

Химическая модификация противомикробных комплексов органическими молекулами

Плотникова Ю.*, Барышева Е., Бибарцева Е., Баранова О.

¹ ФГБОУ ВО Оренбургский государственный университет, Оренбург, Россия

* shik8mail@mail.ru

Ключевые слова: галловая кислота, молекулярно-электростатический потенциал, квантово-химическое моделирование, синергетическое взаимодействие

Цель: Целью проведенного исследования было определение синергического антибактериального эффекта совместного применения антибиотиков и вторичных метаболитов фенольного происхождения, а также определение характера их взаимодействия.

Материалы и методы: Материалом исследования стали клинические изоляты *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Исследовались, предварительно экстрагированные фенольные компоненты 10 лекарственных растений: *Herba Achilleae millefolii*; *Folia Eucalypti viminalis*; *Urticae folia*; *Cortex Quercus*; *Herba Camellia*; *Ribes nigrum* L.; *Sorbus aucuparia* L.; *Allium sativum*; *Dianthus* в комплексе с антибиотическими препаратами цефтазидимом и фосфомицином.

Апробация комбинированного действия антибиотиков и фенолсодержащих экстрактов проводилась методом агаровых лунок.

При проведении квантово-химического расчета сначала была проведена оптимизация молекул исследуемых веществ в небольшом приближении RBE/3-21+G. Осуществлялся конфигурационный поиск оптимального пространственного расположения функциональных групп, и на следующем этапе – выполнялся расчет исследуемых молекул, с построением карт молекулярно-электростатического потенциала (МЭП). Рассчитанные на первом этапе молекулы, с учетом МЭП, попарно соединялись и оптимизировались на основе теории функционала плотности в приближении RBE/3-21+G.

Спектры чистых веществ и предполагаемых межмолекулярных комплексов получали с использованием Фурье – спектрометра «ИНФРАЛЮМ ФТ-02» и ИК-Фурье спектрометра Bruker Alpha (без приставки НПВО).

Результаты: Изначально, были проведены исследования противомикробной активности, в условиях *in vitro*, при совместном введении в среду вторичных метаболитов фенольного происхождения и антибиотиков (фосфомицина и цефтазидима). В отношении *S. aureus* наиболее выраженный синергический эффект отмечен для *Folia Eucalypti viminalis* и *Camellia sinensis*, в отношении *P. aeruginosa* наилучшие показатели синергического взаимодействия наблюдались у *Folia Eucalypti viminalis* и *Allium sativum*.

Присутствие в составе выбранных лекарственных растений вторичных метаболитов, обладающих антибактериальным действием, таких как рутин, галловая кислота, тимол, танин, объясняют природу возникновения антибактериального эффекта (действие антибиотика в эксперименте не учитывалось, так как концентрации брались ниже МИК этого антибиотика) [1].

Чтобы объяснить наблюдаемый синергетический эффект, от добавления в среду вторичных метаболитов при культивировании, использовались методы квантовой химии. Рассматривался вариант возможности образования в среде межмолекулярных или молекулярных комплексов между вторичными метаболитами фенольного происхождения и фосфомицином и цефтазидимом. Доказательная база строилась по распределению электронной плотности на атомах и электростатическому потенциалу. Области, имеющие большой отрицательный потенциал, сопряженный с наличием гидроксильных или карбонильных групп, должны стать электрофильными центрами, а молекула или ее участок в целом нуклеофилом. Все это должно привести к образованию, за счет электростатических сил, межмолекулярного комплекса между молекулами вторичных метаболитов и молекулами антибиотиков, а в случае наличия комплексообразователя к смешаннолигандному комплексу. На рис. 1 представлены молекулярно-электростатический потенциал (МЭП) и распределение электронной плотности вторичных метаболитов и антибиотиков.

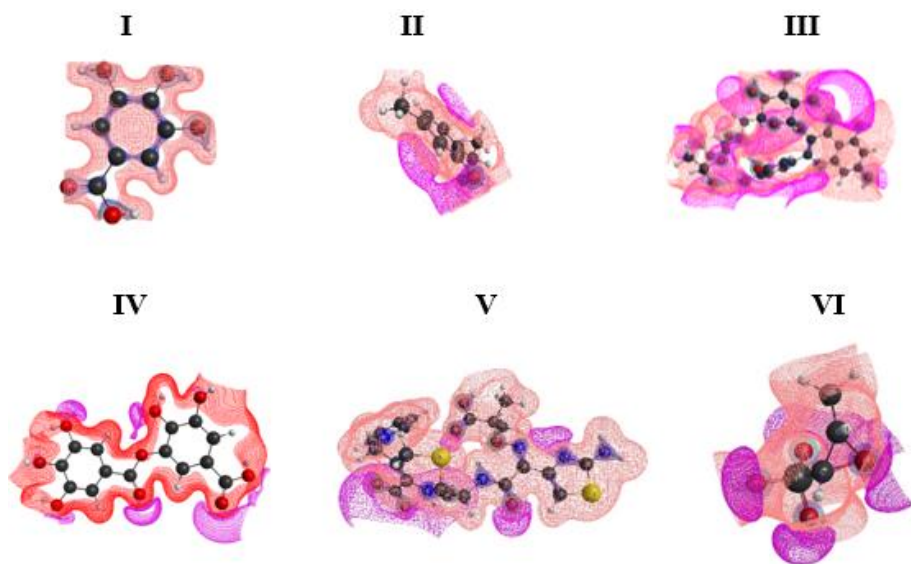


Рис. 1. Молекулярно-электростатический потенциал и распределение электронной плотности (I – gallic acid, II – thymol, III – rutin, IV – tannin, V – ceftazidime, VI – fosfomycin)

По полученным данным МЭП исследуемых структур было высказано предположение, что все соединения, за исключением галловой кислоты, могут выступать как электро- так и нуклеофилами. Наибольшая электронная плотность сосредоточена на атомах кислорода и азота, в некоторых случаях распределена по ароматическому кольцу. В основном отрицательные области электростатического потенциала расположены вдоль гидроксильных групп. В случае с противомикробными средствами для фосфомицина электрофильные участки расположены точечно над гидроксильными группами, для цефтазидима форма электрофильных участков сложная.

На рис. 2 показаны центры, к которым может присоединиться противоположная молекула вторичного метаболита или антибиотиков. Это может быть выражено в маскировании молекул АБ от бета-лактамаз и как следствие, в уменьшении их необходимой концентрации.

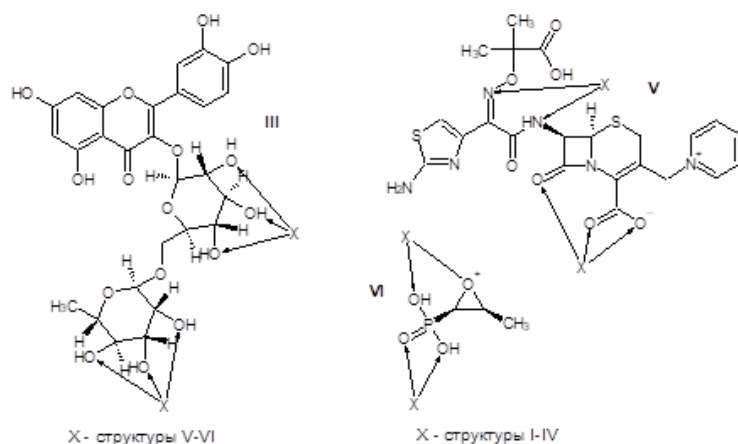


Рис. 2. Возможные конфигурации межмолекулярных комплексов вторичных метаболитов с молекулами фосфомицина и цефтазида

Основная задача спектрального анализа заключалась в проверке, вступают ли антибиотики с молекулами вторичных метаболитов в химическую реакцию или с другими молекулами в экстрактах растений. По полученным спектрам было выявлено, что не вступают.

Ключевые частоты вторичных метаболитов, находились на одинаковых полосах и в спектрах экстрактов хорошо просматривались. Полосы поглощения в противомикробных средствах почти совпали с полосами поглощения у вторичных метаболитов, однако, в экстрактах, при совместном введении в среду, не заметны на фоне. Это говорит о малой концентрации антибиотиков, но также указывает и на то, что в химическое взаимодействие цефтазидим и фосфомицин не вступают, так как отсутствуют дополнительные пики, свидетельствующие о продуктах реакции. Следовательно, антибиотики в растворе могут образовывать только межмолекулярные комплексы [2].

Выводы: В результате проведенных исследований было установлено, что антибактериальная активность может быть обусловлена как возможным синергетическим эффектом между взаимодействующими комплексами вторичных метаболитов и антибиотиков, так и индивидуальными механизмами, присущими конкретному действующему агенту, присутствующему в экстракте. При этом, антибактериальный эффект, показанный комплексным взаимодействием антибиотиков и растительных экстрактов с фенолсодержащими соединениями, будет зависеть от внешних условий взаимодействия (среда, температура, давление, влажность и т.д., так и внутренних факторов (изменение конформаций взаимодействия, условий протекания реакций и пр.).

Chemical modification of antimicrobial complexes with organic molecules

Plotnikova Yu.*, Barysheva E., Bibartseva E., Baranova O.

Orenburg State University, Orenburg, Russia

* shik8mail@mail.ru

Key words: gallic acid; molecular electrostatic potential; quantum chemical modelling; synergetic interaction

Purpose: The purpose of the study was to determine the synergistic antibacterial effect of the combined use of antibiotics and secondary metabolites of phenolic origin, as well as to determine the nature of their interaction.

Materials and methods: The research material was clinical isolates of *P.aeruginosa* and *S. aureus*. The pre-extracted phenolic components of 10 medicinal plants were studied: *Herba Achilleae millefolii*; *Folia Eucalypti viminalis*; *Urticae folia*; *Sortex Quercus*; *Nerba*; *Camellia*; *Ribes nigrum* L.; *Sorbus aucuparia* L.; *Allium sativum*; *Dianthus* in combination with the antibiotic drugs ceftazidime and fosfomycin.

The combined action of antibiotics and phenol-containing extracts was tested using the agar wells method.

During the quantum chemical calculation, the molecules of the studied substances were first optimized in a small approximation of PBE/3-21+G. A configuration search for the optimal spatial arrangement of functional groups was carried out, and at the next stage, the calculation of the studied molecules was performed, with the construction of maps of the molecular electrostatic potential (MEP). The molecules calculated at the first stage, taking into account the MEP, were paired and optimized based on the density functional theory in the PBE/3-21+G approximation.

The spectra of pure substances and putative intermolecular complexes were obtained using the Fourier spectrometer INFRALUM FT-02 and the Fourier infrared spectrometer Bruker Alpha (without the prefix NPVO).

Results: Initially, studies of antimicrobial activity were conducted in vitro, with the combined introduction of secondary metabolites of phenolic origin and antibiotics (fosfomycin and ceftazidime) into the medium. With respect to *S.aureus*, the most pronounced synergistic effect was noted for *Folia Eucalypti viminalis* and *Camellia sinensis*, with respect to *P.aeruginosa*, the best indicators of synergistic interaction were observed in *Folia Eucalypti viminalis* and *Allium sativum*.

The presence of secondary metabolites with antibacterial action in the composition of selected medicinal plants, such as rutin, gallic acid, thymol, tannin, explain the nature of the antibacterial effect (the effect of the antibiotic was not taken into account in the experiment, since concentrations were taken below the MIC of this antibiotic) [1].

Quantum chemistry methods were used to explain the observed synergistic effect of adding secondary metabolites to the medium during cultivation. The possibility of education in the environment was considered

intermolecular or molecular complexes between secondary metabolites of phenolic origin and fosfomycin and ceftazidime. The evidence base was based on the distribution of electron density on atoms and electrostatic potential. Regions with a large negative potential associated with the presence of hydroxyl or carbonyl groups should become

electrophilic centers, and the molecule or its site as a whole should become a nucleophile. All this should lead to the formation, due to electrostatic forces, of an intermolecular complex between molecules of secondary metabolites and molecules of antibiotics, and in the case of a complexing agent to a mixed ligand complex. Figure 1 shows the molecular electrostatic potential (MEP) and the electron density distribution of secondary metabolites and antibiotics

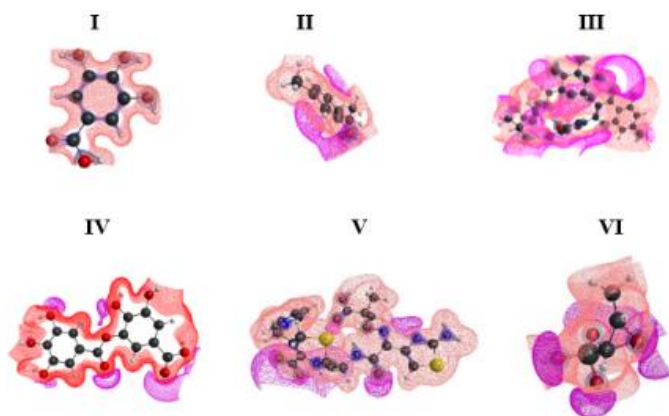


Fig. 1. Molecular electrostatic potential and electron density distribution (I – gallic acid, II – thymol, III – rutin, IV – tannin, V – ceftazidime, VI – fosfomycin)

According to the obtained MEP data of the studied structures, it was suggested that all compounds, with the exception of gallic acid, can act as both electro and nucleophiles. The highest electron density is concentrated on oxygen and nitrogen atoms, in some cases distributed along the aromatic ring. Basically, the negative regions of the electrostatic potential are located along the hydroxyl groups. In the case of antimicrobials for fosfomycin, the electrophilic sites are located pointwise above the hydroxyl groups, for ceftazidime, the shape of the electrophilic sites is complex. Figure 2 shows the centers to which the opposite molecule of a secondary metabolite or antibiotics can join. This can be expressed in masking the AB molecules from beta-lactamases and, as a result, in reducing their required concentration.

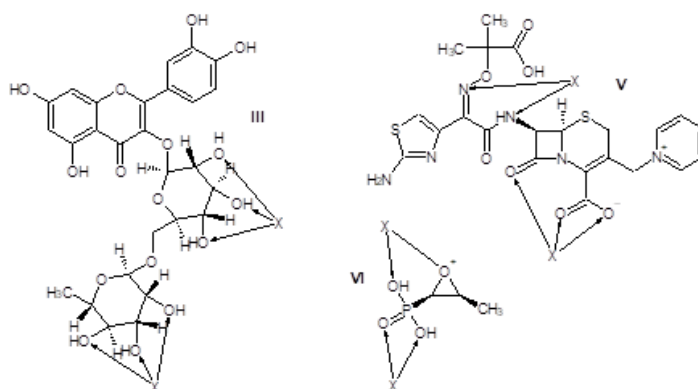


Fig. 2. Possible configurations of intermolecular complexes of secondary metabolites with phosphomycin and ceftazidime molecules

The main task of spectral analysis was to check whether antibiotics react chemically with molecules of secondary metabolites or with other molecules in plant extracts. According to the obtained spectra, it was revealed that they do not enter.

The key frequencies of the secondary metabolites were on the same bands and were clearly visible in the spectra of the extracts. The absorption bands in antimicrobials almost coincided with the absorption bands in secondary metabolites, however, in extracts, when co-administered into the medium, they are not noticeable against the background. This indicates a low concentration of antibiotics, but also indicates that ceftazidime and fosfomycin do not enter into chemical interaction, since there are no additional peaks indicating reaction products. Consequently, antibiotics in solution can only form intermolecular complexes [2].

Conclusions: As a result of the conducted studies, it was found that the antibacterial activity may be due to both a possible synergistic effect between interacting complexes of secondary metabolites and antibiotics, and individual mechanisms inherent in a specific active agent present in the extract. At the same time, the antibacterial effect shown by the complex interaction of antibiotics and plant extracts with phenol-containing compounds will depend on the external conditions of interaction (environment, temperature, pressure, humidity, etc., and internal factors (changes in interaction conformations, reaction conditions, etc.).

Список литературы/References

1. Плотникова Ю.А., Барышева Е.С. Биохимические аспекты комплексного антибактериального действия фенолсодержащих вторичных метаболитов лекарственных растений в сочетании с антибиотиками. В: *Фундаментальные исследования в области химии, биологии и экологии*. Оренбург: Оренбургский государственный университет, 2022;149-151
2. Плотникова Ю.А., Барышева Е.С., Пешков С.А. Химическая модификация противомикробных комплексов органическими молекулами с целью получения смешанно-лигандных антирезистентных агентов. *Технологии живых систем*. 2023;20(2):42-52. doi 10.18127/j20700997-202302-05