

## АНТИАДГЕЗИВНІ ВЛАСТИВОСТІ 4-(АДАМАНТИЛ-1)-1-(1-АМІНОБУТИЛ)БЕНЗОЛУ ЩОДО *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Н.І. Гуменюк

ДУ “Інститут фармакології та токсикології НАМН України”, Київ, Україна

Corresponding author: n22humeniuk@ipht.org.ua

Received 16 October 2024; Accepted 30 January 2025

**Проблематика.** *Staphylococcus aureus* віднесені до бактерій із високим рівнем стійкості до антимікробних препаратів, однією з причин якої є здатність мікроорганізмів формувати біоплівки. Перспективною стратегією антимікробної терапії у пацієнтів з інфекційними захворюваннями, пов'язаними з біоплівками, є вплив на перші етапи плівкоутворення.

**Мета.** Встановити здатність 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил)бензолу впливати на формування біоплівок *S. aureus* та експресію генів плівкоутворення.

**Методика реалізації.** Мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил)бензолу (шифр АМ-166) щодо метицилінрезистентного штаму *S. aureus* 222 визначали методом серійних мікро-розведень. Антибіоплівкову активність сполуки АМ-166 досліджували за методикою О'Тоолі, оцінку інтенсивності утворення біоплівки *S. aureus* визначали згідно зі Степановіч. Вплив АМ-166 на експресію генів досліджували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі.

**Результати.** МІК сполуки АМ-166 щодо *S. aureus* 222 становить 5 мкг/мл. За дії АМ-166 за 0,25 та 0,5 МІК здатність *S. aureus* до плівкоутворення змінюється з середньої (контроль) до слабкої, за 5,0 МІК штам втрачає здатність формувати біоплівку. Встановлено, що сполука в концентрації 0,5 МІК збільшує експресію гена *icaR* та знижує транскрипційну активність генів *icaA*, *clfB*, *fib*, *fnbB*, *ebpS*, *eno*, які беруть участь у плівкоутворенні й адгезії.

**Висновки.** Похідне адамантану АМ-166 порушує формування біоплівок MRSA, змінює транскрипційну активність генів *ica* локусу, пригнічує прикріплення *S. aureus* до біотичної поверхні через вплив на експресію генів.

**Ключові слова:** похідне адамантану; *Staphylococcus aureus*; експресія генів; біоплівка; адгезія.

### Вступ

Резистентність збудників інфекційних захворювань до антимікробних препаратів (АМП) є серйозною проблемою біобезпеки та становить загрозу для життя людей. Так, у 2015 р. резолюцією Всесвітньої асамблеї охорони здоров'я затверджено Глобальний план дій боротьби зі стійкістю до протимікробних препаратів, а у 2019 р. Кабінет Міністрів України ухвалив розпорядження “Про затвердження Національного плану дій боротьби із стійкістю до протимікробних препаратів”. У 2021 р. Рада національної безпеки і оборони України у своєму рішенні “Про Стратегію біобезпеки та біологічного захисту” визначила антибіотикорезистентність як нагальну проблему сьогодення та причину зростання смертності населення від інфекційних захворювань, спричинених стійкими до АМП штамми мікроорганізмів. На сьогодні відзнача-

ється, що багато впроваджених у клінічну практику препаратів частково або повністю втрачають свою ефективність, що призводить до ускладнень інфекційних процесів і смертності, а також значно збільшує фінансові витрати на лікування пацієнтів [1–3]. Розвиток антибіотикорезистентності, серед інших причин, забезпечується здатністю мікроорганізмів формувати біоплівки, адже відомо, що бактерії в їх складі в 10–1000 разів стійкіші до АМП, ніж їхні відповідні планктонні клітини [4, 5]. До мікроорганізмів із високим рівнем стійкості до АМП, патогенності та здатності до плівкоутворення віднесено *Staphylococcus aureus* [6, 7].

Золотистий стафілокок – грампозитивні умовно-патогенні бактерії, які спричиняють різні інфекційні захворювання у людей: від простих інфекцій шкіри та м'яких тканин до більш серйозних та небезпечних для життя станів (бактеріємія/септицемія). Інфекції, спри-

чинені *S. aureus*, важко піддаються лікуванню, характеризуються хронічним перебігом із частими рецидивами саме через утворення біоплівки [4, 8, 9].

Розвиток стафілококової біоплівки є складним процесом, який включає такі фази: адгезія бактеріальних клітин до абіотичної чи біотичної поверхні, синтез позаклітинного матриксу, проліферація клітин, структурування біоплівки та відшарування бактерій.

Плівкоутворення *S. aureus* переважно кодується 12-ма генами, відповідальними за синтез полісахаридних компонентів матриксу біоплівки та поверхневих білків, які беруть участь в адгезії клітин *S. aureus*, інвазії та подальшій колонізації тканин господаря, а також формуванні мікробних угруповань. До них віднесено гени міжклітинної адгезії *ica* локусу – *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* (*icaADBC*-оперон), ген *fib*, що відповідає за синтез фібриногензв'язуючого білка, гени *fnbA* і *fnbB* – регулюють продукцію фібронектинзв'язуючих білків, гени *clfA* і *clfB* – пластівцевотвірних факторів А і В, ген *ebpS* – еластинзв'язуючого білка, ген *eno* – ламінінзв'язуючого білка, ген *cna* – колагензв'язуючого білка [4, 9].

На першому етапі мікроорганізми *S. aureus* прикріплюються до біотичної або абіотичної поверхні за допомогою низки різних факторів і механізмів, включаючи поверхневі адгезини, тейхоеві кислоти, зміни в гідрофобності поверхні бактеріальних клітин і продукцію еДНК [10, 11]. При розвитку інфекційного процесу та формуванні біоплівок *S. aureus* адгезія до тканин організму господаря забезпечується поверхневими білковими адгезинами MSCRAMMs (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules). До них відносять білки FnBPA та FnBPB, що зв'язують фібронектин, пластівцевотвірні фактори А (ClfA) та В (ClfB), білки SdrC, SdrD, SdrE, багаті серином і аспарагіновою кислотою, тощо [11, 12].

Основним компонентом матриксу біоплівки *S. aureus* є полісахаридний міжклітинний адгезин (PIA), який синтезується на перших етапах її розвитку. Його продукція кодується локусом *ica*, який складається з регуляторного гена *icaR* й оперону *icaADBC*. PIA має катіонну природу та відіграє значну роль у колонізації тканин господаря, структуруванні біоплівки, розвитку біоплівкових інфекцій, ухиленні мікроорганізмів від імунної системи людини, резистентності бактерій до АМП [13].

Особливості структури, хімічного складу матриксу стафілококових біоплівок призводять до стійкості бактеріальних клітин до АМП і неефективності антимікробної терапії в пацієнтів з інфекційними захворюваннями, пов'язаними з біоплівками. Зокрема, це спричинене гетерогенністю бактеріальних клітин у мікробних спільнотах, швидким поширенням генів резистентності до АМП серед клітин у межах біоплівки, наявністю позаклітинного матриксу та низькою проникністю препаратів усередину біоплівки. Саме це зумовлює необхідність зміни стратегії антимікробної терапії та пошуку нових мішеней дії АМП: від пригнічення метаболічних процесів, що призводять до загибелі бактеріальних клітин, до порушення різних етапів плівкоутворення, впливу на фактори та механізми, які беруть участь у формуванні мікробних спільнот. Однією з ключових стратегій антибіоплівкової дії сполук є порушення першого етапу плівкоутворення – адгезії [10].

На увагу заслуговують нові групи хімічних речовин серед похідних адамантану, оскільки адамантанвмісні сполуки широко застосовуються в клінічній практиці та характеризуються високою біологічною активністю. Зокрема, серед цієї групи речовин досліджено багато сполук, які виявляють антимікробні властивості щодо грампозитивних і грамнегативних бактерій [14, 15]. Також нещодавніми дослідженнями у похідних адамантану виявлено антибіоплівкову активність і встановлено їх здатність підвищувати чутливість бактеріальних клітин до АМП [16].

*Мета нашої роботи* – встановити здатність 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил)бензолу впливати на формування біоплівок *S. aureus* та експресію генів плівкоутворення.

## Матеріали та методи

*Досліджувані речовини.* У дослідженні використана сполука 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил)бензол (шифр АМ-166), синтезована на ПАТ НВЦ “Борщагівський ХФЗ” (Україна).

*Мікроорганізми.* Антибіоплівкову активність похідного адамантану та його вплив на планктонні клітини досліджено щодо клінічного штаму метицилінрезистентного *S. aureus* 222 (MRSA), виділеного від пацієнта з гнійно-запальним захворюванням. Культура резистентна до оксациліну, цефокситину, чутлива до ванкоміцину та кліндаміцину [17].

**Визначення мінімальної інгібуючої концентрації.** Мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) сполуки АМ-166 визначали методом серійних мікророзведень у рідкому живильному середовищі згідно з [18].

**Дослідження антибіоплівкової активності.** Здатність адамантанвмісної сполуки АМ-166 впливати на плівкоутворення *S. aureus* досліджували у концентраціях 0,15, 0,25, 0,5 і 5,0 МІК за методикою О'Тоолі [19]. В експериментах використана нічна тест-культура золотистого стафілокока, вирощена на Tryptone Soya Broth (TSB) за 35–37 °С. Для приготування інокуляту нічну культуру розводили 1:100 у TSB. Термін інкубації зі сполукою становив 24 год за 37 °С. Після інкубації вміст планшетів видаляли, лунки промивали дистильованою водою, утворену біомасу біоплівки фарбували 0,1 %-вим розчином генціанвіолету протягом 10 хв із подальшим екстрагуванням барвника в органічний розчинник (96,0 %-вий розчин етанолу). Результати дослідження реєстрували за довжини хвилі 630 нм за допомогою Adsorbance Microplate Reader ELx800 (BioTek, США). Ступінь інтенсивності утворення біоплівки золотистим стафілококом ви-

значали відповідно до критеріїв, розроблених Stepanovic [20].

**Кількісна ПЛР у реальному часі.** Вивчення впливу АМ-166 на експресію досліджуваних генів проводили за допомогою ПЛР у реальному часі за дії в концентрації 0,5 МІК. Загальну РНК виділяли із суспензії клітин 1-добової культури з використанням TRIzol Reagent (Invitrogen) із подальшою обробкою ДНКазою I (Fermentas, Литва). Концентрацію РНК визначали на спектрофотометрі DS-11 FX+ (DeNovix, США) за 260 нм. кДНК синтезували з 500 нг РНК, використовуючи RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США) згідно з інструкцією виробника. Реакційна суміш для кількісної ПЛР у реальному часі містила 5 мкл PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™, США), 20 пмоль кожного праймера (прямого та зворотного) (табл. 1) та 3 мкл кДНК бактерій. Ампліфікацію проводили на приладі QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, США).

Експресію гена *16S pPHK* розглядали як внутрішній контроль. Відносний рівень експресії генів розраховували за  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  методом [24].

**Таблиця 1:** Праймери, використані в молекулярних дослідженнях

| Праймери                             | Нуклеотидна послідовність (5'–3')                         | Посилання |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------|
| <i>icaA</i> (Fw)<br><i>icaA</i> (Rv) | ACACTTGCTGGCGCAGTCAA<br>TCTGGAACCAACATCCAACA              | [21]      |
| <i>icaD</i> (Fw)<br><i>icaD</i> (Rv) | ATGGTCAAGCCCAGACAGAG<br>AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA           | [21]      |
| <i>icaR</i> (Fw)<br><i>icaR</i> (Rv) | ATCTAATACGCCTGAGGA<br>TTCTTCCACTGCTCCAA                   | [22]      |
| <i>fib</i> (Fw)<br><i>fib</i> (Rv)   | CTACAAC TACAATTGCGTCAACAG<br>GCTCTTGTAAGACCATTTCCTCAC     | [21]      |
| <i>fnbB</i> (Fw)<br><i>fnbB</i> (Rv) | GTAACAGCTAATGGTCTGAATTGATACT<br>CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC | [21]      |
| <i>clfB</i> (Fw)<br><i>clfB</i> (Rv) | ACATCAGTAATAGTAGGGG<br>TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC             | [21]      |
| <i>ebpS</i> (Fw)<br><i>ebpS</i> (Rv) | CATCCAGAACCAATCGAAGAC<br>AGTTACATCATCATGTTTATCTTTTG       | [21]      |
| <i>eno</i> (Fw)<br><i>eno</i> (Rv)   | ACGTGCAGCAGCTGACT<br>CAACAGCATCTTCAGTACCTTC               | [21]      |
| 16S-1(Fw)<br>16S-2 (Rv)              | CTGTCGTCAGCTCGTGTTGT<br>TTCATG GAGTCGAGTTGCAG             | [23]      |

*Примітки.* Fw – прямий праймер; Rv – зворотний праймер.

**Статистична обробка результатів.** Для аналізу результатів досліджень використано метод ANOVA. Статистичну обробку проводили за допомогою комп'ютерної програми Statistica 6.0 (StatSoft. Inc., США). Дані дослідження представлені у вигляді  $M \pm m$ , де  $M$  – середнє значення,  $m$  – стандартна помилка середнього.

Результати

Отримані дані свідчать, що МІК похідного адамантану АМ-166 щодо клінічного штаму *S. aureus* 222 становить 5 мкг/мл.

Результатами дослідження антибіоплівкової активності похідного адамантану встановлено (табл. 2), що сполука АМ-166 здатна пригнічувати формування біоплівки золотистим стафілококом, про що свідчить зміна здатності мікроорганізмів до плівкоутворення.

Результатами дослідження продемонстровано (табл. 2), що метицилінрезистентний штам *S. aureus* 222 характеризується середньою здатністю до формування біоплівки. За впливу АМ-166 у концентрації 0,25 і 0,5 МІК відзначено зменшення біомаси біоплівки у 1,2 і

1,5 разу відповідно, що призводить до змін у здатності золотистого стафілокока до плівкоутворення від середньої до слабкої. При збільшенні концентрації до 5,0 МІК клітини *S. aureus* 222 втрачають здатність формувати біоплівку. За дії адамантанвмісної сполуки в найнижчій концентрації 0,15 МІК змін у плівкоутворенні *S. aureus* не виявлено порівняно з контролем.

Молекулярними дослідженнями встановлено (рис. 1), що за дії АМ-166 у субінгібуючій концентрації 0,5 МІК експресія гена *icaA* зменшується у 2 рази порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ), статистично достовірних змін в експресії гена *icaD* за дії сполуки не виявлено.

Результатами експериментів показано, що похідне адамантану значно стимулює транскрипційну активність негативного регулятора *icaADBC*-оперона *icaR* (у 12 разів порівняно з контролем). Збільшення активності гена *icaR* призводить до пригнічення експресії *icaADBC*-оперону, порушення синтезу РІА-полісахариду та плівкоутворення.

При аналізі експресії генів адгезії *clfB*, *fib*, *fnbB*, *ebpS* та *eno* у тест-штаму золотистого

Таблиця 2: Вплив сполуки АМ-166 на формування біоплівки *S. aureus* 222

| Умови експерименту | Біомаса біоплівки, ум. од. | Здатність штаму до плівкоутворення |
|--------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Контроль культури  | 0,102 ± 0,007              | Середня                            |
| 0,15 МІК           | 0,101 ± 0,007              | Середня                            |
| 0,25 МІК           | 0,076 ± 0,003              | Слабка                             |
| 0,5 МІК            | 0,050 ± 0,003*             | Слабка                             |
| 5,0 МІК            | 0,006 ± 0,001*             | Відсутня                           |

Примітки. \* – статистично достовірні відмінності, порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ); МІК – мінімальна інгібуюча концентрація.

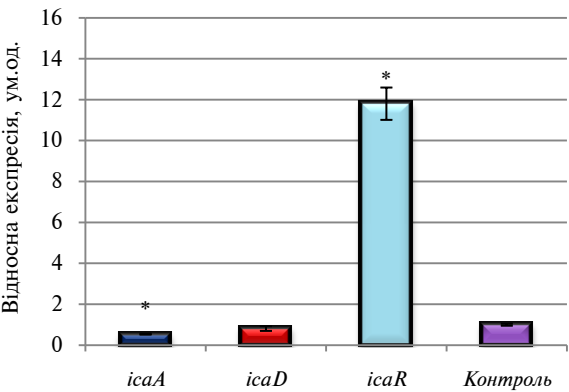


Рисунок 1: Відносна експресія генів плівкоутворення ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) у *S. aureus* 222 за дії сполуки АМ-166; \* – статистично достовірні відмінності порівняно з контролем ( $p < 0,05$ )

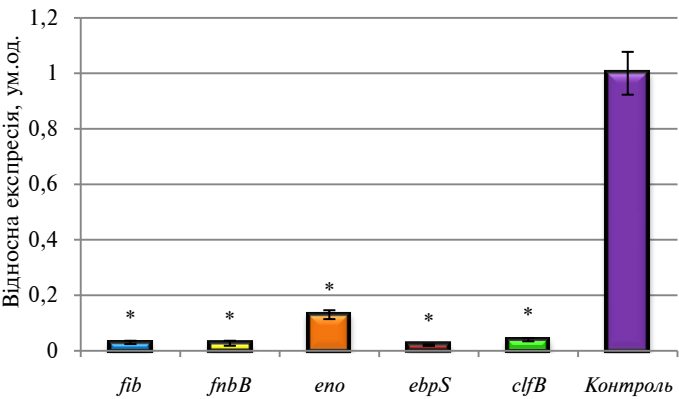


Рисунок 2: Відносна експресія генів адгезії ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) у *S. aureus* 222 за дії сполуки АМ-166; \* – статистично достовірні відмінності порівняно з контролем ( $p < 0,05$ )



стафілокока встановлено (рис. 2), що за дії AM-166 транскрипційна активність *clfB*, *fib*, *fnbB*, *ebpS* майже не детектувалась, експресія гена *eno* зменшувалась більш ніж у 5 разів порівняно з контролем.

Таким чином, похідне адамантану AM-166 виявляє виразний антибіоплівковий ефект щодо *S. aureus*. Активність сполуки реалізується здатністю впливати на експресію генів, відповідальних за плівкоутворення й адгезію у *S. aureus*, що може призводити до порушення синтезу міжклітинного полісахаридного адгезина PIA, поверхневих білків-адгезинів, регуляторних процесів формування біоплівки та вивільнення еДНК.

### Обговорення

За останні роки зросла кількість інфекцій, спричинених ізолятами MRSA, які є стійкими не лише до  $\beta$ -лактамних антибіотиків, але й до різних груп АМП. Стійкі до дії антимікробних засобів патогени знижують ефективність антимікробної хіміотерапії, що призводить до збільшення матеріальних затрат на лікування та летальності пацієнтів. Серйозною проблемою є хронічні, рецидивуючі інфекції, спричинені мікробними угрупованнями – біоплівками. Життєвий цикл біоплівки включає декілька етапів, початковим із яких є прикріплення планктонних клітин до поверхні. Адгезія до субстрату здійснюється за участі різних типів адгезинів, які здатні розпізнавати великі глікопротеїни, що містяться в плазмі хазяїна та позаклітинному матриксі. Цей процес у золотистого стафілокока опосередковується опероном *icaADBC*, з експресією якого пов'язана продукція PIA – основного фактора міжклітинної адгезії бактеріальних клітин на початкових етапах формування біоплівки [4, 9, 11]. При адгезії та інвазії *S. aureus* відіграють білки, синтез яких регулюється генами *sna*, *ebpS*, *eno*, *fib*, *fnbA*, *fnbB*. Так, білок  $\alpha$ -енолаза, що кодується геном *eno*, опосередковує зв'язування стафілокока з ламініном, забезпечує колонізацію тканин, інвазію та поширення бактерій через кров'яне русло. Фібриногензв'язуючий білок Fib, що кодується геном *fib*, сприяє колонізації ранової поверхні, імплантів, спричиняючи девайс-інфекції тощо.

З урахуванням важливості етапу адгезії клітин до поверхні, порушення плівкоутворення на початкових етапах може бути мішенню дії АМП і однією зі стратегій у боротьбі з хронічними інфекціями. Розробка нових ефективних препаратів можлива за розуміння як меха-

нізмів утворення біоплівки, так і змін, що спостерігаються в мікробних угрупованнях за їх дії.

Як антибіоплівкові агенти на увагу заслуговують адамантанвмісні сполуки, які виявляють широкий спектр біологічної активності, зокрема антимікробну дію [14–16, 25]. Дизайн представленого дослідження антистафілококової активності 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил)бензолу щодо бактеріальних біоплівок є частиною поглиблених досліджень механізму антибіоплівкової дії похідних адамантану. Він включає вивчення впливу сполуки на перший етап плівкоутворення *S. aureus* та експресію ключових генів, які беруть участь на цьому етапі формування біоплівок (гени *ica* локусу й адгезії).

При дослідженні антибактеріальної активності похідного адамантану AM-166 щодо біоплівок MRSA було встановлено, що сполука запобігає їх утворенню за дії як субінгібуючих концентрацій (0,25 і 0,5 МІК), так і в концентрації, що перевищує МІК (5,0 МІК). Подібну антибіоплівкову дію на перших етапах плівкоутворення золотистого стафілокока було зареєстровано і за дії іншого похідного адамантану – сполуки KBM-97. Також встановлено, що сформовані біоплівки MRSA не були чутливими до дії досліджуваних адамантанвмісних речовин [17, 26].

Дослідження окремих аспектів механізму антимікробної активності похідних адамантану щодо мікробних спільнот MRSA показали, що сполука AM-166 призводить до змін транскрипційної активності генів, відповідальних за плівкоутворення, міжклітинну адгезію бактерій (*icaA*, *icaR*), колонізацію мікроорганізмів (*ebpS*, *eno*), адгезію до біотичної поверхні (*clfB*, *fib*) та інвазію (*fnbB*) [4].

За дії субінгібуючої концентрації AM-166 було відзначено зниження експресії гена *icaA*, що входить до складу оперона *icaADBC*. Зазначений ген є ключовим у синтезі PIA – основного міжклітинного адгезина та полісахаридного компонента матриксу біоплівки *S. aureus*. Експресія гена *icaA* забезпечує синтез ферменту N-ацетилглюкозамін-трансферази, за участі якого UDP-N-ацетилглюкозамін перетворюється на полі-ацетилглюкозамін – попередник PIA [13]. Регуляторним геном *icaADBC*-оперона є *icaR*, який пригнічує його експресію. Мутації в негативному регуляторі *icaR* призводять до гіперпродукції PIA та посиленого формування біоплівок клітинами золотистого стафілокока [27]. Нашими дослідженнями було встановлено, що похідне адамантану AM-166 значно посилює

експресію *icaR* (у 12 разів), що може забезпечувати пригнічення гена *icaA*, а також антибіоплівковий ефект сполуки щодо MRSA. Подібний механізм антибіоплівкової активності щодо *S. aureus* було виявлено у неантимікробного препарату цинакальцету, за дії якого відзначено зміни в експресії *icaR* [28]. Іншими дослідниками було зареєстровано пригнічення плівкоутворення золотистого стафілокока через вплив на експресію генів *icaADBC*-оперона в куркуміну й АМП лінезоліду [29, 30]. Варто відзначити, що, на відміну від похідного адамантану АМ-166, куркумін знижував транскрипційну активність генів *icaA*, *icaB*, *icaD*, не змінюючи експресії регулятора *icaR*.

Згідно з результатами дослідження, похідне адамантану АМ-166 значно знижує рівень відносної експресії генів адгезії *clfB*, *fib*, *fnbB*, *ebpS* та *eno* у MRSA. Це може призвести до порушення першого етапу плівкоутворення та колонізації тканин організму людини клітинами *S. aureus*. Пригнічення експресії генів, відповідальних за синтез поверхневих білків-адгезинів у золотистого стафілокока було відзначено і за дії природних речовин [31]. Показано [32–34], що антиадгезивну активність щодо золотистого стафілокока виявляють АМП даптоміцин і тигециклін, протималарійний препарат артезунат, органічний барвник алізарин, про що свідчать зміни транскрипційної активності генів адгезії, проте досліджувані речовини виявляють штам-специфічну дію.

## References

- [1] European Comission. A European one health action plan against antimicrobial resistance (AMR) [Internet]. health.ec.europa.eu. 2024 [cited 2024 Oct 10]. Available from: [https://ec.europa.eu/health/system/files/2020-01/amr\\_2017\\_action-plan\\_0.pdf](https://ec.europa.eu/health/system/files/2020-01/amr_2017_action-plan_0.pdf)
- [2] Widmer AF. Emerging antibiotic resistance: Why we need new antibiotics! Swiss Med Wkly. 2022 Nov 9;152:40032. DOI: 10.57187/smw.2022.40032
- [3] Tang KWK, Millar BC, Moore JE. Antimicrobial Resistance (AMR). Br J Biomed Sci. 2023 Jun 28;80:11387. DOI: 10.3389/bjbs.2023.11387
- [4] Idrees M, Sawant S, Karodia N, Rahman A. *Staphylococcus aureus* biofilm: morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies. Int J Environ Res Public Health. 2021 Jul 16;18(14):7602. DOI: 10.3390/ijerph18147602
- [5] Shin HJ, Yang S, Lim Y. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* with different degrees of biofilm formation. J Anal Sci Technol. 2021;12:41. DOI: 10.1186/s40543-021-00294-2
- [6] World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internet]. World Health Organization. 2017 [cited 2024 Oct 10]. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- [7] Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. Pathogens. 2021 Oct 12;10(10):1310. DOI: 10.3390/pathogens10101310
- [8] John J Jr. The treatment of resistant staphylococcal infections. F1000Res. 2020 Feb 26;9:F1000 Faculty Rev-150. DOI: 10.12688/f1000research.17718.1
- [9] Tuon FF, Suss PH, Telles JP, Dantas LR, Borges NH, Ribeiro VST. Antimicrobial treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. Antibiotics. 2023;12(1):87. DOI: 10.3390/antibiotics12010087

## Висновки

Сполука 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил)-бензол виявляє виразну антибіоплівкову активність щодо MRSA на перших етапах плівкоутворення. За дії АМ-166 змінюється експресія генів *icaA*, *icaR*, *clfB*, *fib*, *fnbB*, *ebpS* і *eno*, відповідальних за продукцію міжклітинного полісахаридного адгезину PIA та поверхневих білків-адгезинів. Отримані дані щодо впливу адамантанвмісної сполуки на плівкоутворення золотистого стафілокока свідчать про необхідність проведення подальших поглиблених досліджень для з'ясування її дії на патогенність і токсиноутворення MRSA з огляду на важливу роль факторів вірулентності в перебігу інфекційного процесу.

## Фінансування

Дослідження здійснювалося за фінансової підтримки НАМН України в рамках науково-дослідної роботи ДУ “Інститут фармакології та токсикології НАМН України” “Вивчення особливостей формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* та *Quorum Sensing* регуляції за дії похідних адамантану” (№ державної реєстрації 0121U109291).

## Розкриття інтересів

Автор заявляє про відсутність конфлікту інтересів.

- [10] Kranjec C, Morales Angeles D, Torrisen Mârli M, Fernández L, Garcha P, Kjos M, et al. Staphylococcal biofilms: Challenges and novel therapeutic perspectives. *Antibiotics (Basel)*. 2021 Jan 29;10(2):131. DOI: 10.3390/antibiotics10020131
- [11] Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal biofilm development: Structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2020 Aug 12;84(3):e00026-19. DOI: 10.1128/MMBR.00026-19
- [12] Foster TJ. Surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr*. 2019; 7(4). DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0046-2018
- [13] Nguyen HTT, Nguyen TH, Otto M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA - Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020 Nov 4;18:3324-34. DOI: 10.1016/j.csbj.2020.10.027
- [14] Al-Wahaibi LH, Hassan HM, Abo-Kamar AM, Ghabbour HA, El-Emam AA. Adamantane-Isothiourea hybrid derivatives: Synthesis, characterization, in vitro antimicrobial, and in vivo hypoglycemic activities. *Molecules*. 2017 Apr 29;22(5):710. DOI: 10.3390/molecules22050710
- [15] Zhan W, Gao G, Liu Z, Liu X, Xu L, Wang M, et al. Enzymatic self-assembly of adamantane-peptide conjugate for combating *Staphylococcus aureus* infection. *Adv Healthc Mater*. 2023 Jul;12(18):e2203283. DOI: 10.1002/adhm.202203283
- [16] Tan F, She P, Zhou L, Liu Y, Chen L, Luo Z, et al. Bactericidal and anti-biofilm activity of the retinoid compound CD437 against *Enterococcus faecalis*. *Front Microbiol*. 2019;10:2301. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02301
- [17] Humeniuk N, Zelena L, Vrynchanu N, Ishchenko L, Bukhtiarova T, Korotkij Y, et al. Effect of adamantane derivative on expression of biofilm-associated genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Med Drug Discov*. 2023;18:100155. DOI: 10.1016/j.medidd.2023.100155
- [18] ISO 20776-1:2019. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. Geneva: International Organization for Standardization. 2019. Available at: <https://www.iso.org/standard/70464.html>
- [19] O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp*. 2011 Jan 30;(47):2437. DOI: 10.3791/2437
- [20] Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007 Aug;115(8):891-9. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_630.x
- [21] Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Lung LT, Hamat RA, Karunanidhi A, et al. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:976972. DOI: 10.1155/2012/976972
- [22] Melo TA, Dos Santos TF, de Almeida ME, Junior LAGF, Andrade EF, Rezende RP, et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. *BMC Microbiol* 2016;16(1):250. DOI: 10.1186/s12866-016-0871-8
- [23] Zelena L, Gretskey I, Gromozova E. Influence of ultrahigh frequency irradiation on *Photobacterium phosphoreum luxB* gene expression. *Cent Eur J Biol* 2014;9:1004-10. DOI: 10.2478/s11535-014-0347-5
- [24] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- [25] Wang L, Liu L, Zhang C, Yu G, Lin W, Duan X, et al. Design, synthesis, anti-infective potency and mechanism study of novel Ru-based complexes containing substituted adamantane as antibacterial agents. *Eur J Med Chem*. 2024 Apr 15;270:116378. DOI: 10.1016/j.ejmech.2024.116378
- [26] Hrynchuk N, Zelena L, Bukhtiarova T, Vrynchanu N, Ishchenko L, Vazhnichaya E. Antibiofilm activity of 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl)benzol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Mikrobiol Z*. 2022;84(3):39-50. DOI: 10.15407/mikrobiolj84.03.039
- [27] Yu L, Hisatsune J, Kutsuno S, Sugai M. New molecular mechanism of superbiofilm elaboration in a *Staphylococcus aureus* clinical strain. *Microbiol Spectr*. 2023 Jan 31;11(2):e0442522. DOI: 10.1128/spectrum.04425-22
- [28] Fang ZY, Zhang ZY, Zheng YD, Lei D, Zhuang J, Li N, et al. Repurposing cinacalcet suppresses multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by disruption of cell membrane and inhibits biofilm by targeting IcaR. *J Antimicrob Chemother*. 2024 Apr 2;79(4):903-17. DOI: 10.1093/jac/dkae051
- [29] Mohammad GJ. Expression of *icaA*, *B*, *D*, *R* and *ebps* biofilm-associated genes in methicillin-resistant-*Staphylococcus aureus* in exposure to curcumin. *Gene Rep*. 2022;27:101616. DOI: 10.1016/j.genrep.2022.101616
- [30] Kuang H, Bi H, Li X, Lv X, Liu Y. Inhibition of *S. aureus* biofilm formation by linezolid alleviates sepsis-induced lung injury caused by *S. aureus* infection through direct inhibition of *icaA* activity. *New Microbiol*. 2023 Sep;46(3):285-95
- [31] Kot B, Sytykiewicz H, Sprawka I, Witeska M. Effect of manuka honey on biofilm associated genes expression during methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Sci Rep*. 2020;10(1):13552. DOI: 10.1038/s41598-020-70666-y
- [32] Qian Y, Xia L, Wei L, Li D, Jiang W. Artesunate inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation by reducing alpha-toxin synthesis. *Arch Microbiol*. 2021 Mar; 203(2):707-17. DOI: 10.1007/s00203-020-02077-6

- [33] Atshan SS, Hamat RA, Coolen MJL, Dykes G, Sekawi Z, Mullins BJ, et al. The role of subinhibitory concentrations of daptomycin and tigecycline in modulating virulence in *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* (Basel). 2021 Jan 3;10(1):39. DOI: 10.3390/antibiotics10010039
- [34] Nasser A, Dallal MMS, Jahanbakhshi S, Azimi T, Nikouei L. *Staphylococcus aureus*: Biofilm formation and strategies against it. *Curr Pharm Biotechnol*. 2022;23(5):664-78. DOI: 10.2174/1389201022666210708171123

.....

N.I. Humeniuk

State Institution "Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine

#### ANTI-ADHESION PROPERTIES OF 4-(ADAMANTYL-1)-1-(1-AMINOBTYL)BENZOLE AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

**Background.** *Staphylococcus aureus* is classified as a bacterium with a high level of antibiotic resistance, one of the contributing factors being its ability to form biofilms. Targeting the early stages of biofilm formation is a promising strategy for antimicrobial therapy in patients with biofilm-associated infections.

**Objective.** To determine the ability of 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl)benzole to influence the formation of *S. aureus* biofilms and the expression of biofilm formation genes.

**Methods.** The minimum inhibitory concentration (MIC) of 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl)benzole (code AM-166) against the methicillin-resistant *S. aureus* strain 222 was determined using the serial microdilution method. The antibiofilm activity of AM-166 was studied using O'Toole's method, and the intensity of *S. aureus* biofilm formation was assessed according to Stepanovic. The effect of AM-166 on gene expression was investigated using real-time PCR.

**Results.** The MIC of AM-166 against *S. aureus* 222 was determined to be 5 µg/ml. In the presence of AM-166 at 0.25 and 0.5 MIC, *S. aureus* biofilm formation decreased from moderate (control) to weak, while at 5.0 MIC, the strain completely lost its ability to form biofilms. It was found that at a concentration of 0.5 MIC, AM-166 increased the expression of the *icaR* gene while decreasing the transcriptional activity of the *icaA*, *clfB*, *fib*, *fnbB*, *ebpS*, and *eno* genes, which are involved in biofilm formation and adhesion.

**Conclusions.** The adamantane derivative AM-166 disrupts MRSA biofilm formation, alters the transcriptional activity of *ica*-locus genes, and inhibits *S. aureus* attachment to biotic surfaces by affecting gene expression.

**Keywords:** adamantane derivative; *Staphylococcus aureus*; gene expression; biofilm; adhesion.