



Toshkent tibbiyot akademiyasi Urganch filiali “Jamoat salomatligi va umumiy gigiyena” kafedrasi mudiri, Ibadulla Qochkarovich Abdullayevning 70 yilligiga bag‘ishlangan “Sog‘liqni saqlash tizimida menejmentning zamonaviy muammolari va istiqbollari” mavzusidagi xalqaro ilmiy-amaliy anjuman 2025-yil 20-21 oktabr

АНТИМИКРОБНАЯ И ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ ТЕРПЕНОВОГО РЯДА.

Баклагина А.В.1, Соколова Е. А.1

1Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18
zhenya_mic@mail.ru

АННОТАЦИЯ

В данной работе были исследованы амфифильные меротерпеноиды. Изучена бактериостатическая и фунгистатическая активность терпеноидов в отношении микроскопических грибов *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida sp.*, грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) и грамотрицательных (*Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) бактерий. Соединение, содержащее остаток фарнезола, наиболее активно подавляло жизнеспособность грибов *S. cerevisiae* (МИК 0,039 мг/мл), *Candida sp.* (МИК 0,078 мг/мл), а также бактерий – *S. epidermidis* (МИК 0,02 мг/мл) и *S. typhimurium* (МИК 0,078 мг/мл).

Ключевые слова: терпеноиды, противогрибковый, антибактериальный, резазуриновый тест.

ABSTRACT

In this study, amphiphilic meroterpenoids were investigated. The bacteriostatic and fungistatic activity of terpenoids against the fungi *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida sp.*, Gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) and Gram-negative (*Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) bacteria was studied. The compound containing farnesol fragment was most active against *S. cerevisiae* (MIC 0.039 mg/ml), *Candida sp.* (MIC 0.078 mg/ml), as well as bacteria *S. epidermidis* (MIC 0.02 mg/ml) and *S. typhimurium* (MIC 0.078 mg/ml).

Keywords: terpenoids, antifungal, antibacterial, resazurin test.

ANNOTATSIYA

Ushbu tadqiqotda amfifil meroterpenoidlar tekshirildi. *Saccharomyces cerevisiae* va *Candida sp* mikroskopik zamburug'lariga nisbatan terpenoidlarning bakteriostatik va fungistatik faolligi o'rganildi., gram-musbat (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) va gram-manfiy (*Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) bakteriyalar.shbu tadqiqotda amfifil meroterpenoidlar tekshirildi. *Saccharomyces cerevisiae* va *Candida sp* mikroskopik zamburug'lariga nisbatan terpenoidlarning bakteriostatik va fungistatik faolligi o'rganildi., gram-musbat (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) va gram-manfiy (*Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) bakteriyalar. Farnesol qoldig'ini o'z ichiga olgan birikma *S. cerevisiae* (МИК 0,039 мг/мл), *Candida sp* zamburug'larining hayotiyiligini eng faol ravishda bostirdi. (МИК 0,078 мг/мл), shuningdek bakteriyalar-*S. epidermidis* (МИК 0,02 мг/мл) va *S. typhimurium* (МИК 0,078 мг/мл).

Kalit so'zlar: terpenoidlar, antifungal, antibakterial, rezazurin testi.

1. ВВЕДЕНИЕ

Патогенные микроорганизмы на протяжении веков представляли большую опасность для здоровья человека [1, 2]. Рост числа опасных инфекций, вызываемых антибиотикорезистентными бактериями, сделал поиск и исследование новых противомикробных соединений актуальной темой в области современной биомедицины. Клеточные мембраны являются одной из мишеней антимикробных препаратов [3, 4, 5]. Мембранные компоненты грамотрицательных и грамположительных бактерий заряжены отрицательно [6, 7], а также клеточная стенка микроскопических грибов в основном состоит из компонентов, содержащих отрицательный заряд [8]. По сравнению с мембранами микробов, мембраны клеток



Toshkent tibbiyot akademiyasi Urganch filiali “Jamoat salomatligi va umumiy gigiyena” kafedrasi mudiri, Ibadulla Qochkarovich Abdullayevning 70 yilligiga bag‘ishlangan “Sog‘liqni saqlash tizimida menejmentning zamonaviy muammolari va istiqbollari” mavzusidagi xalqaro ilmiy-amaliy anjuman 2025-yil 20-21 oktabr

млекопитающих заряжены в меньшей степени [9]. Это различие в структуре мембран клеток микроорганизмов и млекопитающих обеспечивают перспективный подход для разработки положительно заряженных лекарственных препаратов [10].

В последние годы все больше внимания исследователей обращается в сторону разработки лекарственных препаратов, полученных из природных источников [11-15]. По сравнению с синтетическими, вещества растительного происхождения обеспечивают широкое структурное разнообразие и доступность [16]. Терпены — это самая большая и разнообразная группа природных соединений, содержащихся в растениях. Терпены обладают потенциалом в качестве противомикробных средств благодаря таким механизмам воздействия на бактерии как: разрушение мембран, препятствие кворуму, ингибирование синтеза белка и АТФ [17]. Тем не менее, гидрофобность большинства терпеновых соединений часто не позволяет создавать достаточные действующие концентрации в локусе воздействия, снижая их биодоступность.

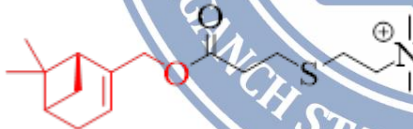
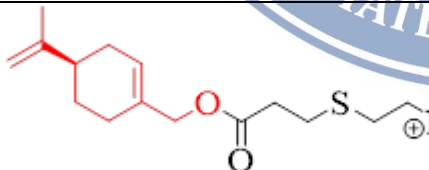
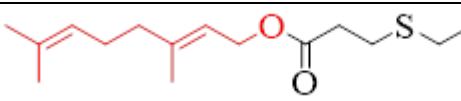
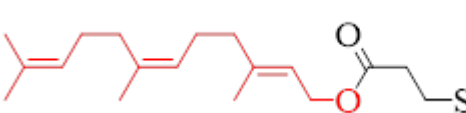
Исходя из вышесказанного, нашей целью было исследование противомикробной активности новых амфифильных меротерпеноидов. Амфифильная природа новых исследуемых соединений терпеновой природы необходима для более легкого достижения агентом цитоплазматической мембраны и её разрушения, а также проникновения внутрь клетки.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Исследуемые соединения

В работе оценивали биологические свойства ряда терпеноидов: FASD, GASD, MASD, Per-ASD, различающихся структурой терпеноидного фрагмента, содержащие остатки фарнезола, гераниола, миртенола и периллилового спирта (таблица 1).

Таблица 1– Используемые в работе терпеноиды

Структура	Код	Природа заместителя
	MASD	Производное R-миртенола.
	Per-ASD	Производное S-периллилового спирта.
	GASD	Производное гераниола
	FASD	Производное (2E,6Z)-фарнезола.

2.2 Характеристика тестерных штаммов микроорганизмов

В качестве тест-организмов использовали грамположительные (*S. aureus* ATCC® 29213™, клинический изолят *S. epidermidis*) и грамотрицательные (*S. typhimurium* TA 98, клинические изоляты *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) бактерии, а также микроскопические грибки *Candida sp.* и *S. cerevisiae*. Клинические изоляты *Candida sp.*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* были любезно предоставлены Казанским научно-исследовательским институтом



Toshkent tibbiyot akademiyasi Urganch filiali “Jamoat salomatligi va umumiy gigiyena” kafedrasi mudiri, Ibadulla Qochkarovich Abdullayevning 70 yilligiga bag‘ishlangan “Sog‘liqni saqlash tizimida menejmentning zamonaviy muammolari va istiqbollari” mavzusidagi xalqaro ilmiy-amaliy anjuman 2025-yil 20-21 oktabr

эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора (ФБУН КНИИЭМ – далее). Пекарские дрожжи *S. cerevisiae* также были переданы нам специалистами ФБУН КНИИЭМ. Клинический изолят *K. pneumoniae* был получен из Института медицинской микробиологии, Гиссен, Германия.

Культивирование бактерий осуществлялось на среде Лурия-Бертани (LB) (ДиаМ, Россия), а микроскопических грибов - на питательной среде №2 ГПМ (Сабуро) (ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Россия). Микроорганизмы выращивали в культуральных 96-луночных плоскодонных планшетах при 37 °С.

2.3 Определение минимальной ингибирующей концентрации терпеноидов

Способность терпеноидов FASD; MASD; GASD; Per-ASD ингибировать рост культур *S. typhimurium* TA 98, *K. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. cerevisiae*, *Candida sp.* определяли в резазуриновом тесте [18].

Ночные культуры микроорганизмов добавляли в среды (для бактерий использовали LB-бульон, для грибов среда Сабуро). Затем расканывали в 96-луночный планшет по 180 мкл среды в первую лунку каждого ряда и по 100 мкл в последующие лунки. Затем добавляли растворы исследуемых производных терпеноидов в объеме 20 мкл в первую лунку и делали серию двойных разведений в последующих лунках ряда. Планшет инкубировали в течение 24 часов при температуре 37°С, затем определяли развитие культур резазуриновым тестом. В резазуриновом тесте определяли минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) каждого из веществ по отсутствию роста соответствующей культуры в лунках с минимальной концентрацией вещества. Концентрат резазурина (0.1 %) вносили по 10 мкл в лунки планшета и ждали несколько часов. Изменение цвета с фиолетового на розовый либо обесцвечивание считали свидетельством развития в соответствующей лунке микроорганизмов.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Оценка бактериостатических и фунгистатических свойств и определение минимальной ингибирующей концентрации производных терпеноидов

В работе была выполнена оценка бактериостатической и фунгистатической активности терпеноидов в резазуриновом тесте. Наивысшая действующая концентрация агентов составляла 10 мг/мл. Разбавление в каждой лунке меньше в два раза, соответственно 10 мг/мл, 5 мг/мл, 2,5 мг/мл, 1,25 мг/мл, 0,625 мг/мл и т.д. Результаты представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2. Минимальная фунгистатическая концентрация производных терпеноидов для исследуемых микроорганизмов (мг/мл)

Шифр	Микроскопические грибки	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Candida sp.</i>
FASD	0,039	0,078
GASD	0,156	0,625
MASD	0,3125	2,5
Per-ASD	0,3125	1,25



Toshkent tibbiyot akademiyasi Urganch filiali “Jamoat salomatligi va umumiy gigiyena” kafedrasi mudiri, Ibadulla Qochkarovich Abdullayevning 70 yilligiga bag‘ishlangan “Sog‘liqni saqlash tizimida menejmentning zamonaviy muammolari va istiqbollari” mavzusidagi xalqaro ilmiy-amaliy anjuman 2025-yil 20-21 oktabr

Таблица 3. Минимальная бактериостатическая концентрация производных терпеноидов для исследуемых микроорганизмов (мг/мл)

Шифр	Грамположительные бактерии		Грамотрицательные бактерии		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>TA 98</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
FASD	0,3125	0,02	0,078	1,25	2,5
GASD	0,3125	0,156	0,156	5	1,25
MASD	2,5	1,25	0,625	0,625	0,156
Per-ASD	0,625	0,3125	0,156	2,5	0,625

С помощью реззуринового теста было показано, что исследуемые вещества, содержащие различные терпеноидные остатки, обладают ингибирующими свойствами в отношении бактерий и микроскопических грибов.

Производное фарнезола FASD проявило наибольшую активность в отношении *S. cerevisiae*, останавливая рост микроба в концентрации 0,039 мг/мл. Вещество, содержащее остаток гераниола GASD обладало умеренной активностью в отношении линии клеток *S. cerevisiae* и подавляло жизнедеятельность в концентрации 0,156 мг/мл. Клеточная линия грибка *Candida sp.* оказалась более устойчивой к исследуемым соединениям, чем *S. cerevisiae*, однако тенденция сохранялась: наибольшую активность проявили производные фарнезола и гераниола в концентрациях 0,078 и 0,625 мг/мл соответственно. Способность фарнезола подавлять развитие грибов отмечалась в литературе [19, 20].

Среди грамположительных бактерий *S. epidermidis* оказался менее устойчив к действию производных терпеноидов. Сильнейшим эффектом обладало вещество на основе фарнезола, которое подавляло развитие клеток микроба в концентрации 0,02 мг/мл. Клетки *S. aureus* оказались более устойчивыми к действию производных терпеноидов. Производные гераниола и фарнезола проявили наибольшую активность при одинаковом значении МИК 0,3125 мг/мл. Антимикробные свойства фарнезола и гераниола широко известны в научной литературе [21, 22, 23].

Клинические изоляты *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* оказались наиболее чувствительными к действию производного миртенола MASD и прекращали свой рост при действии вещества в концентрациях – 0,625 и 0,156 мг/мл соответственно. В научной литературе сообщается об ингибирующем свойстве миртенола по отношению к грамотрицательным бактериям [24]. В отношении *S. typhimurium* сильнейшим подавляющим эффектом обладало вещество, содержащее остатки фарнезола – 0,078 мг/мл.

4. ВЫВОДЫ

Таким образом, была изучена бактериостатическая и фунгистатическая активность меротерпеноидов в отношении патогенных штаммов грибов и бактерий. Соединение, содержащее остаток фарнезола, было наиболее активным в отношении грибов *S. cerevisiae* (МИК 0,039 мг/мл), *Candida sp.* (МИК 0,078 мг/мл), грамположительных бактерий клинического изолята *S. epidermidis* (МИК 0,02 мг/мл) и грамотрицательных *S. typhimurium* (МИК 0,078 мг/мл). Полученные результаты позволили расположить исследованные водорастворимые терпеноиды по степени выраженности антимикробных свойств в ряду MASD < GASD < Per-ASD < FASD.



Toshkent tibbiyot akademiyasi Urganch filiali “Jamoat salomatligi va umumiy gigiyena” kafedrasi mudiri, Ibadulla Qochkarovich Abdullayevning 70 yilligiga bag‘ishlangan “Sog‘liqni saqlash tizimida menejmentning zamonaviy muammolari va istiqbollari” mavzusidagi xalqaro ilmiy-amaliy anjuman 2025-yil 20-21 oktabr

ЛИТЕРАТУРА

- 1) Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial Resistance in the 21st Century Perspect. Med Chem. 2014;6:14459.doi:10.4137/PMC.S144592.
- 2) Arastehfar A, Gabaldón T, Garcia-Rubio R, Jenks JD, Hoenigl M, Salzer HJF, Ilkit M, Lass-Flörl C, Perlin DS. Drug-resistant Fungi: an Emerging challenge Threatening our Limited anti-fungal. Armamentarium Antibiotics. 2020;9(12):877.doi:10.3390/antibiotics91208773.
- 3) Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outterson K, Patel J, Cavaleri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N, Aboderin AO, Al-Abri SS, Awang Jalil N, Ben-zonana N, Bhattacharya S, Brink AJ, Burkert FR, Cars O, Cornaglia G, Dyar OJ, Friedrich AW, Gales AC, Gandra S, Giske CG, Goff DA, Goossens H, Gottlieb T, Guzman Blanco M, Hryniewicz W, Kattula D, Jinks T, Kanj SS, Kerr L, Kieny MP, Kim YS, Kozlov RS, Labarca J, Laxminarayan R, Leder K, Leibo-vici L, Levy-Hara G, Littman J, Malhotra-Kumar S, Manchanda V, Moja L, Ndoye B, Pan A, Paterson DL, Paul M, Qiu H, Ramon-Pardo P, Rodríguez-Baño J, Sanguinetti M, Sengupta S, Shar-land M, Si-Mehand M, Silver LL, Song W, Steinbakk M, Thom-sen J, Thwaites GE, van der Meer JWM, Van Kinh N, Vega S, Villegas MV, Wechsler-Fördös A, Wertheim HFL, Wesangula E, Woodford N, Yilmaz FO, Zorzet A. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of anti-biotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2018;18(3):318–327.doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-34.
- 4) WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: World Health Organization; 2022. Available from: <http://hdl.handle.net/20.500.12105/15113>.
- 5) Sant DG, Tupe SG, Ramana CV, Deshpande MV. Fungal cell membrane-promising drug target for antifungal therapy. J Appl Microbiol. 2016;121(6):1498–1510.doi:10.1111/jam.133016.
- 6) Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope cold spring. Harb Perspect Biol. 2010;2(5):a000414–a000414.doi:10.1101/cshperspect.a0004147.
- 7) Swoboda JG, Campbell J, Meredith TC, Walker S. Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. ChemBioChem. 2010;11(1):35–45.doi:10.1002/cbic.2009005578.
- 8) Free SJ. Fungal cell wall organization and biosynthesis. Adv Genet. 2013;33–82.doi:10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-69.
- 9) Virtanen JA, Cheng KH, Somerharju P. Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. Proc National Acad Sci. 1998;95(9):4964–4969.doi:10.1073/pnas.95.9.496410.
- 10) Cook MA, Wright GD. The past, present, and future of antibiotics. Sci. Transl. Medicine 2022; 14(657): eabo7793 doi:10.1126/scitranslmed.abo7793
- 11) Olsufyeva EN, Yankovskaya VS. Main trends in the design of semi-synthetic antibiotics of a new generation. Russ Chem Rev. 2020;89(3):339–378.doi:10.1070/RCR489216.
- 12) Campoy S, Adrio JL. Antifungals. Biochem Pharmacol. 2017;133:86–96.doi:10.1016/j.bcp.2016.11.01917.
- 13) Obydenov KL, Kalinina TA, Ryabova DV, Kosterina MF, Glukhareva TV. 2-(4-Oxo-1,3-thiazolidin-2-ylidene)acetamid as promising scaffold for designing new antifungal compounds. Chim Techno Acta. 2023;10(1):202310106.doi:10.15826/chimtech.2023.10.1.0618.
- 14) Megha GV, Bodke YD, Shanavaz H, Joy MN. Substituted benzo-coumarin derivatives: synthesis, characterization, biological activities and molecular docking with ADME studies. Chim. Techno Acta. 2022;9(4):20229419.doi:10.15826/chimtech.2022.9.4.1919.



Toshkent tibbiyot akademiyasi Urganch filiali “Jamoat salomatligi va umumiy gigiyena” kafedrasi mudiri, Ibadulla Qochkarovich Abdullayevning 70 yilligiga bag‘ishlangan “Sog‘liqni saqlash tizimida menejmentning zamonaviy muammolari va istiqbollari” mavzusidagi xalqaro ilmiy-amaliy anjuman 2025-yil 20-21 oktabr

- 15) Shurpik DN, Aleksandrova YI, Makhmutova LI, Akhmedov AA, Stoikov II. Towards nanomaterials with tubular pores: synthe-sis and self-assembly of bis-pillar[5]arene. *Chim Techno Acta*. 2023;10(4):202310412. doi:10.15826/chimtech.2023.10.4.1220.
- 16) Shurpik DN, Akhmedov AA, Cragg PJ, Plemenkov VV, Stoikov II. Progress in the chemistry of macrocyclic Meroterpenoids Plants. 2020;9(11):1582. doi:10.3390/plants9111582
- 17) Amirzakariya BZ, Shakeri A. Bioactive terpenoids derived from plant endophytic fungi: an updated review (2011–2020). *Phytochem*. 2022;197:113130. doi:10.1016/j.phytochem.2022.113130
- 18) Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre platebased antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screen-ing of phytochemicals. *Methods*. 2007;42(4):321324. doi:10.1016/j.ymeth.2007.01.006
- 19) Chen S, Xia J, Li C, Zuo L, Wei X. The possible molecular mechanisms of farnesol on the antifungal resistance of *C. albicans* biofilms: the regulation of CYR1 and PDE2. *BMC Microbiol*. 2018 Dec 4;18(1):203. doi: 10.1186/s12866-018-1344-z.
- 20) Sachivkina N.P., Senyagin A.N., Podoprigora I.V., Brown D.G., Vissarionova V.V. Modulating the Antifungal Activity of Antimycotic Drugs with Farnesol. *Drug development & registration*. 2021;10(4):162-168. (In Russ.)
- 21) Mangalagiri NP, Panditi SK, Jeevigunta NLL. Antimicrobial activity of essential plant oils and their major components. *Heliyon*. 2021 Apr 24;7(4):e06835. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06835
- 22) Santana JEG, Oliveira-Tintino CDM, Gonçalves Alencar G, Siqueira GM, Sampaio Alves D, Moura TF, Tintino SR, de Menezes IRA, Rodrigues JPV, Gonçalves VBP, Nicolette R, Emran TB, Gonçalves Lima CM, Ahmad SF, Coutinho HDM, da Silva TG. Comparative Antibacterial and Efflux Pump Inhibitory Activity of Isolated Nerolidol, Farnesol, and α -Bisabolol Sesquiterpenes and Their Liposomal Nanoformulations. *Molecules*. 2023 Nov 17;28(22):7649. doi: 10.3390/molecules28227649.
- 23) Ivanova A, Ivanova K, Fiandra L, Mantecca P, Catelani T, Natan M, Banin E, Jacobi G, Tzanov T. Antibacterial, Antibiofilm, and Antiviral Farnesol-Containing Nanoparticles Prevent *Staphylococcus aureus* from Drug Resistance Development. *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 7;23(14):7527. doi: 10.3390/ijms23147527.
- 24) Liu L, Liu B, Li L, He MX, Zhou XD, Li Q. Myrtenol Inhibits Biofilm Formation and Virulence in the Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Insights into the Molecular Mechanisms. *Infect Drug Resist*. 2022 Sep 2;15:5137-5148. doi: 10.2147/IDR.S379212.