

## ÚČINOK BISKVARTÉRNÝCH AMÓNIOVÝCH SOLÍ NA RAST A METABOLICKÉ PROCESY *SALMONELLA ENTERICA* SUBSPECIES *ENTERICA* SÉROVAR TYPHIMURIUM DT104

TOMÁŠ MAJTÁN<sup>1</sup>, LUBICA MAJTÁNOVÁ<sup>2\*</sup>  
a DUŠAN MLYNARČÍK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ústav molekulárnej biológie SAV, Dubravská cesta 21,  
845 51 Bratislava, <sup>2</sup>Ústav preventívnej a klinickej medicíny,  
Limbová 14, 833 01 Bratislava, <sup>3</sup>Farmaceutická fakulta  
UK, Katedra bunkovej a molekulárnej biológie liečiv, Ka-  
linčiaková 8, 832 32 Bratislava  
majtanova@upkm.sk

Došlo 27.8.02, prepracované 14.10.03, prijaté 21.10.03.

Kľúčové slová: biskvartérne amóniové zlúčeniny,  
<sup>14</sup>C-prekurzory, respirácia, *Salmonella enterica* subspecies  
*Enterica* serovar Typhimurium

### Úvod

V 90. rokoch minulého storočia sa medzinárodne objavili kmene *Salmonella enterica* subspecies *Enterica* serovar *Typhimurium* definitívneho fágotypu 104 (*S. Typhimurium* DT104) ako významná príčina potravou prenášaných ochorení ľudí. Kmene tohto fágového typu sa po prvý raz objavili v Anglicku<sup>1</sup>, ale v nasledujúcich rokoch sa izolovali tiež v ďalších štátoch ako v Nemecku<sup>2</sup>, USA<sup>3</sup>, Kanade<sup>4</sup>, Taliansku<sup>5</sup>, Českej republike<sup>6</sup>, Rakúsku<sup>7</sup> a v Slovenskej republike<sup>8</sup>.

Kmene *S. Typhimurium* DT104 predstavujú klon, ktorý je charakteristický svojou multirezistenciou voči antibiotikám. Väčšina izolátov sa vyznačuje pentarezistenciou voči ampicilínu, chloramfenikolu, streptomycínu, sulfonamidom a tetracyklínu a predstavujú rezistentný typ ACSSuT. Gény kódujúce rezistenciu sú kódované chromozomálne na integrónoch. Okrem charakteristickej pentarezistencie sa vyskytujú aj kmene so zníženou alebo naopak zvýšenou rezistenciou, ale aj kmene citlivé voči antibiotikám.

Biskvartérne amóniové soli (BQAS) patria do skupiny kationových povrchovo aktívnych zlúčenín. BQAS sa zaraďujú k membránovo aktívnym zlúčeninám viažucich sa na cytoplazmovú membránu a ovplyvňujúcich metabolizmus bunky<sup>9-11</sup>. V dôsledku ich povrchovej aktivity boli úspešne použité na elimináciu plazmidov pKM101 a F<sup>+</sup>lac z kmeňov *S. Typhimurium* a *E. coli*<sup>12</sup>.

V článku referujeme o účinku BQAS odvodených od kyseliny L-vínnej na rast, biosyntetické procesy (syntéza nukleových kyselín a proteínov) a na respiráciu buniek multirezistentného kmeňa *S. Typhimurium* DT104.

\*korešpondujúci autor

### Experimentálna časť

#### Bakteriálny kmeň

Kmeň *S. Typhimurium* DT104 bol izolovaný od pacienta s gastroenteritídou a fágotyp bol identifikovaný v Národnom referenčnom centre pre fagotypizáciu salmonel na Ústave preventívnej a klinickej medicíny v Bratislave. Kmeň bol rezistentný voči ampicilínu, chloramfenikolu, streptomycínu, sulfonamidu a tetracyklínu.

#### Študované zlúčeniny

Použili sa chromatograficky čisté biskvartérne amóniové soli homologického radu *N,N'*-bis[2-(alkyldimetylamónio)etyl]amidy kyseliny L-vínnej zosyntetizované doc. Lac-  
kom na Farmaceutickej fakulte UK v Bratislave. Ich štruktúra je znázornená v schéme 1.

Ako kultivačné médium sa použilo minimálne syntetické médium<sup>13</sup> na prípravu bakteriálnych suspenzií na stanovenie antibakteriálnej aktivity, inkorporácie <sup>14</sup>C-prekurzorov a respirácie.

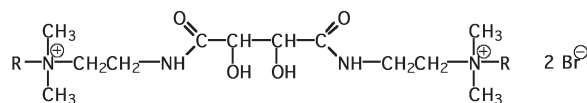


Schéma 1. Štruktúra študovaných zlúčenín

#### Určenie antibakteriálnej účinnosti

Bakteriálna suspenzia sa pripravila z inokula kmeňa *S. Typhimurium* DT104 ( $A_{600} = 0,8$ ) inokulovaním 0,4 ml do 6,5 ml syntetického kultivačného média v L-skúmavkách, ktoré súčasne slúžili ako kyvety na meranie absorbancie. Študované BQAS rozpustené a zriedené do požadovaných koncentrácií v sterilnej destilovanej vode boli pridané v množstve 0,1 ml. Kultivácia prebiehala za podmienok intenzívnej aerácie pri 37 °C, 24 h. Rast sa sledoval spektrofotometricky pri 600 nm (Specol, Carl Zeiss, Jena, Nemecko).

MIC sa určila ako najnižšia koncentrácia látky, ktorá inhibovala rast bakteriálnej kultúry. Hodnoty ED<sub>50</sub> sa vypočítali matematicko-grafickou metódou z rastových kriviek po 8 h kultivácie. Hodnoty ED<sub>50</sub> predstavujú koncentráciu látky, ktorá vyvolala 50% potlačenie rastu.

#### Inkorporácia <sup>14</sup>C-prekurzorov

0,4 ml suspenzie bakteriálneho kmeňa ( $A_{600} = 1,0$ ) sa inokulovalo do 10 ml syntetického média a suspenzie sa in-

kubovali za podmienok intenzívnej aerácie pri 37 °C do logaritmickkej fázy rastu ( $A_{600} = 0,8-1,0$ ). Suspenzia sa rozdelila do skúmaviek po 1 ml, ku ktorej sa pridalo 10  $\mu$ l testovanej zlúčeniny v požadovanej koncentrácii. Zmesi sa predinkubovali 10 min za podmienok intenzívnej aerácie pri 37 °C. Do prvej série skúmaviek, v ktorej sa zistovala inhibícia syntézy nukleových kyselín, sa pridalo 5  $\mu$ l [ $^{14}$ C]adenínu a do druhej série skúmaviek, kde sa sledovala inhibícia syntézy proteínov, sa pridalo 10  $\mu$ l [ $^{14}$ C]leucínu. Inkubácia s prekuzormi trvala 1 h pri 37 °C za podmienok intenzívnej aerácie. Obe série skúmaviek sa potom preniesli na 30 min do ľadového kúpeľa, pričom do každej skúmavky sa pridal 1 ml ľadovej 10% kyseliny trichlóroctovej. Po odstredení sa precipitáty premyli 1 ml ľadovej 5% kyseliny trichlóroctovej. K precipitátom sa po odstredení a odstránení supernatantu pridalo 5 ml scintilačnej kvapaliny a rádioaktívita sa merala na scintilačnom počítači (Rack-Beta, LKB, Švédsko).

## Respirácia

Respirácia sa určila polarograficky použitím Clarkovej elektródy na oxygrafe (Gilson Medical Electronics, Yellow Springs, USA). Nočná kultúra študovaného kmeňa v exponenciálnej fáze rastu ( $A_{600} = 0,8-1,0$ ) sa scentrifigovala, bunky sa premyli dvakrát TRIS – tlmivým roztokom (pH 7,4) a koncentrovali sa na hustotu zodpovedajúcu 80 mg suchej váhy na 1 ml. Do nádoby oxygrafu sa pipetovalo 1,5 ml TRIS – tlmivého roztoku. Spotreba kyslíku sa monitorovala, keď systém dosiahol teplotu 37 °C. Suspenzia buniek bola pridaná za konštantného miešania. Monitorovanie trvalo 10 min a lineárna časť krivky sa použila na výpočet rýchlosti spotreby kyslíku. Rýchlosť respirácie sa vyjadriala v nanomóloch spotrebovaného kyslíku za minútu zodpovedajúcu suchej váhe buniek.

Pri určovaní exogénnej respirácie sa použili nasledovné substráty: glukóza, octan sodný, glycerol, jantaran sodný, glutamát sodný, asparagín, 2-oxoglutarát sodný, pyruvát pripravené ako 0,2 M roztoky v TRIS – tlmivom roztoku (pH 7,4).

## Výsledky a diskusia

Kvartérne amóniové soli (QAS) predstavujú farmaceuticky významnú skupinu zlúčenín s povrchovo aktívnymi, solubilizačnými a antimikrónnymi vlastnosťami. Viazu sa na cytoplazmovú membránu buniek, ktoré týmto spôsobom poškodzujú, a pritom zasahujú do metabolických procesov buniek. Je známe, že biskvartérne amóniové soli (BQAS) sú účinnejšie na gramnegatívne baktérie<sup>14</sup>, avšak v praxi sa uplatňujú prevažne zlúčeniny s relatívne jednoduchou štruktúrou<sup>15</sup>.

Študované BQAS predstavujú deriváty kyseliny L-vínnej s rôznou dĺžkou alkylového reťazca. Ich antibakteriálna aktivita na testovaný multirezistentný kmeň *S. Typhimurium* DT104 vyjadrená hodnotami MIC a ED<sub>50</sub> je znázornená v tab. I. V rámci homologického radu BQAS boli na testovan

vaný kmeň najúčinnejšie látky substituované dodecylom (MIC = 3,125–6,25  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) a tetradecylom (MIC = 6,25–12,5  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>), čo korelovalo aj s hodnotami ED<sub>50</sub>. Látka substituovaná najkratším alkylom – oktylom – bola na testovaný kmeň neúčinná. Hodnota jej MIC bola vyššia ako 400  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>. Pri hodnotení antibakteriálnej aktivity sa prejavil „cut-off“ efekt, keď so zväčšujúcim sa alkylom rástla antimikrónna aktivita až po optimum. Ďalším predĺžovaním alkyly však antimikrónna aktivita klesala. Tento efekt je známy pri rozličných typoch zlúčenín a dokázal sa aj v homologických radoch kvartérnych mono- aj bisamóniových zlúčenín na viacerých bakteriálnych kmeňoch<sup>10,11,15-18</sup>. Rovnako sa menili hodnoty ED<sub>50</sub>, ktoré sú presnejšie pri určovaní antimikrónnej aktivity ako MIC, pretože sa určujú po 8-hodinovej submerznej kultivácii, t.j. v priebehu exponenciálnej fázy rastu. Podobne ako popísali

Tabuľka I

Antibakteriálna účinnosť bisamóniových solí na *S. Typhimurium* DT104

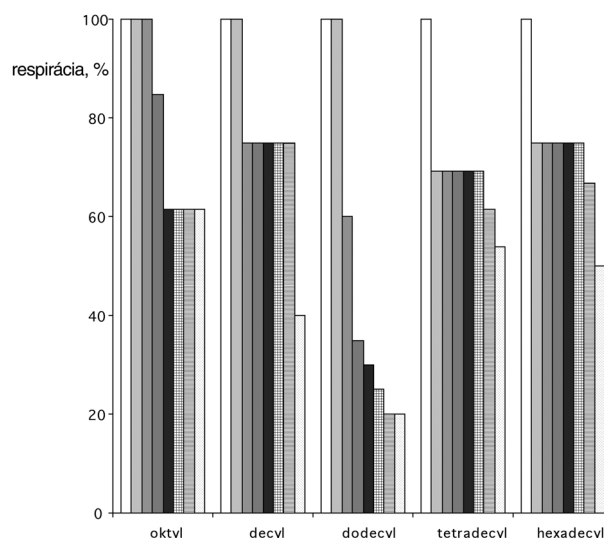
Číslo	Alkyl	Antibakteriálna účinnosť [ $\mu$ g.ml <sup>-1</sup> ]	
		MIC	ED50
1	oktyl	> 400	–
2	decyl	12,5–25	20,323
3	dodecyl	3,125–6,25	2,113
4	tetradecyl	6,25–12,5	8,851
5	hexadecyl	50–100	45,186

Majtán a Majtánová<sup>11</sup> pri hodnotení antimikrónnej aktivity BQAS dvoch homologických radov: A – bis[2-(alkyldimetylamónio)etyl]-glutarát-dibromidov a B – bis[2-(alkyldimetyldiamónio)etyl]-alkandioát-dibromidov na *Enterobacter cloacae* aj v aktivite voči testovanému kmeňu *S. Typhimurium* DT104 boli zo študovaných zlúčenín najúčinnejšie látky substituované decylom a dodecylom. Získané výsledky potvrdzujú skutočnosť známu z rozsiahleho výskumu QAS, že pre ich antimikrónnu účinnosť je rozhodujúca popri kladne nabitých „hlavách“ molekuly s kvartérnym dusíkovým atómom najmä dĺžka alkylového reťazca. Tá má rozhodujúci vplyv na hydrofilno-lipofilnú rovnováhu molekuly. Podľa súčasných predstáv o spôsobe interakcie molekúl QAS s miestom ich účinku – cytoplazmovou membránou, dĺžka hydrofóbného „chvostu“ molekuly rozhoduje o vzniku, resp. vyplnení prázdneho priestoru vo vnútri fosfolipidovej dvojvrstvy membrány a o stupni jej poškodenia. To vysvetľuje aj vyššiu účinnosť bisamóniových solí v porovnaní s monoamóniovými.

BQAS v dôsledku svojej membránovej aktivity zasahujú aj do metabolizmu bakteriálnych buniek. Ovplyvňujú procesy energiu vyžadujúce bunkové dýchanie – syntézu nukleových kyselín a proteínov, ako aj procesy energiu produkujúce. Syntetické médium Staples je vhodné na sledovanie inkorporácie [ $^{14}$ C]adenínu a [ $^{14}$ C]leucínu. Bunky testovaného kmeňa *S. Typhimurium* DT104 boli v exponenci

álnej fáze rastu. Účinok študovaných látok je vyjadrený hodnotami  $IC_{50}$  (koncentrácia zlúčeniny v  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  potrebná na zníženie rýchlosti inkorporácie sledovaných prekursorov o 50 %). Výhodnejší parameter pre vyjadrenie účinnosti predstavujú  $R$  hodnoty (pomer  $IC_{50}$  adenínu a  $IC_{50}$  leucínu). Hodnoty  $IC_{50}$  ako aj  $R$  hodnoty študovaného homologického radu BQAS sú uvedené v tab. II. Študované BQAS prejavili výraznejšiu inhibíciu syntézy nukleových kyselín v porovnaní s proteosyntézou, čo vyjadrujú hodnoty  $R$ . Táto hodnota bola u všetkých študovaných zlúčenín nižšia ako 1, čo je typické pre biologicky aktívne látky zasahujúce do energetického metabolizmu buniek<sup>19–21</sup>. Aj v prípade účinku študovaných BQAS na rýchlosť inhibície inkorporácie rádioaktívnych prekursorov sa prejavil „cut-off“ efekt. Najúčinnějšíe zlúčeniny boli látky substituované decylom a dodecylom. Proteosyntéza bola menej citlivá oproti syntéze nukleových kyselín. Zistili sme, že podobne ako na rast baktérií aj na syntézu makromolekúl mala vplyv dĺžka alkylového reťazca, čím sa potvrdili závery predchádzajúceho výskumu<sup>22</sup>, že krátkoreťazcové analógy nepôsobia na membránu baktérií a neinhibujú metabolické procesy.

Účinok BQAS na endogénnu respiráciu buniek *S. Typhimurium* DT104 je znázornený na obr. 1. Bunky testovaného kmeňa z exponenciálnej fázy rastu mali pomerne vy-



Obr. 1. Účinok  $N,N'$ -bis[2-(alkyldimetylamonio)etyl]amidov kyseliny L-vínnej na endogénnu respiráciu *S. Typhimurium* DT104

□ 0 □ 1,56 □ 3,12 □ 6,25 ■ 12,5 ■ 25 ■ 50 ■ 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$

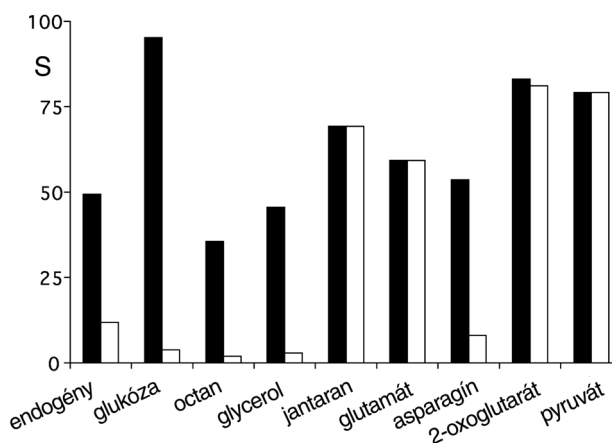
Tabuľka II

Účinok študovaných bisamóniových solí na inkorporáciu  $^{14}\text{C}$ -prekursorov do buniek *S. Typhimurium* DT104

Číslo	Alkyl	$IC_{50}$ , [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]		$R^a$
		[ $^{14}\text{C}$ ]adenín	[ $^{14}\text{C}$ ]leucín	
1	oktyl	473,94	1706,8	0,28
2	decyl	22,5	46,4	0,485
3	dodecyl	8,67	10,44	0,830
4	tetradecyl	43,97	55,95	0,786
5	hexadecyl	176,9	219,8	0,800

<sup>a</sup> $R = IC_{50}$  adenín/ $IC_{50}$  leucín

sokú endogénnu respiráciu. V študovanom homologickom rade zlúčenín sa ukázala závislosť inhibície endogénnej respirácie od ich zvyšujúcej sa koncentrácie, pričom zlúčeniny substituované tetradecylom a hexadecylom už v koncentrácii  $1,56 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  potlačili dýchanie buniek na 69,2 %, resp. 75 %. Najúčinnějšía zlúčenina v inhibícii endogénnej respirácie bol zlúčenina substituovaná dodecylom, ktorá už v koncentrácii  $3,125 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  potlačila dýchanie na 60 %. Majtánová a Majtán<sup>10</sup> pri sledovaní vplyvu BQAS typu bis[2-(alkyldimetyldiamónio)etyl]-glutarát-dibromidov na endogénnu respiráciu *S. Typhimurium* tiež popísali závislosť účinku od koncentrácie a dĺžky reťazca alkylu. Zdá sa, že inhibícia respirácie však závisí na veľkosti celej molekuly. Ak bočný reťazec zlúčeniny je adekvátne dlhý, môže vytvárať veľké medzery vo fosfolipidovej dvojvrstve membrán, a tak redukovať jej normálnu funkciu<sup>23</sup>.



Obr. 2. Účinok látky č. 3 viz tab. II ( $R = \text{dodecyl}$ ,  $c = 100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) na respiráciu buniek *S. Typhimurium* DT104 v prítomnosti roztokov (0,2 M) rôznych substrátov v TRIS-tylmivom roztoku (pH 7,4),  $S = \text{spotreba } O_2 \text{ (nmol } O_2 \text{ min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ sušiny)}$

■ bez inhibitora □ s inhibitorom

Účinok najúčinnějšíe zlúčeniny ( $R = \text{dodecyl}$ ) na exogénnu respiráciu *S. Typhimurium* DT104 je znázornený na obr. 2. Citlivosť exogénnej respirácie sa aktivitu tejto zlúčeniny závisela aj od substrátu. Všetky použité substráty boli buď intermediáty Krebsovho cyklu alebo do neho vstupujú po predchádzajúcej degradácii. V tomto prípade aktívne zlúčeniny môžu znižovať respiráciu nielen degradáciou substrátu alebo vstupovaním do dýchacieho reťazca, ale aj ovplyvňovaním transportu substrátu do bunky. Ako vyplýva z obr. 2,

najvyššia inhibícia respirácie testovaného kmeňa *S. Typhimurium* DT104 sa zistila v prítomnosti týchto exogénnych zdrojov uhlíku: glukózy, octanu, glycerolu a asparagínu, t.j. substrátov, ktoré nie sú priamo intermediáty Krebsovho cyklu. V prítomnosti substrátov glukózy, glycerolu a asparagínu bola tiež zistená najvyššia inhibícia respirácie *S. Typhimurium* po účinku zlúčeniny substituovanej hexadecylom z homologického radu BQAS bis[2-(alkyldimetyldiamónio)etyl]-glutarát-dibromidov<sup>10</sup>.

Študované BQAS potlačili rast *S. Typhimurium* DT104 pravdepodobne zásahom do energiu požadujúcich a energiu poskytujúcich procesov bakteriálnych buniek ako dôsledok ich zásahu do integrity biologických membrán.

#### LITERATÚRA

- Threlfall E. J., Frost A. J., Ward L. R., Rowe B.: *Vet. Rec.* 134, 577 (1994).
- Almuth L., Prager R., Streckel W., Rabsch W., Gericke B., Seltmann G., Helmuth R., Tschäpe H.: *Robert Koch Inst. Info.* 1, 10 (1997).
- Besser T. E., Gray C. C., Gray J. M., Hancock D. D., Rice D., Pritchett L. C., Erickson E. D.: *Vet. Rec.* 140, 75 (1997).
- Poppe C., McFadden K. A., Demczuk W. H.: *Int. J. Food Microbiol.* 30, 325 (1996).
- Rubino S., Muresu E., Solinas M., Sanotan M., Paglietti B., Azara A., Schiaffino A., Santona A., Maida A., Cappuccinelli P.: *Epidemiol. Infect.* 120, 215 (1998).
- Hribňáková M.: *Zprávy CEM*, str. 269. Praha 1998.
- Prager R., Liesegang A., Rabsch W., Gericke B., Thiel W., Voight W., Helmuth R., Ward L., Tschäpe H.: *Zentralbl. Bakt. Mikrobiol.* 289, 399 (1999).
- Majtánová L., Majtán V.: *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 51, 8 (2002).
- Mlynarčík D., Denier S. P., Hugo W. B.: *Microbios* 30, 27 (1981).
- Majtán V., Majtánová L.: *Microbios* 87, 89 (1996).
- Majtán V., Majtánová L.: *Biologia* 55, 627 (2000).
- Sýkora P., Čepčíková V., Foltýnová Z., Horniak L., Ebinger L.: *Folia Microbiol. (Prague)* 36, 240 (1991).
- Staples S. J., Asher S. E., Giannella R. A.: *J. Biol. Chem.* 255, 4712 (1980).
- Imam T., Devínsky F., Lacko I., Mlynarčík D., Krasnec L.: *Pharmazie* 38, 308 (1983).
- Mlynarčík D., Lacko I., Devínsky F.: *Experientia* 35, 1044 (1979).
- Devínsky F., Masárová L., Lacko I., Mlynarčík D.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 49, 2819 (1984).
- Devínsky F., Lacko I., Bittererová F., Mlynarčík D.: *Chem. Pap.* 41, 803 (1987).
- Majtán V., Majtánová L., Mlynarčík D.: *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 45, 198 (1995).
- Majtán V., Drobnica L.: *Folia Microbiol.* 27, 43 (1982).
- Miko M., Devínsky F.: *Drug Metab. Drug Interact.* 9, 333 (1991).
- Miko M., Devínsky F.: *Drug Metab. Drug Interact.* 10, 237 (1992).
- Kopecká-Leitmanová A., Devínsky F., Lacko I., Mlynarčík D.: *Drug Metab. Drug Interact.* 7, 29 (1989).
- Balgavý P., Devínsky F.: *Adv. Colloid Interface Sci.* 66, 23 (1996).

**T. Majtán<sup>1</sup>, Lubica Majtánová<sup>2</sup>, and Dušan Mlynarčík<sup>3</sup>** (<sup>1</sup>*Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Dúbravská cesta 21*, <sup>2</sup>*Institute of Preventive and Clinical Medicine, Slovak Academy of Sciences, Limbová 14*, <sup>3</sup>*Department of Cell and Molecular Biology of Drugs, Faculty of Pharmacy, Comenius University, Kalinčiaková 8, Bratislava, Slovak Republic*): **The Effect of Bisquaternary Ammonium Salts on the Growth and Metabolic Processes of *Salmonella enterica* Subspecies *Enterica* Serovar *Typhimurium* DT104**

The effect of five bisquaternary ammonium salts of a homologous series of *N,N'*-bis[2-(alkyldimethylammonio)ethyl]-L-tartaramide on the growth, synthesis of nucleic acids and proteins, and respiration of *Salmonella typhimurium* DT104 was studied. The tested strain was resistant against ampicilin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides and tetracyclin. The highest antibacterial activity was found for dodecyl (MIC 3.125–6.25 µg.ml<sup>-1</sup>) and tetradecyl compounds (MIC 6.25–12.5 µg.ml<sup>-1</sup>). The studied compounds showed a considerable inhibition of nucleic acid synthesis as expressed by percentage of inhibition of [<sup>14</sup>C]adenine incorporation compared with proteosynthesis. In the antibacterial activity as well as in influencing the incorporation rate of radioactive precursors, the well-known cut-off effect was shown. A pronounced inhibition of endogenous respiration of tested *S. typhimurium* cells was shown by the tetradecyl and hexadecyl compounds at the 1.56 µg.ml<sup>-1</sup> concentration (to 69.2 % and 75 %, respectively), the highest by the dodecyl compound (60 % of the control at 3.125 µg.ml<sup>-1</sup>). The latter compound inhibited also exogenous respiration, most in the presence of glucose, acetate, glycerol and aspartate as the sources of carbon.