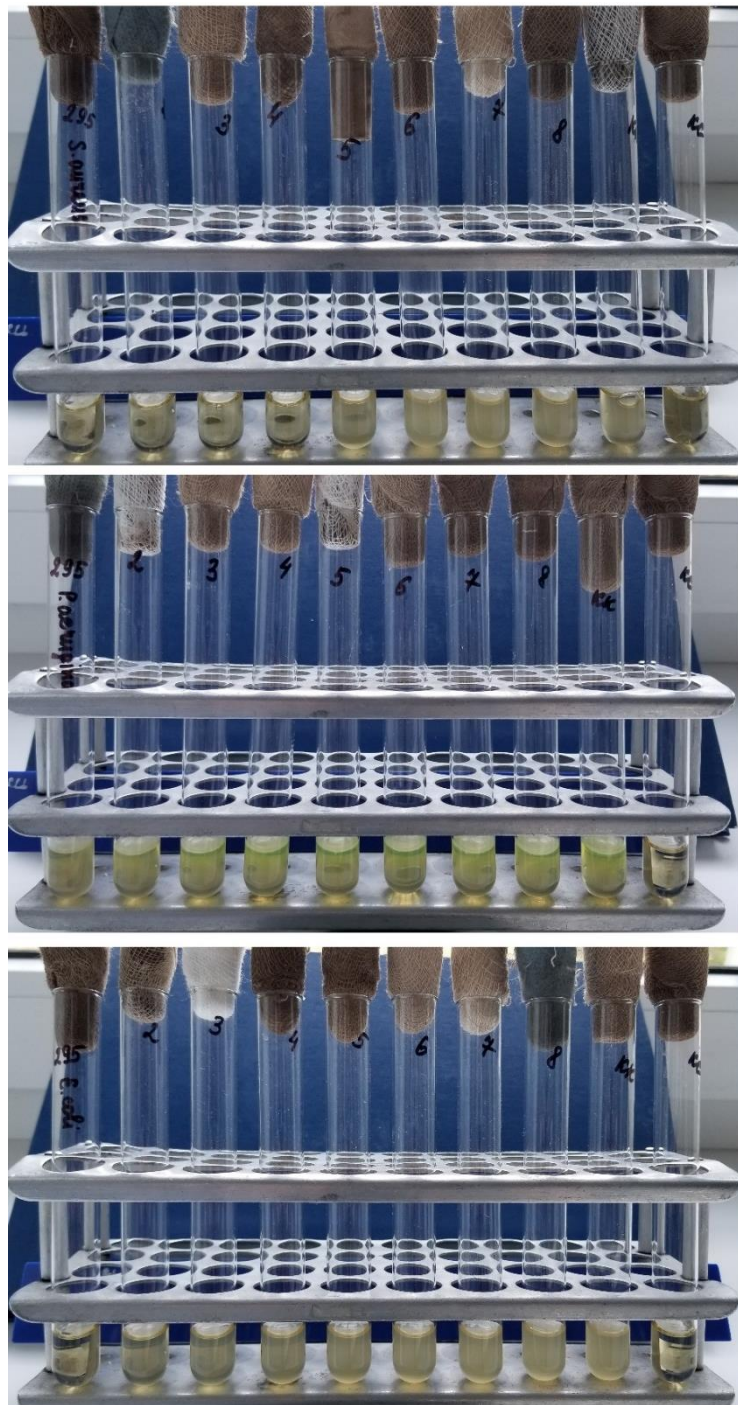


Рис. 1. Визначення МІК сполуки № 295 методом серійних розведень (2-254  $\text{mg/L}$ ) проти *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*



Рис. 2. Визначення МІК сполуки № 295 методом серійних розведень (2-254 mg/L) проти *K. aerogenes* та *S. albicans*; КК – контроль культури, ККД – контроль культури з ДМСО проти усіх досліджуваних мікроорганізмів.

Для додаткового контролю можна висіяти суміш з пробірки, яка викликає сумніви на агар для однозначної перевірки росту культури та проведення більш детальних досліджень [8]. Та кожен дослід необхідно відтворювати якнайменше 2 рази.

**Висновки:** Запропоновано препаративну методику визначення МІК гідрофобних біологічно-активних сполук з використанням оптимальної мінімальної кількості досліджуваної речовини, ДМСО, пробірок, насадок для мікропіпеток та поживного середовища.

Досліджувана сполука, 4-(5-метил-5,6-дигідротетразоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)бензойної кислота, дійсно проявила протимікробні властивості, механізм антибактеріальної дії якої може бути пов'язаний із попередньо розрахованою спорідненістю до рибосомального 50S білка L2P (PDB ID: 2QEX) [10].

**Подяка.** Автори щиро вдячні Збройним силам України та Силам територіальної оборони Збройних сил України за проведення досліджень та підготовку цієї статті у безпечних умовах міста Запоріжжя, Україна.

#### Список використаних джерел:

- [1] “Про затвердження методичних вказівок “Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів”” від 05.04.2007 року. (Наказ Міністерства охорони здоров'я України). №167 (2007). Вилучено з <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0167282-07#Text>.
- [2] EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical breakpoints and dosing of antibiotics. (2022). Retrieved from [https://eucast.org/clinical\\_breakpoints/](https://eucast.org/clinical_breakpoints/).
- [3] “Про внесення змін до додатка 4 до Методики розробки та впровадження медичних стандартів медичної допомоги на засадах доказової медицини” від 26.09.2018 року. (Наказ Міністерства охорони здоров'я України). № 1752. (2018). Вилучено з: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1161-18#Text>.
- [4] «Про затвердження Національного плану дії щодо боротьби зі стійкістю до протимікробних препаратів» від 06.03.2019 року, (Розпорядження Кабінету Міністрів України). № 116-с. (2019). Вилучено з: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/116-2019-%D1%80#Text>.
- [5] «Про внесення змін до Методичних вказівок з мікробіологічної діагностики менінгококової інфекції та бактеріальних менінгітів і визнання такими, що втратили чинність, деяких наказів Міністерства охорони здоров'я» від 03.11.2021 року. (Наказ Міністерства охорони здоров'я України). № 2415. (2021). Вилучено із <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v2415282-21#Text>.
- [6] Російське вторгнення в Україну. (2022). Вилучено з [https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%BE%D1%81%D1%96%D0%B9%D1%81%D1%8C%D0%BA%D0%B5\\_%D0%B2%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%B3%D0%BD%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F\\_%D0%B2\\_%D0%A3%D0%BA%D1%80%D0%B0%D1%97%D0%BD%D1%83\\_\(2022\)](https://uk.wikipedia.org/wiki/%D0%A0%D0%BE%D1%81%D1%96%D0%B9%D1%81%D1%8C%D0%BA%D0%B5_%D0%B2%D1%82%D0%BE%D1%80%D0%B3%D0%BD%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8F_%D0%B2_%D0%A3%D0%BA%D1%80%D0%B0%D1%97%D0%BD%D1%83_(2022)).
- [7] Жнива біля фронту: в яких умовах іде «битва за врожай» на Запоріжжі. (2022). Вилучено з <https://www.radiosvoboda.org/amp/yak-pracuut-agrariy-zaporizhzhya/31937061.html>.
- [8] Kowalska-Krochmal, B., Dudek-Wicher, R. (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics: methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, 10(2), 165.
- [9] EUCAST. MIC determination of non-fastidious and fastidious organisms. (2022). Retrieved from [https://eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/mic\\_determination/](https://eucast.org/ast_of_bacteria/mic_determination/).
- [10] Antypenko, O., Antypenko, L., Kalnysh, D., Kovalenko, S. (2022) Molecular docking of 5-phenyl-5,6-dihydro-tetrazolo[1,5-c]quinazolines to ribosomal 50S protein L2P (2QEX). *Grail of Science*, 12-13, 693-698.
- [11] A EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. (2008). Retrieved from [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)62817-2/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)62817-2/fulltext).