

На правах рукописи

МАСЕЙКИНА АЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ВЛИЯНИЕ НОВЫХ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ – ПРОИЗВОДНЫХ
ЗАМЕЩЕННЫХ АМИНОИНДОЛОВ – НА НЕКОТОРЫЕ УСЛОВНО-
ПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ**

Специальность:
1.5.11. – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оболенск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель:

Степаненко Ирина Семеновна, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии с курсом клинической микробиологии, заведующий кафедрой.

Официальные оппоненты:

Заславская Майя Исааковна, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины, профессор, г. Нижний Новгород;

Купряшина Мария Александровна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, заведующий лабораторией микробиологии, г. Саратов.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Защита состоится «8» декабря 2023 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, г. о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А», д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 64.1.002.01
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Во всем мире заболеваемость и смертность, вызванные инфекционными агентами, является одной из наиболее серьезных научных проблем и глобальных угроз здоровью нашего времени (Rohr J. R., 2019). В совокупности инфекционные агенты ежегодно приводят к приблизительно 9 миллионам смертей, а также значительным экономическим затратам (Yin K., 2020). В настоящее время стратегии профилактики и лечения этих заболеваний охватывают широкий спектр подходов, включая вакцины, низкомолекулярные лекарственные средства, повышенную гигиеническую практику, а также вмешательства по конкретным заболеваниям, например, использование барьерной контрацепции для предотвращения передачи ВИЧ. Несмотря на то, что эти вмешательства спасли миллионы жизней, неприемлемо высокий уровень смертности в сочетании с растущей устойчивостью к антимикробным препаратам требует постоянных инвестиций в новые стратегии борьбы с этими патогенами (Попова А. Ю. и др., 2015).

Антимикробные препараты играют важную роль в лечении инфекционных заболеваний: они ответственны за борьбу с инфекцией во всем мире, а также за снижение заболеваемости и смертности в рамках этой нозологии (Brun-Buisson C., 2017). Однако в каждом случае, когда внедрялись новые химиотерапевтические агенты, устойчивость к ним со временем развивалась (Marston H. D. et al., 2016; Santajit S. et al., 2016). В принципе, нынешняя стратегия решения этой проблемы заключается в крупных инвестициях в разработку лекарств с надеждой на то, что новые лекарства станут доступными до того, как все существующие лекарства потеряют свою эффективность. Вместо того, чтобы сосредоточиться на «стороне развития» проблемы, другой возможной стратегией является инвестирование в методы замедления развития сопротивления (Ayukekbong J. A. et al., 2017).

Актуальность обозначенной выше темы обусловлена понятной потребностью в получении и исследовании особенностей действия новых антимикробных соединений, имеющих высокий антимикробный потенциал и, в тоже время, имеющих низкую токсичность (Заман С. Б., 2017).

В последние десятилетие активно проводятся исследования индола и его производных. Дело в том, что индольные алкалоиды служат основой природных и синтетических физиологически активных веществ. Являясь частью живых систем, индол содержится в молекулах биогенного амина серотонина и незаменимой белковой аминокислоты триптофана. У ароматических аминов присутствует аминогруппа в бензольной части молекулы, которая предоставляет возможность получать различные производные с ее участием. Именно эта возможность применяется в поиске и синтезе новых соединений с биологической активностью (Yamashkin S. A. et al., 2003; Yamashkin S. A. et al., 2008).

Целью работы является анализ антибактериального потенциала нового класса синтетических соединений – хлорсодержащих производных замещенных аминоиндоллов.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи**:

1) собрать и создать рабочую коллекцию штаммов микроорганизмов *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* из образцов больных с различными неспецифическими заболеваниями мочевыводящих путей, органов дыхания, кишечника с различной чувствительностью к традиционно применяемым антимикробным препаратам;

2) провести внеэкспериментальный прогноз потенциальной биологической активности новой группы соединений;

3) реализовать первичный скрининг 12-ти новых хлорсодержащих ацетатов 5-,6-,7-аминоиндолов на наличие антибактериального воздействия в отношении грамположительных и грамотрицательных условно-патогенных микроорганизмов, используя созданную рабочую коллекцию;

4) определить тип антимикробного действия исследуемой группы соединений;

5) проанализировать морфологические изменения микробных клеток под воздействием хлорсодержащих производных 5-,6-,7-аминоиндолов;

6) выявить наличие ДНК-повреждающего и мутагенного действия тестируемых веществ *in vitro*.

Научная новизна исследования. Впервые охарактеризована по антимикробному действию новая группа из 12 хлорсодержащих производных замещенных 5-,6-,7-аминоиндолов. Показано, что исследуемые соединения оказывают антимикробное действие на референсные штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P и ATCC 43300 (MRSA), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 и клинические штаммы (n=156) *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *E. coli* и *P. aeruginosa* в минимальных подавляющих концентрациях (МПК) от 0,98 до 250 мг/л. Впервые получены данные о высокой активности соединений 2-хлор-N-(2,3-диметил-1H-индол-7-ил)ацетамид (лабораторный шифр **T1**), 2-хлор-N-(5-метокси-2,3-диметил-1H-индол-6-ил)ацетамид (лабораторный шифр **T4**), 2-хлор-N-(1,2,3-триметил-1H-индол-6-ил)ацетамид (лабораторный шифр **T7**), монохлорацетат 2,3-диметил-1H-индол-7-аммония (лабораторный шифр **T12**), значения МПК которых ниже таковых препаратов сравнения бензалкония хлорида, диоксидина, хлоргексидина, нитрофурантоина и фосфомицина в отношении штаммов *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *E. coli* и *P. aeruginosa*.

Впервые показано снижение поглощения красителя кристаллического фиолетового клеточной стенкой *S. aureus* ATCC 6538-P и *E. coli* ATCC 25922 в присутствии соединений **T1**, **T4**, **T7** и **T12**, которые дозозависимо влияют на проницаемость клеточной стенки в концентрациях 1,96; 7,9; 31,3; 125,0 и 500,0 мг/л.

Впервые, с использованием сканирующего электронного микроскопа (СЭМ), получены данные о морфологических изменениях клеточной стенки бактериальных клеток *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. coli* под воздействием хлорсодержащих производных 5-,6-,7-аминоиндолов в концентрации 500,0 мг/л.

Впервые установлен бактерицидный тип антимикробного действия испытуемых соединений с использованием классической методики определения (отсутствие видимого роста культуры *S. aureus* ATCC 6538-P в течение 5 сут) и с использованием разработанного в ходе исследования метода оценки коэффициента оптической плотности жидкой питательной среды при культивировании микроорганизмов с антимикробными веществами ($K_D < 1$).

Впервые определено отсутствие мутагенных свойств тестируемых соединений **T4**, **T7** и **T12** *in vitro* на штаммах *S. typhimurium* TA98 и *S. typhimurium* TA100 и дозозависимая мутагенная активность соединения **T1** на обоих тестерных штаммах (превышение над спонтанным фоном мутирования в 2,46 и 2,06 раз соответственно). Впервые зафиксировано воздействие на ДНК прокариотической клетки (*E. coli*) соединений **T1** и **T12** в концентрациях 500,0 мкг/диск и 1000,0 мкг/диск и незначительный ДНК-повреждающий

эффект (не более 50%) у Т4 и Т7.

Разработан способ определения типа противомикробного действия соединения, обладающего антимикробной активностью (патент РФ №2687264).

Разработан способ получения трифторацетатов замещенных 6-аминоиндолов, обладающих противомикробным действием (патент РФ №2721833).

Разработан способ получения монохлорацетатов замещенных 5-,6-,7-аминоиндолов, обладающих противомикробным действием (патент РФ №2724605).

Разработана модель микробного топливного элемента (патент на полезную модель РФ №209073).

Теоретическая и практическая значимость работы. Изучение и поиск новых соединений с антимикробными свойствами имеет важное теоретическое значение, поскольку оно расширяет понимание взаимодействия микроорганизмов с химическими соединениями, а также механизмов, лежащих в основе их антимикробной активности. Это позволяет углубить знания о молекулярных механизмах действия антимикробных средств, влиянии различных химических структур на их эффективность и специфичность действия.

Материалы диссертационного исследования, в частности, микрофотографии бактериальных клеток *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *E. coli*, используются в Медицинском институте Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарёва при изучении дисциплин «Микробиология и вирусология» и «Микробиология полости рта» (Акт внедрения от 12.01.2023 г.) – учрежденческий уровень внедрения.

Созданная рабочая коллекция штаммов *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *E. coli* используется в образовательных и научных целях и хранится на кафедре иммунологии, микробиологии и вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарёва (Лицензия 13.01.04.001.Л.000005.06.11 от 23.06.2011) (Акт внедрения от 12.01.2023 г.) – учрежденческий уровень внедрения.

Соединения **Т1**, **Т4**, **Т7** и **Т12** используются в учебных и научно-исследовательских целях в Медицинском институте Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарёва (Акт внедрения от 12.01.2023 г.) – учрежденческий уровень внедрения.

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы заключалась в комплексном подходе к изучению влияния на бактериальную клетку нового класса синтетических соединений – хлорсодержащих производных замещенных аминокислот. В работе использованы микробиологические, биоинформатические и статистические методы, метод сканирующей электронной микроскопии, методы выявления и оценки генотоксичности и мутагенности.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанные в ходе исследования новые хлорзамещенные 5-,6-,7-аминоиндолы обладают антимикробной активностью (с МПК = 0,98-1000,0 мг/л), превышающей таковую препаратов сравнения бензалкония хлорида, диоксида, хлоргексидина, нитрофурантоина и фосфомицина, в отношении условно-патогенных микроорганизмов рабочей коллекции.

2. Разработанные соединения 2-хлор-*N*-(2,3-диметил-1*H*-индол-7-ил)ацетамид (лабораторный шифр **Т1**), 2-хлор-*N*-(5-метокси-2,3-диметил-1*H*-индол-6-ил)ацетамид (лабораторный шифр **Т4**), 2-хлор-*N*-(1,2,3-триметил-1*H*-индол-6-ил)ацетамид (лабораторный шифр **Т7**), монохлорацетат 2,3-диметил-1*H*-индол-7-аммония (лабораторный шифр **Т12**) вызывают морфологические изменения микробных клеток рабочей коллекции (*E. coli*, *S. aureus* и *P. aeruginosa*), такие как увеличение шероховатостей

клеточной стенки, разрушение, набухание и лизис клеток.

3. Разработанный способ определения антимикробного действия, основанный на вычислении коэффициента оптической плотности культуральной среды в ходе культивирования микроорганизмов с антимикробными соединениями в жидкой питательной среде, позволяет подтвердить бактерицидное действие соединений **T1**, **T4**, **T7** и **T12**.

4. Разработанные соединения **T4** и **T7** характеризуются отсутствием генотоксичности и мутагенности; соединение **T1** проявляет ДНК-повреждающий эффект и дозозависимую мутагенность; соединение **T12** не обладает мутагенной активностью, но проявляет дозозависимый ДНК-повреждающий эффект.

Степень достоверности и апробации результатов исследования. Результаты экспериментального исследования представлены последовательно, статистически достоверны (стандартный пакет MS Excel, Stat 7.0). Экспериментальные данные, представленные к защите диссертации, опубликованы в рецензируемых научных журналах и обсуждены на конференциях различного уровня. Результаты исследований подтверждены четырьмя патентами РФ.

Диссертация подготовлена на кафедре иммунологии, микробиологии и вирусологии Медицинского института ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва». Лицензия 13.01.04.001.Л.000005.06.11 от 23.06.2011 «Диагностические исследования, хранение простейших, гельминтов, санитарно-показательных микроорганизмов, музейных штаммов и материала зараженного или с подозрением на зараженность III-IV групп патогенности» (срок действия – бессрочно).

Настоящая работа выполнялась в соответствии с Паспортом научных направлений ФГБОУ ВО «МГУ им Н. П. Огарева» (Решение НТС, протокол №1 от 09.02.2018г.) и с научной тематикой «Исследование чувствительности микроорганизмов к традиционным антимикробным средствам и поиск новых соединений с противомикробной активностью» кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им Н. П. Огарева».

Материалы диссертации представлены на Всероссийской научной конференции с международным участием «Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019), ежегодном Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии «Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, 2018, 2020), ежегодных научных конференциях «Огарёвские чтения» ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарёва» (Саранск, 2016; 2017; 2018; 2019; 2021; 2023), межрегиональной научно-практической конференции «Клинические лабораторные исследования: современные стандарты, перспективы развития» (Рязань, 2020).

Публикации. Научные положения работы представлены в 15 научных публикациях, из них 4 – в научных изданиях, входящих в базы цитирования Scopus/Wos и перечень ВАК, 3 патента Российской Федерации на изобретения и 1 патент на полезную модель Российской Федерации.

Личный вклад автора. Автор диссертации вместе с научным руководителем разработал главные направления научного исследования, сформулировал цель, изложил задачи проведенной работы. Автор непосредственно участвовал во всех этапах диссертационного исследования, самостоятельно написал рукопись диссертации и автореферат, принимал основное участие в подготовке научных публикаций. Отдельные разделы работы были проведены в сотрудничестве с д.х.н. Ямашкиным С.А. (синтез

хлорсодержащих производных замещенных аминокислот), д.б.н. Хацаевой Р.М. (сканирующая электронная микроскопия), к.б.н. Карамовой Н.С. (мутагенная активность и ДНК-повреждающий эффект).

Структура диссертации. Диссертация состоит из следующих частей: титульный лист, оглавление, введение, обзор литературы, экспериментальная часть, включающая в себя материалы и методы исследования, результаты исследования и обсуждения результатов, заключение, список использованных источников. Диссертация состоит из 153 страниц машинописного текста, содержит 36 рисунков и 14 таблиц. Работа включает 221 библиографических записей, среди которых 55 российских и 166 зарубежных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Получение микроорганизмов рабочей коллекции

Было получено более 150 микроорганизмов с различной чувствительностью к традиционно применяемым антимикробным препаратам: *S.pyogenes* (n=20), *S.pneumoniae* (n=19), *S.aureus* (n=52), *P.aeruginosa* (n=27), *E.coli* (n=38). Материалом для выделения возбудителя была слизь из носа, зева, носоглотки, отделяемое ран, моча, мокрота, секционный материал, фекалии. Верификацию лабораторных штаммов микроорганизмов проводили бактериологическими методами по классической методике (Приказ МЗ СССР №535 от 22.04.1985г.). Окончательную идентификацию и определение чувствительности микроорганизмов к традиционным антимикробным препаратам проводили с помощью автоматической бактериальной системы «Sensititre» (UK). Также в работе использовались референсные штаммы бактерий: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P и ATCC 43300 (MRSA), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

Неэкспериментальный прогноз биологической активности исследуемых соединений

Был рассчитан прогноз потенциальной биологической активности. Для прогноза наличия (*Pa*) или отсутствия (*Pi*) активности использовалась компьютерная система прогнозирования биологической активности веществ PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) на основе анализа так называемых обучающих выборок, содержащих десятки тысяч молекул органических веществ различных химических классов, проявляющих множество видов биологической активности (Филимонов Д. А. и др., 2006; Филимонов, Д. А., 2014).

Согласно исследованию *in silico* для новых соединений прогнозируется следующая антимикробная активность: ингибирование псевдолизина (Lalithambika B. et al., 2016); ингибирование омптина (Yang J. et al., 2015); противотуберкулезная активность; ингибирование Трг протеаз *Porphyromonas gingivalis* (Hritonenko V. et al., 2007); ингибирование легкой цепи ботулинического токсина типа А (Yowler B. C. et al., 2002) и другие.

Принимая во внимание вышеуказанное, прогнозировали возможность проявления антимикробной активности исследуемых соединений для верификации прогноза в экспериментальных условиях.

Исследование антимикробной активности исследуемых соединений

В продолжение систематических исследований (Степаненко И. С. и др., 2013; Степаненко И. С. и др., 2013; Степаненко И. С. и др., 2016; Степаненко И. С. и др., 2015; Ямашкин С. А. и др., 2017) проведён первичный скрининг 12-ти новых хлорзамещенных 5-, 6-, 7-аминоиндолов на наличие антибактериальной активности по отношению к грамположительным и грамотрицательным тест-штаммам и опытным штаммам

микроорганизмов, рабочей коллекции, и ее сравнение с ранее исследованными соединениями производными 4-, 5-, 6-, 7-бензаминоиндоллов (Таблицы 1, 2). Рабочий раствор соединений разводили в различных концентрациях 250,0; 125,0; 6,5; 31,3; 15,7; 7,9; 3,9; 1,96 и 0,98 мг/л в стерильном Мюллер-Хинтон бульоне (МХБ) в пробирках.

Таблица 1 – МПК исследуемых соединений в отношении тест-штаммов микроорганизмов (метод серийных разведения)

№ п/п	Шифр исследуемого соединения	Для <i>S.aureus</i> 6538-Р, мг/л	Для <i>S.aureus</i> 43300, мг/л	Для <i>E.coli</i> 25922, мг/л	Для <i>S.pyogenes</i> 1238, мг/л	Для <i>P.aeruginosa</i> 27853, мг/л
1	T1	0,98	0,98	31,3	0,98	7,9
2	T2	0,98	0,98	250,0	250,0	250,0
3	T4	0,98	0,98	1,96	62,5	0,98
4	T5	0,98	0,98	1,96	0,98	250,0
5	T6	0,98	0,98	3,9	1,96	250,0
6	T7	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
7	T8	0,98	0,98	0,98	125,0	0,98
8	T9	250,0	125,0	250,0	62,5	250,0
9	T10	250,0	250,0	250,0	250,0	0,98
10	T11	31,3	31,3	250,0	250,0	250,0
11	T12	62,5	62,5	0,98	0,98	3,9
12	T13	62,5	62,5	3,9	0,98	0,98
13	5D*	7,8	7,8	125,0	31,25	≤250,0
14	S3*	62,5	62,5	31,25	250,0	62,5
15	7D*	125,0	125,0	62,5	250,0	≤250,0
16	HD*	59,0	59,0	108,0	117,0	184,0
17	6D*	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0
18	17*	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0
19	3D*	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0
20	2D*	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0
21	64D*	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0
22	32D*	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0
23	43D*	125,0	125,0	≤ 250,0	62,5	≤ 250,0
24	243D*	125,0	125,0	≤ 250,0	125,0	≤ 250,0
25	235D*	125,0	125,0	250,0	62,5	250,0
26	66D*	125,0	125,0	≤ 250,0	125,0	≤ 250,0
27	39D*	31,25	31,25	250,0	31,25	≤ 250,0
28	1D*	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0	125,0	≤ 250,0
29	4D*	125,0	125,0	125,0	125,0	≤ 250,0
30	КПХ*	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0
31	ТФПХ*	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0	≤ 250,0

Примечание: * – по данным I. S. Stepanenko, S. A. Yamashkin, Y. A. Kostina, E. D. Slastnikov, A. A. Batarshcheva (Maseykina) // Bulletin of Russian State Medical University. – 2019. – № 2. – P. 57-64.

Таблица 2 – МПК исследуемых соединений в отношении опытных штаммов микроорганизмов (метод серийных разведения)

№ п/п	Шифр исследуемого соединения	Для <i>Staphylococcus spp.</i> , мг/л	Для <i>Streptococcus spp.</i> , мг/л	Для <i>E.coli</i> , мг/л	Для <i>P.aeruginosa</i> , мг/л
1	Диоксидин	7,9–1000,0	62,5–1000,0	3,9–62,5	3,9–1000,0
2	Нитрофурантоин	7,9–62,5	3,9–15,8	3,9–15,8	-
3	Фосфомоцилин	0,98–31,25	1,96–250,0	0,98–1,96	1,96–7,9
4	Бензалкония хлорид	0,98–3,9	-	0,98–3,9	15,9–62,5

Продолжение Таблицы 2

№ п/п	Шифр исследуемого соединения	Для <i>Staphylococcus spp.</i> , мг/л	Для <i>Streptococcus spp.</i> , мг/л	Для <i>E.coli</i> , мг/л	Для <i>P.aeruginosa</i> , мг/л
5	Хлоргексидина биглюконат	1,96-7,9	0,98-3,9	15,9-62,5	62,5-250,0
6	T1	0,98-1,96	0,98-3,9	15,8-125,0	3,9-15,8
7	T2	0,98-3,9	125,0-250,0	125,0-250,0	125,0-250,0
8	T4	0,98-1,96	31,25-125,0	0,98-3,9	0,98-1,96
9	T5	0,98-250,0	0,98-3,9	0,98-3,9	≤250,0
10	T6	0,98-125,0	0,98-3,9	1,96-7,9	≤250,0
11	T7	0,98-1,96	0,98-3,9	0,98-1,96	0,98-1,96
12	T8	0,98-3,9	62,5-250,0	0,98-7,9	0,98-125,0
13	T9	62,5-250,0	62,5-125,0	≤250,0	62,5-250,0
14	T10	125,0-250,0	≤250,0	≤250,0	3,9-15,8
15	T11	31,25-125,0	≤250,0	≤250,0	≤250,0
16	T12	15,8-125,0	0,98-3,9	0,98-3,9	0,98-3,9
17	T13	31,25-125,0	1,96-7,9	1,96-7,9	0,98-250,0
18	5D*	3,9-500,0	31,25-750,0	62,5-1000,0	≤250,0
19	S3*	31,25-1000,0	125,0-1000,0	31,25-500,0	62,5-1000,0
20	7D*	62,5-1000,0	250,0-1000,0	31,25-500,0	≤500,0
21	HD*	14,25-1000,0	28,5-1000,0	59,0-1000,0	184,0-1000,0
22	43 D*	250,0-1000,0	62,5-1000,0	≤ 500,0	≤ 500,0
23	243 D*	250,0-1000,0	125,0-750,0	≤ 500,0	≤ 500,0
24	235 D*	250,0-1000,0	62,5-1000,0	250,0-1000,0	≤ 500,0
25	66 D*	125,0-1000,0	125,0-1000,0	≤ 500,0	≤ 500,0
26	39 D*	31,25-1000,0	15,6-750,0	≤ 500,0	≤ 500,0
27	1 D*	≤ 500,0	62,5-1000,0	≤ 500,0	≤ 500,0
28	4 D*	125,0-1000,0	62,5-1000,0	125,0-1000,0	≤ 500,0

Примечание: * - по данным I. S. Stepanenko, S. A. Yamashkin, Y. A. Kostina, E. D. Slastnikov, A. A. Batarsheva (Maseykina) // Bulletin of Russian State Medical University. – 2019. – № 2. – P. 57-64.

Для определения МПК использовали метод серийных разведений. В каждой пробирке конечная концентрация микроорганизма содержала около 5×10^5 КОЕ/мл. Пробирки инкубировали при 37 °С в течение 20 ч и затем наблюдали на предмет роста или мутности.

Оценка антимикробного потенциала исследуемых соединений в ДДМ определялась в крестах по нижеуказанной схеме: (МУК 4.2.1890-04): «+++» высокая активность - диаметр зоны задержки роста более 25 мм; «++» активное - диаметр зоны задержки роста 16-25 мм; «+» малоактивное - диаметр зоны задержки роста 10-15 мм; «+/- 0» - неактивное - диаметр зоны задержки роста менее 10 мм и полное отсутствие. Содержание препаратов в диске соответствовало МПК×2 соединения.

Согласно полученным результатам выполненного анализа, антибактериальное действие рассмотренных соединений проявляется как в отношении грамотрицательных, так и грамположительных бактерий (Рисунок 1).

Для дальнейшего исследования были выбраны 4 соединения 2-хлор-N-(2,3-диметил-1H-индол-7-ил)ацетамид (лабораторный шифр **T1**), 2-хлор-N-(5-метокси-2,3- диметил-1H-индол-6-ил)ацетамид (лабораторный шифр **T4**), 2-хлор-N-(1,2,3-триметил-2,3-1H-индол-5-ил)ацетамид (лабораторный шифр **T7**), монохлорацетат 2,3-диметил-1H- индол-7-аммония (лабораторный шифр **T12**). Выбор осуществлялся исходя из биологической активности, оптимального соотношения антибактериального потенциала, способа получения и

растворимости в воде. Вышеуказанные соединения демонстрируют активность, превышающую таковую препаратов сравнения бензалкония хлорида, хлоргексидина биглюконат, диоксилина, нитрофурантоина и фосфомицина.

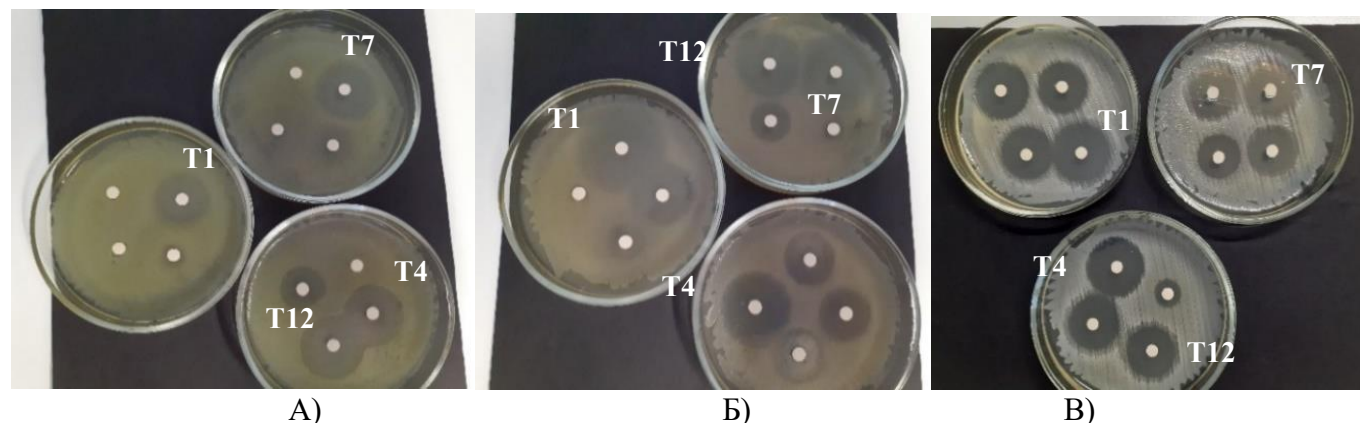


Рисунок 1, Антимикробная активность исследуемых соединений относительно опытных штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод). А) *P.aeruginosa*; Б) *E.coli*; В) *S.aureus*.

Также антимикробная активность исследуемых соединений была сопоставлена с таковой производных фторзамещенных 4-, 6-, 7-аминоиндолов (лабораторные шифры 5D, S3, 7D, HD), с доказанной ранее антимикробной активностью (Stepanenko I. S. at al., 2018). Минимальные подавляющие концентрации исследуемых соединений значительно ниже по сравнению с производными фторзамещенных 4-, 6-, 7-аминоиндолов, таким образом, исследуемые соединения превосходят фторзамещенные производные по антимикробной активности.

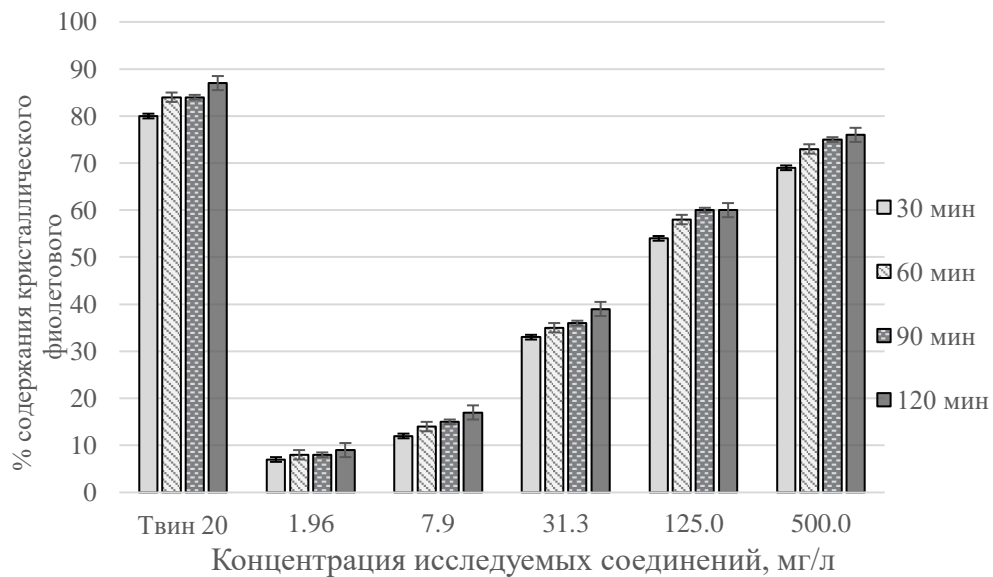
Исследование воздействия исследуемых соединений на клеточную стенку прокариот

Исследование, направленное на оценку повреждения клеточной стенки *S.aureus* 6538-P, индуцируемое тестируемыми соединениями показало, что все соединения вызывают нарушение взаимодействия красителя CV с клеточной стенкой, что выражается в снижении поглощения красителя клеткой (Рисунок 2, 3). Оптическая плотность пробы с красителем, в отсутствие клеток, принята за 100%. В качестве положительного контроля использовали 1% раствор поверхностно-активного Твина 20.

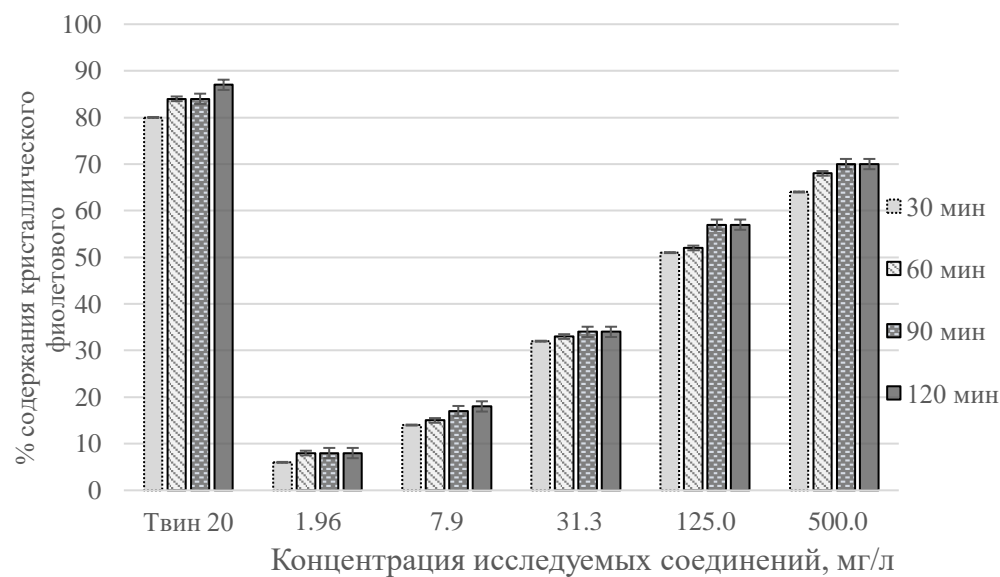
Статистически значимой разницы ($p \leq 0,05$) между соединениями T1, T4, T7, T12 в дозах 125,0 и 500,0 мг/л и 1% Твин 20 не наблюдалось, что означает, что хлорзамещенные 5-, 6-, 7-аминоиндолы дозозависимо влияют на проницаемость клеточной стенки исследуемых штаммов *S.aureus* ATCC 6538-P и *E.coli* 25922 ATCC.

Оценка морфоструктурных повреждений бактериальных клеток под воздействием исследуемых соединений

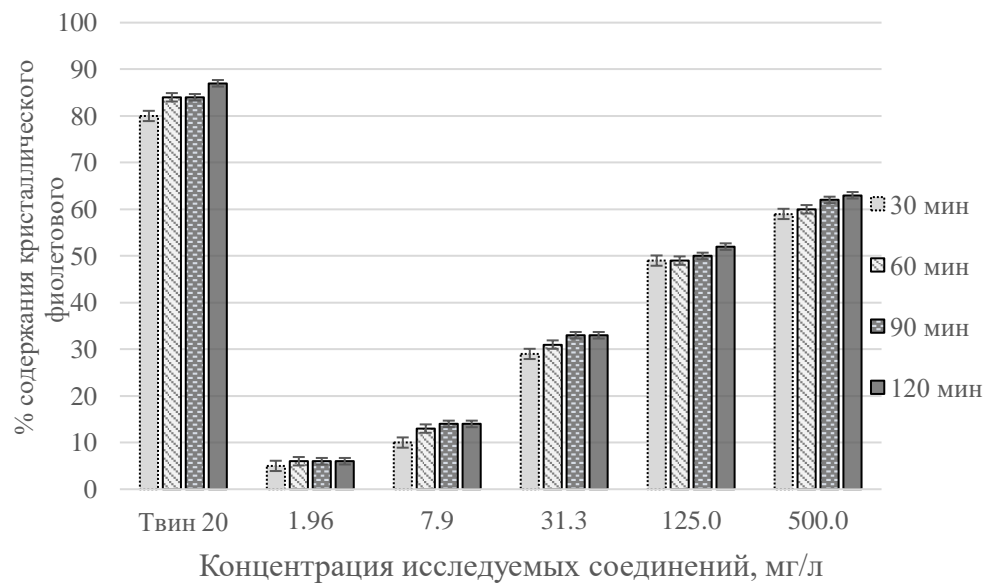
С помощью СЭМ был проведен анализ морфологических изменений микробных клеток под воздействием хлорсодержащих производных 5-, 6-, 7-аминоиндолов. Контрольные клетки были морфологически правильными и типичными (Рисунок 4-7, А-В) (Сазыкин Ю. О. и др., 1991). Статистический анализ морфометрии поверхности клеток в контрольных и опытных образцах не выявил существенных изменений размеров под воздействием соединений T1, T4, T7 и T12 (Таблица 3). При этом по сравнению с контрольными необработанными клетками *P.aeruginosa*, *S.aureus* и *E.coli* обработка хлорзамещенными производными 5-, 6-, 7-аминоиндолов вызывала явные морфологические изменения, что свидетельствует об ухудшении состояния клеточной стенки.



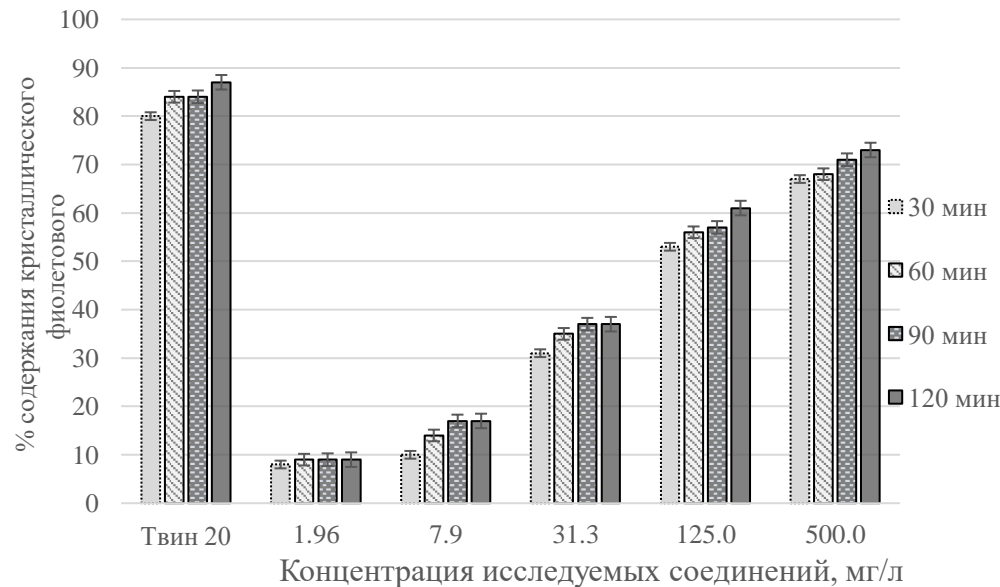
А



Б

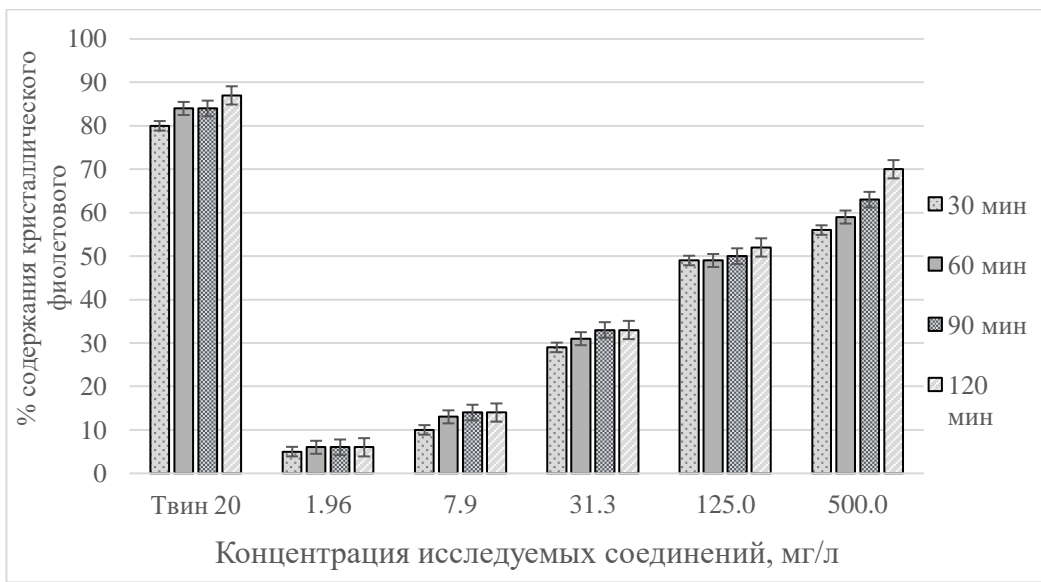


В

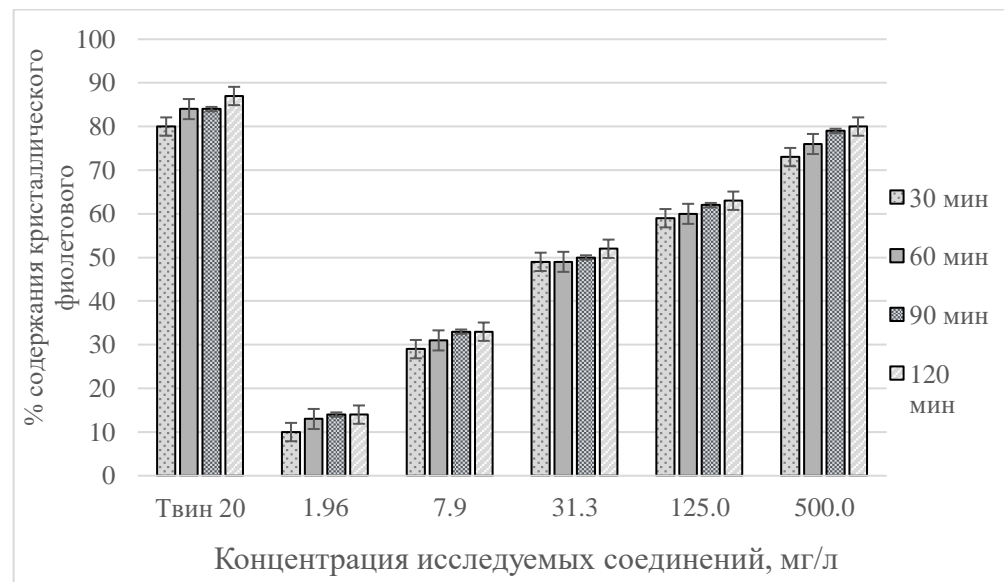


Г

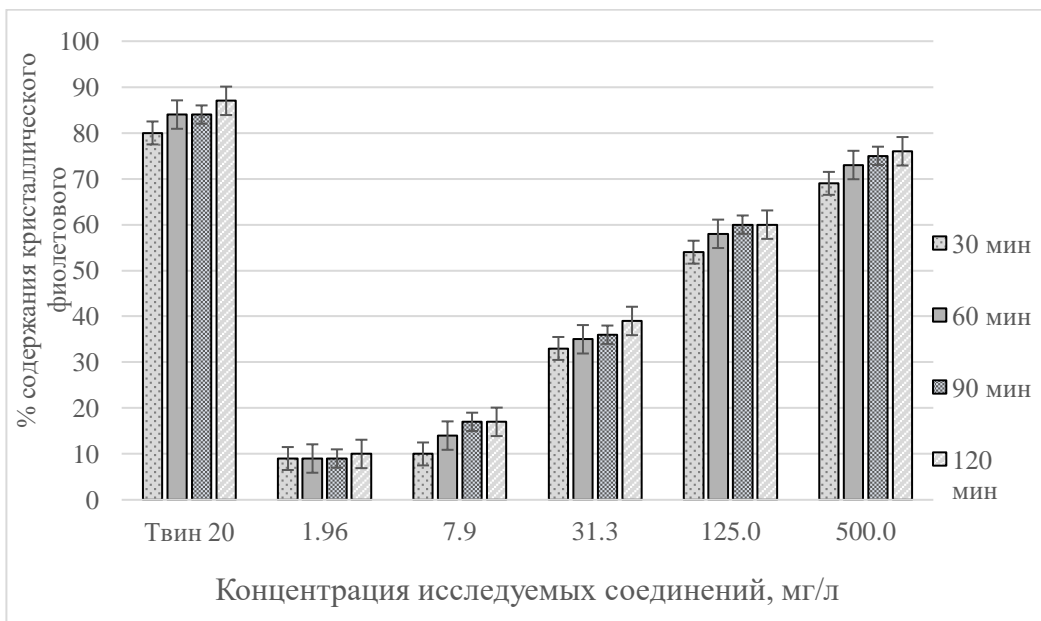
Рисунок 2 – Поглощение кристаллического фиолетового *S. aureus* ATCC 6538-R, в присутствии соединений с лабораторными шифрами Т1 (А), Т4 (В), Т7 (Б), Т12 (Г). Показаны средние значения \pm стандартное отклонение для трех повторов.



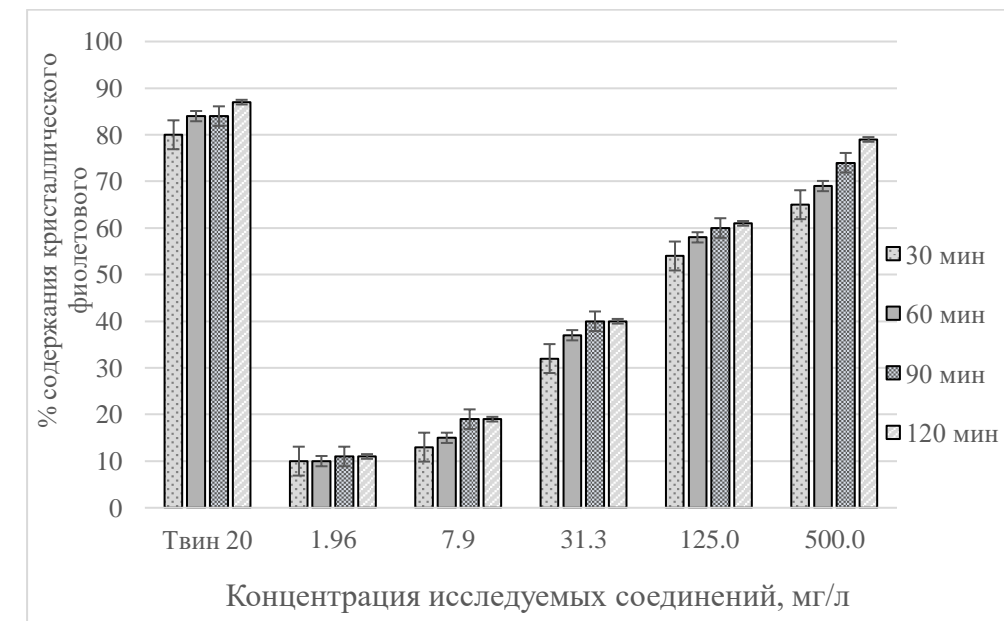
А



Б



В



Г

Рисунок 3 – Поглощение кристаллического фиолетового *E.coli* 25922 ATCC, в присутствии соединений с лабораторными шифрами Т1 (А), Т4 (В), Т7 (Б), Т12 (Г). Показаны средние значения \pm стандартное отклонение для трёх повторов.

Таблица 3 – Размеры поверхности бактериальных клеток при воздействии соединения Т1 (500,0 мг/л)

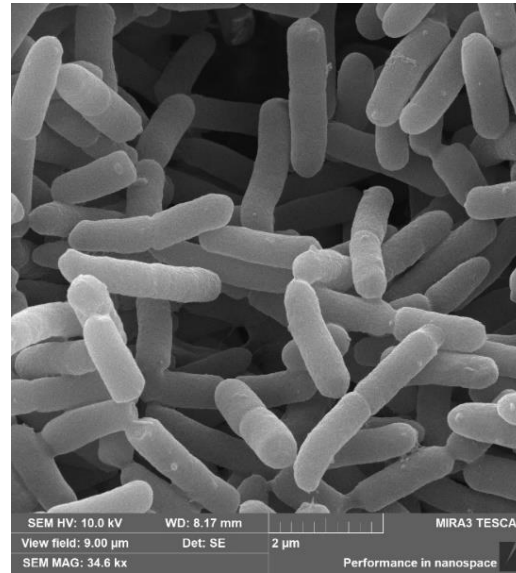
Шифр исследуемого соединения	Т1		Т4		Т7		Т12	
	Длина (мкм)	Ширина (мкм)	Длина (мкм)	Ширина (мкм)	Длина (мкм)	Ширина (мкм)	Длина (мкм)	Ширина (мкм)
<i>P.aeruginosa</i>	1,80 ±0,39	0,66 ±0,02	2,45 ±0,65	0,62 ±0,03	2,11 ±0,53	0,64 ±0,02	2,01 ±0,79	0,66 ±0,04
<i>P.aeruginosa</i> (контроль)	2,10 ±0,44	0,66 ±0,03	2,10 ±0,44	0,66 ±0,03	2,10 ±0,44	0,66 ±0,03	2,10 ±0,44	0,66 ±0,03
<i>S.aureus</i>	0,69 ±0,02	0,69 ±0,02	0,59 ±0,10	0,59 ±0,10	0,56 ±0,06	0,56 ±0,06	0,63 ±0,07	0,63 ±0,07
<i>S.aureus</i> (контроль)	0,66 ±0,04	0,66 ±0,05	0,66 ±0,04	0,66 ±0,05	0,66 ±0,04	0,66 ±0,05	0,66 ±0,04	0,66 ±0,05
<i>E.coli</i>	1,23 ±0,18	0,41 ±0,06	1,31 ±0,40	0,40 ±0,06	1,14 ±0,19	0,41 ±0,05	1,39 ±0,44	0,40 ±0,01
<i>E.coli</i> (контроль)	1,45 ±0,28	0,40 ±0,02	1,45 ±0,28	0,40 ±0,02	1,45 ±0,28	0,40 ±0,02	1,45 ±0,28	0,40 ±0,02

У *P.aeruginosa* под воздействием Т7 и Т12 наблюдались филаментные клетки (Рисунок 6Д, 7Д). Появление длинных нитей может быть связано со стрессом, который испытывает клетка после воздействия исследуемых соединений. Считается, что образование таких филаментов у бактерий в условиях стресса является результатом дефектов клеточного деления, особенно при отделении дочерних клеток (Yamaki S. et al., 2021; Jones T. H. et al., 2013). Есть данные, согласно которым при подавлении синтеза ДНК бактерии изменяется ее морфология, она становится длиннее, не достигая клеточного деления (Subbalakshmi C. et al., 1998; Rosenberger C. M. et al., 2004). Обработка Т1, Т7 и Т12 приводила к деградации клеточной стенки *P.aeruginosa* (Рисунок 4Д, 6Д, 7Д), в то время как обработка Т4 вызывала образование пор на поверхности клетки (Рисунок 5Д). В этом исследовании СЭМ показала заметные морфологические изменения клеточных стенок *S.aureus*, что привело к деформации клеточной стенки под действием Т1, Т4, Т7 и Т12 (Рисунок 4-7, Е). Эти морфологические изменения могут быть связаны с абберациями липидного состава мембраны, измененной текучестью мембраны и/или целостностью мембраны, что приводит к лизису клеточной стенки и потере внутриклеточного плотного материала (Vajpai V. K. et al., 2017; Cui H. et al., 2015; Андреевская С. Г. и др., 2020; Greenwood D. et al., 1972). Обработка клеток *E.coli* Т1, Т4, Т7 и Т12 при концентрации 500 мг/л вызывала лизис клеток, хотя нормальные клетки также были обнаружены (Рисунок 4-7, Г). Появление клеточных обломков вокруг целых клеток *E.coli* указывает на повреждение мембраны, которое, вероятно, приводит к изменению осмотического давления (Рисунок 7Г) (Barreto-Santamaría A. Curtidor et al., 2016; Armas F. et al., 2019).

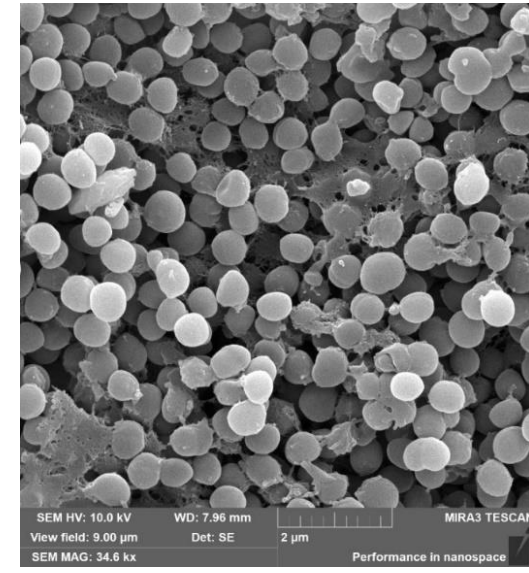
Результаты с использованием СЭМ подтвердили данные об антимикробной активности хлорзамещенных производных 5-,6-,7-аминоиндол в отношении клеток *E.coli*, *S.aureus* и *P.aeruginosa*.



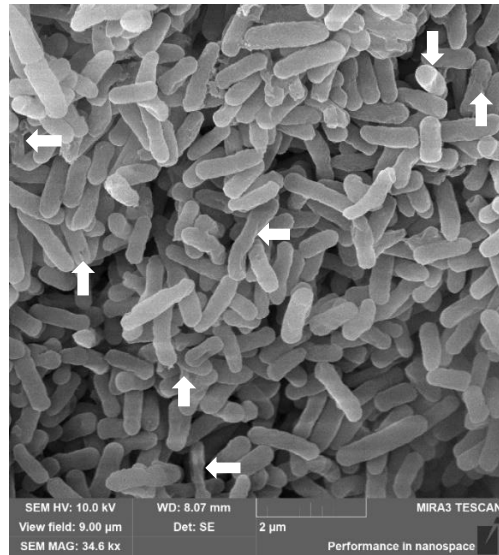
А



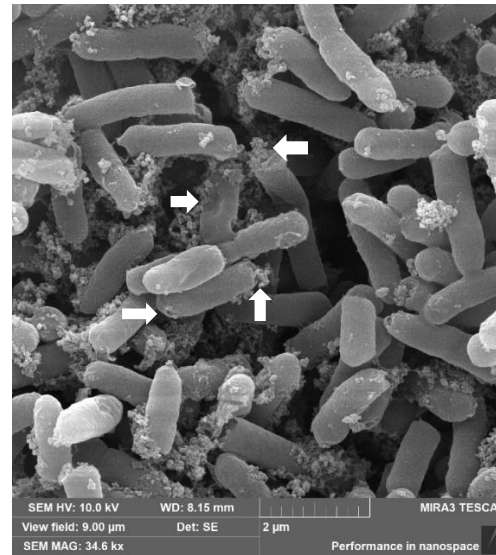
Б



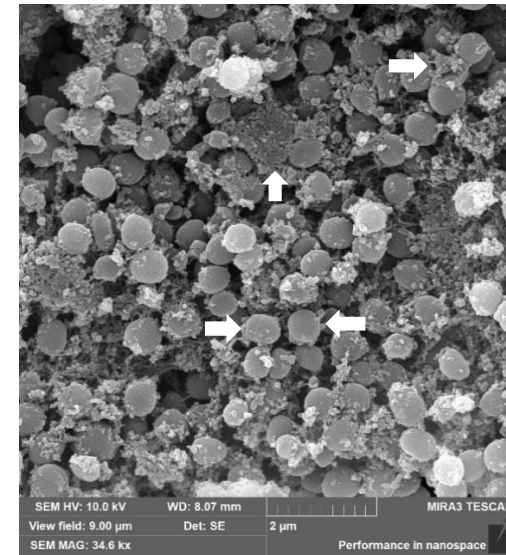
В



Г



Д

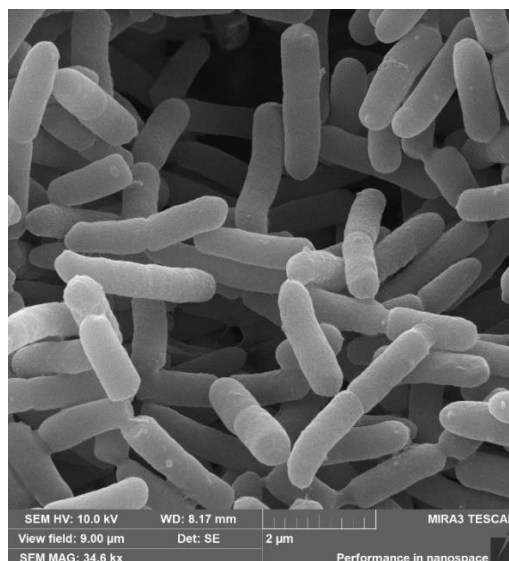


Е

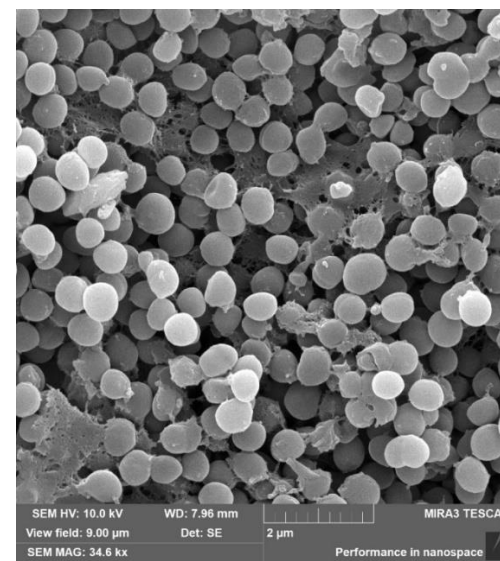
Рисунок 4 – Морфоструктурные изменения *E.coli*, *P.aeruginosa* и *S.aureus* под воздействием 2-хлор-N-(2,3-диметил-1H-индол-7-ил)ацетамида (Т-1). А – intactные клетки *E.coli* без обработки исследуемого соединения, Б – intactные клетки *P.aeruginosa* без обработки исследуемого соединения, В – intactные клетки *S.aureus* без обработки исследуемого соединения.



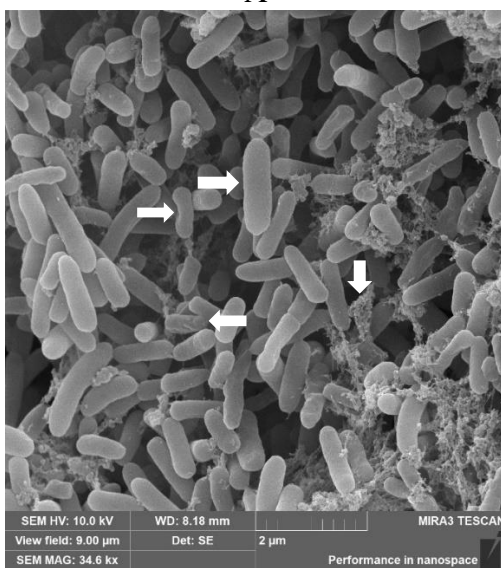
А



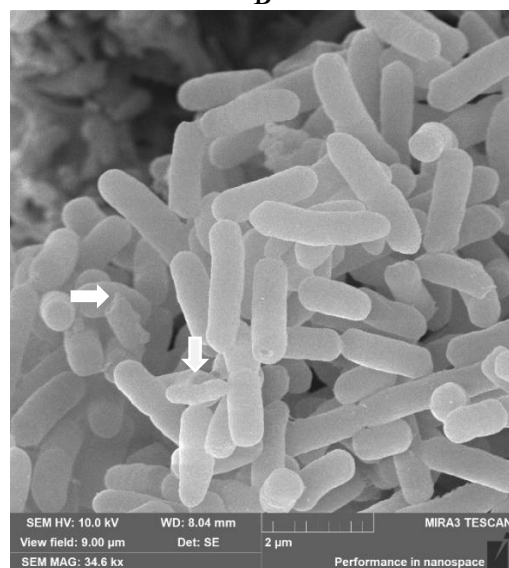
Б



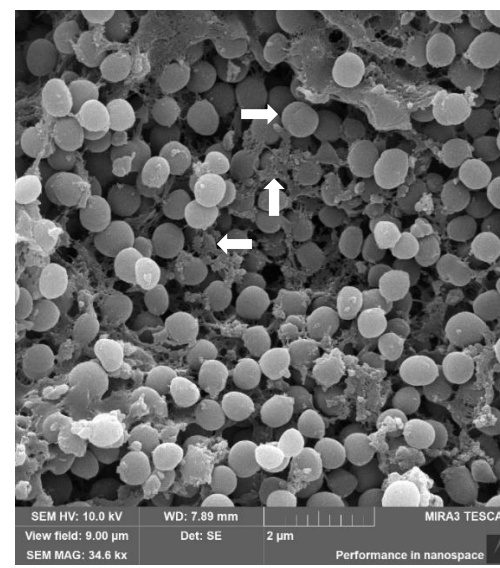
В



Г



Д

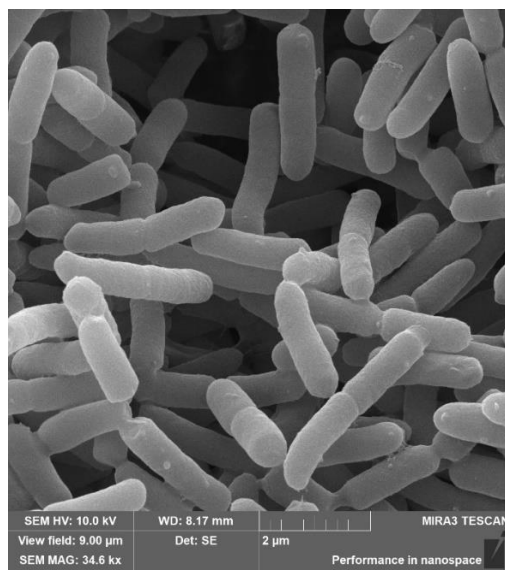


Е

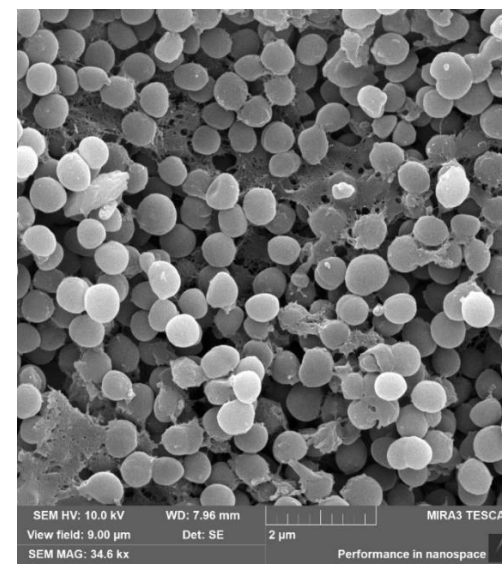
Рисунок 5 – Морфоструктурные изменения *E.coli*, *P.aeruginosa* и *S.aureus* под воздействием 2-хлор-N-(5-метокси-2,3-диметил-1H-индол-6-ил)ацетамида (Г-4). А – intactные клетки *E.coli* без обработки исследуемого соединения, Б – intactные клетки *P.aeruginosa* без обработки исследуемого соединения, В – intactные клетки *S.aureus* без обработки исследуемого соединения.



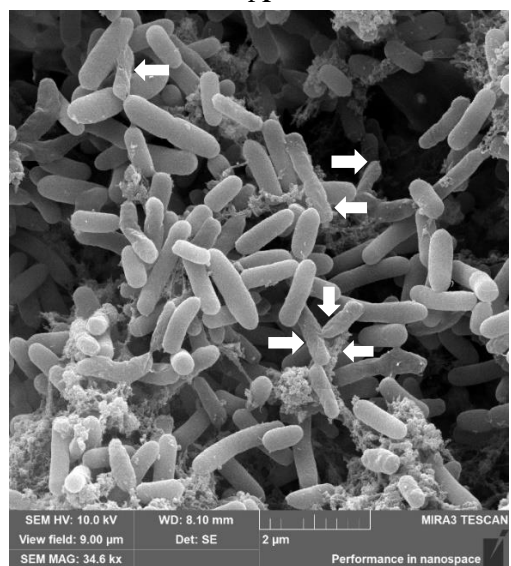
А



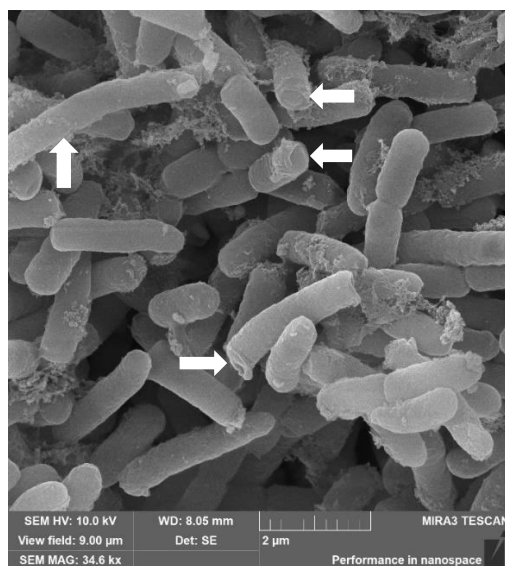
Б



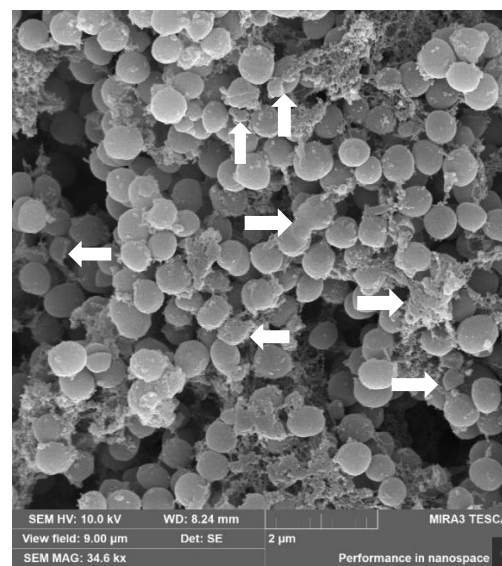
В



Г



Д



Е

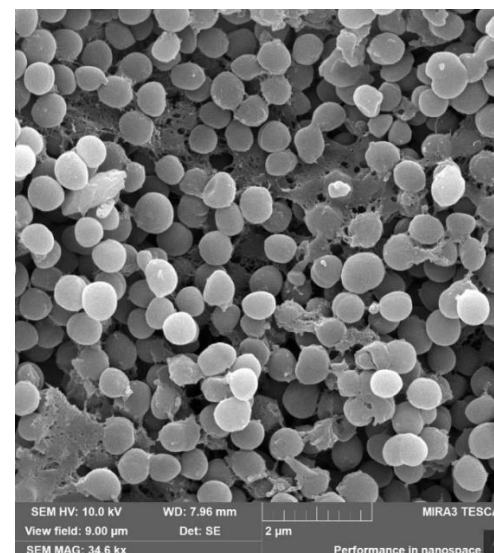
Рисунок 6 – Морфоструктурные изменения *E.coli*, *P.aeruginosa* и *S.aureus* под воздействием 2-хлор-N-(1,2,3-триметил-1H-индол-5-ил)ацетамида (Т-7). А – интактные клетки *E.coli* без обработки исследуемого соединения, Б – интактные клетки *P.aeruginosa* без обработки исследуемого соединения, В – интактные клетки *S.aureus* без обработки исследуемого соединения.



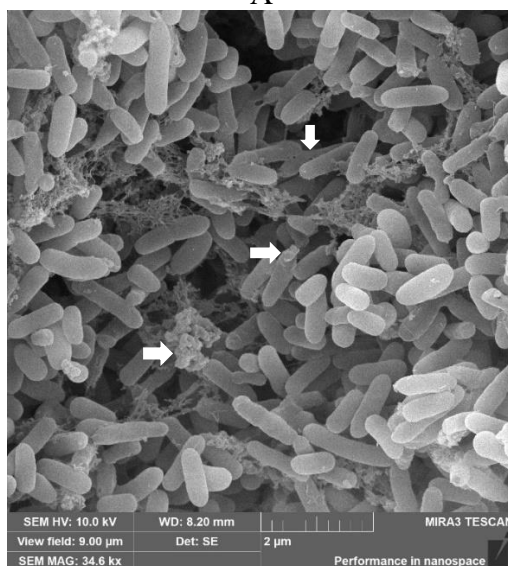
А



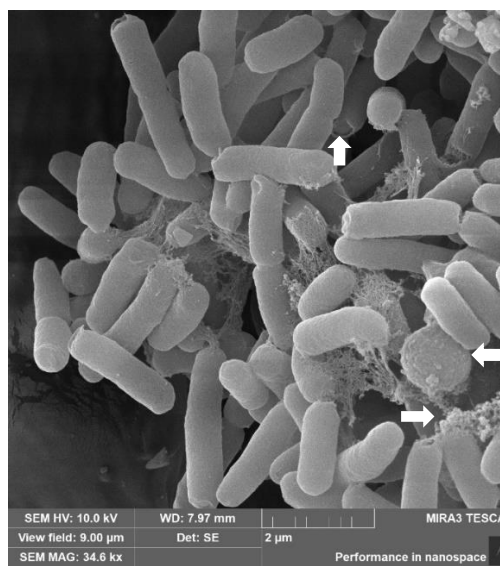
Б



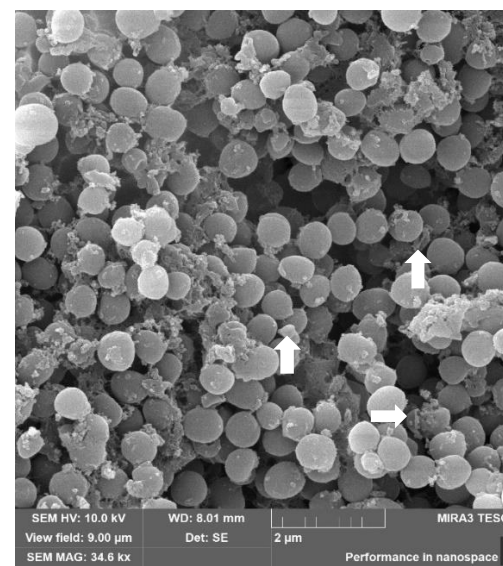
В



Г



Д



Е

Рисунок 7 – Морфоструктурные изменения *E.coli*, *P.aeruginosa* и *S.aureus* под воздействием монохлорацетат-2,3-диметил-1Н-индол-7-аммония (Т-12). А – intactные клетки *E.coli* без обработки исследуемого соединения, Б – intactные клетки *P.aeruginosa* без обработки исследуемого соединения, В – intactные клетки *S.aureus* без обработки исследуемого соединения.

Оценка типа антимикробного действия исследуемых соединений

Для определения типа антимикробного действия использовали методику проведения опытов при воздействии исследуемых соединений в физиологическом растворе при комнатной температуре и коротких экспозициях. Исследуемые соединения и препарат сравнения ампициллин в течение 110 ч культивирования вызывали задержку роста и размножения тест-штамма *S.aureus* ATCC 6538-Р (Рисунок 8,9). Препарат сравнения азитромицин задерживал рост и размножение тест-штамма *S.aureus* в течение 3-суток. После 4-х суточного культивирования в присутствии МПК азитромицина наблюдалось появление видимого роста микробной популяции в проходящем свете. Задержка роста и размножения микроорганизмов свидетельствует о способности хлорсодержащих соединений, полученных на основе 5-, 6- и 7-замещенных аминокислотных индол-3-пропионовых кислот оказывать в МПК бактерицидное действие. Помимо описанной выше методики использовали способ определения антимикробного действия (бактериостатическое или бактерицидное), созданный в ходе работы над диссертацией.

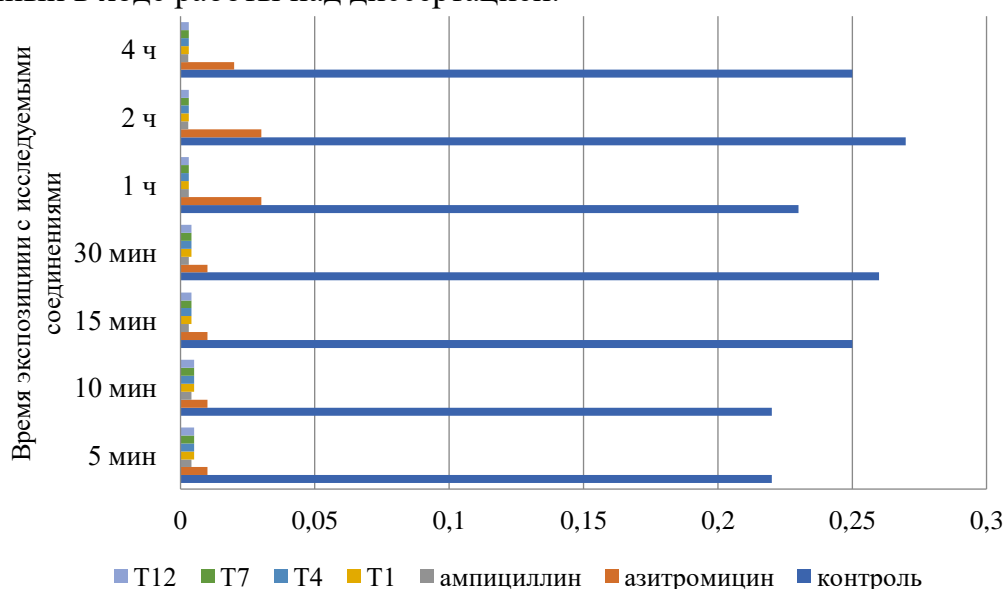


Рисунок 8 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus* ATCC 6538-Р после экспозиций с исследуемыми соединениями и культивировании в течение 24 ч.

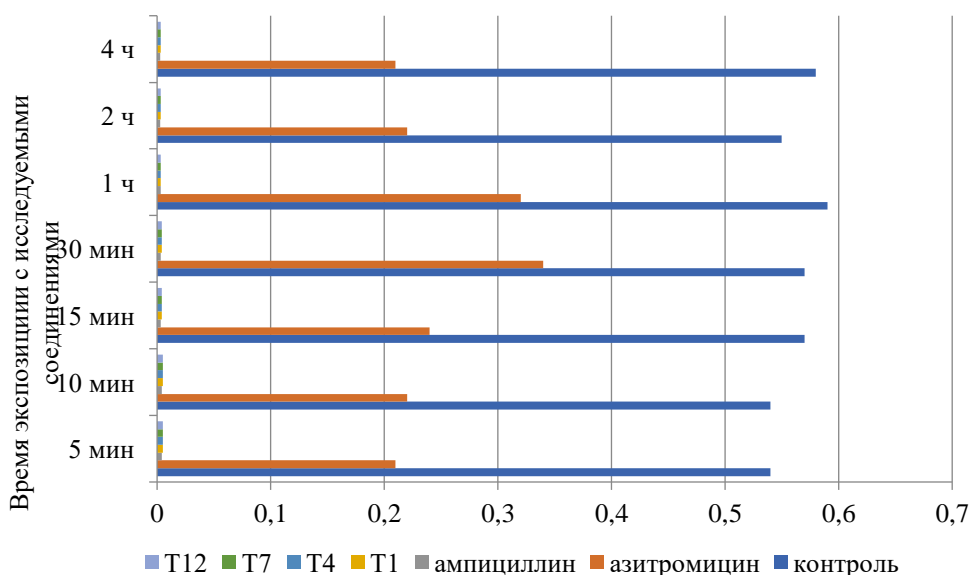


Рисунок 9 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus* ATCC 6538-Р после экспозиций с исследуемыми соединениями и культивировании в течение 110 ч.

Показатель K_D с исследуемым соединением более 1 свидетельствует, что исследуемое

соединение обладает бактериостатическим типом действия в отношении исследуемого микроорганизма, если менее 1 – исследуемое соединение обладает бактерицидным типом действия в отношении исследуемого микроорганизма (Stepanenko I. S. et al., 2018). Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Тип антимикробного действия исследуемых соединений

Исследуемое соединение, лабораторный шифр	Коэффициент оптической плотности культуральной среды в ходе культивирования микроорганизмов с антимикробными соединениями в жидкой питательной среде (K _D)		
	<i>S.aureus</i> 6538-Р ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC
Ампициллин	0,293	-	0,321
Цефазолин	0,600	-	0,566
Азитромицин	1,230	-	1,872
Линцомицин	2,600	-	-
T1	0,712	0,727	0,492
T4	0,763	0,821	0,714
T7	0,211	0,216	0,194
T12	0,204	0,171	0,193
5D	2,275	-	2,71
S3	1,325	1,124	1,452
7D	2,65	-	2,125
HD	1,625	2,368	2,214

Показатель K_D исследуемых соединений оказался менее 1, следовательно, исследуемые соединения, синтезированные на основе замещенных 5-, 6-, 7-аминоиндолов, обладают бактерицидным типом антимикробного действия в отношении исследуемых микроорганизмов.

Исследование мутагенных и ДНК-повреждающих свойств тестируемых соединений *in vitro*

Результаты, полученные при оценке токсичности четырёх соединений в концентрациях 100,0; 500,0 и 1000,0 мг/чашку, свидетельствуют о том, что в данном диапазоне концентраций соединения не вызывают статистически значимого ($p \leq 0,05$) угнетения роста тестерного штамма *Salmonella typhimurium* TA100 (Таблица 5). Полученные данные позволяют использовать указанный диапазон концентраций исследуемых соединений при оценке их мутагенных свойств в тесте Эймса, т.к. жизнеспособность популяции клеток тестерных бактерий не угнеталась более чем на 50%.

Таблица 5 – Влияние соединений T1, T4, T7 и T12 на выживаемость клеток *S.typhimurium* TA100

Исследуемое соединение, лабораторный шифр	Выживаемость, %*		
	100,0 мг/чашку	500,0 мг/чашку	1000,0 мг/чашку
T1	89,88±3,51	84,82±1,78	74,70±5,34
T4	87,16±2,94	85,60±2,93	83,27±4,72
T7	84,43±1,78	79,76±1,78	57,58±2,93
T12	85,99±1,78	65,76±4,86	53,31±2,94

* -за 100% принята выживаемость *S.typhimurium* TA100 в контроле.

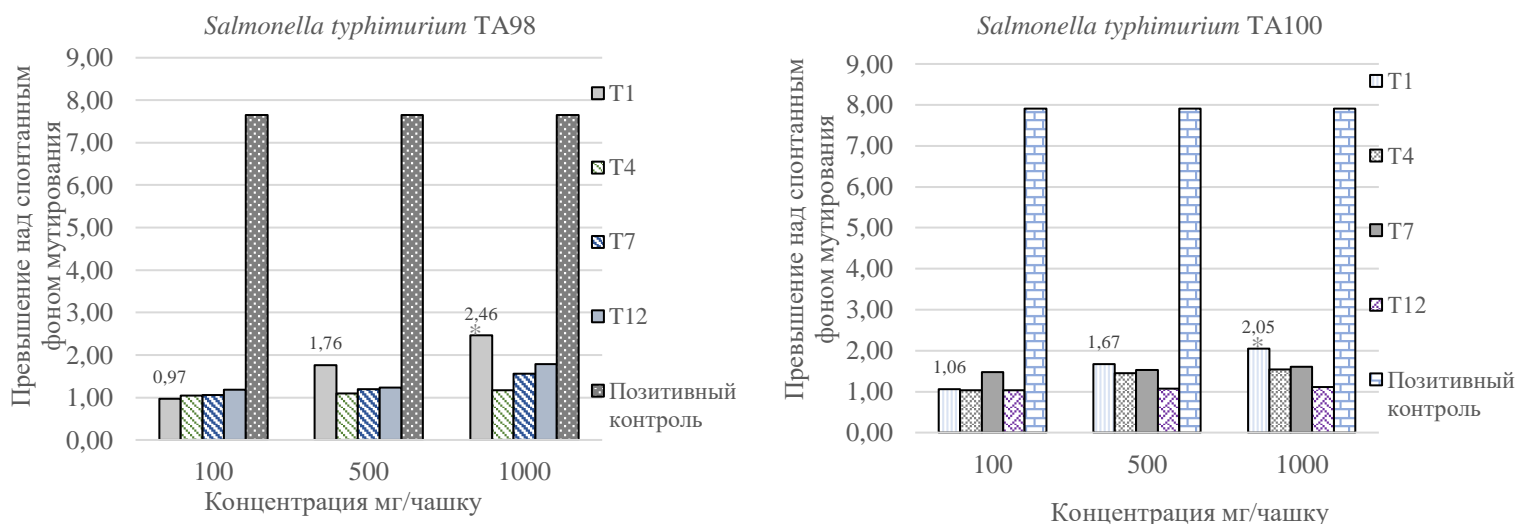


Рисунок 10 – Мутагенный потенциал соединений Т1, Т4, Т7 и Т12 в тесте Эймса на штаммах *S.typhimurium* TA98 и TA100. Примечание: * - значимое превышение числа индуцированных генных мутаций над спонтанным фоном мутирования.

Результаты оценки мутагенного потенциала исследуемых соединений в тесте Эймса представлены на рисунке 10. Соединения Т4 и Т7, Т12 не вызвали значимого превышения числа колоний индуцированных His⁺-ревертантов тестерных штаммов TA98 и TA100 над спонтанным фоном мутирования (негативный контроль) более, чем в 2 раза, что свидетельствует об отсутствии мутагенной активности данных соединений в исследованном диапазоне концентраций. Соединение Т1 демонстрировало дозозависимую мутагенную активность как на штамме TA98, так и на штамме TA100, в концентрации 1000,0 мг/чашка, вызывая превышение числа индуцированных генных мутаций над спонтанным фоном мутирования в 2,46 и в 2,05 раз, соответственно.

Исследование соединений в Rec-тесте позволило установить, что вещества Т4 и Т7 не проявляют статистически значимый ДНК-повреждающий эффект (Рисунок 11).

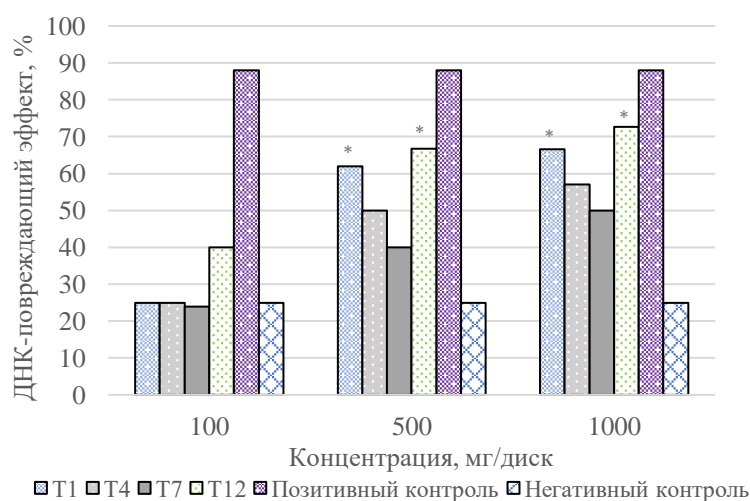


Рисунок 11 – ДНК-повреждающий эффект соединений Т1, Т4, Т7 и Т12 в Rec-тесте. Примечание: * - отличие от контроля (негативный контроль) статистически значимо при $p \leq 0,05$.

Соединение Т1 в концентрациях 500,0 мг/диск и 1000,0 мг/диск вызывало повреждения ДНК ($p \leq 0,05$), в особенности у мутантного штамма *recA* (ДНК-повреждающая активность равнялась 62,0% и 66,6%, соответственно). Для соединения Т12 в исследованном диапазоне концентраций показан дозозависимый ДНК-повреждающий эффект ($p \leq 0,05$).

Таким образом, два из четырех исследованных соединений – **T4** и **T7** не обладают ДНК-повреждающим эффектом. Выявлена мутагенность и ДНК повреждающий эффект соединения **T1**. Соединение **T12** демонстрирует ДНК-повреждающий эффект, но не индуцирует генные мутации типа как замены пар оснований, так и сдвига рамки считывания у тестерных штаммов *S.typhimurium* TA100 и TA98, соответственно. Вероятно, это соединение вызывает повреждения ДНК, которые восстанавливаются работой систем репарации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе проведено исследование нового класса синтетических соединений, производных замещенных аминокислот, демонстрирующих антимикробный эффект в отношении прокариотических микроорганизмов, а также обоснование безопасного использования полученного антимикробного потенциала хлорсодержащих производных замещенных аминокислот. Согласно исследованию *in silico* для новых производных прогнозируется следующая антимикробная активность. Наиболее часто встречающаяся противомикробная активность тестируемых соединений связана с ингибированием псевдолизина и системы омпинов, также противотуберкулезная активность, ингибирование Trp протеаз *Porphyromonas gingivalis* и легкой цепи ботулинического токсина типа А. Показано, что новая группа соединений из двенадцати монохлорацетатов замещенных 5-,6-,7-аминокислот обладает антимикробным действием в отношении исследованных тест-штаммов *S.aureus* ATCC 6538-P, *S.aureus* 43300 ATCC (*MRSA*), *E.coli* 25922 ATCC, *P.aeruginosa* 27853 ATCC, *S.pyogenes* 19615 ATCC и опытных штаммов (n=156) *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *E.coli*, *P.aeruginosa* из рабочей коллекции с различными МПК. Исследуемые соединения одинаково активны в отношении метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного тест-штамма *S.aureus*. Активность новой группы исследуемых соединений была сопоставлена с таковой производных фторзамещенных 4-, 6-, 7-аминокислот (лабораторные шифры 5D, S3, 7D, HD), с доказанной ранее антимикробной активностью (Stepanenko I. S. at al., 2018). МИК исследуемых соединений значительно ниже по сравнению с производными фторзамещенных 4-, 6-, 7-аминокислот, таким образом, исследуемые соединения превосходят фторзамещенные производные по антимикробной активности. Для дальнейшего более детального исследования были выбраны четыре соединения 2-хлор-N-(2,3-диметил-1H-индол-7-ил)ацетамид (**T1**), 2-хлор-N-(5-метокси-2,3-диметил-1H-индол-6-ил)ацетамид (**T4**), 2-хлор-N-(1,2,3-триметил-2,3-1H-индол-5-ил)ацетамид (**T7**), монохлорацетат 2,3-диметил-1H-индол-7-аммония (**T12**). Проанализировано воздействие отобранных соединений на способность клеточной стенки бактерий поглощать кристаллический фиолетовый и показано дозозависимое изменение проницаемости клеточной стенки *S.aureus* ATCC 6538-P и *E.coli* ATCC 25922 в присутствии соединений **T1**, **T4**, **T7** и **T12**. Выявлены морфологические изменения клеток *E.coli*, *S.aureus* и *P.aeruginosa*, такие как увеличение шероховатостей клеточной стенки, разрушение, набухание и образование лизированных клеток под воздействием соединений **T1**, **T4**, **T7** и **T12**. Установлен бактерицидный тип антимикробного действия испытуемых соединений с использованием классической методики определения и на основе вычисления коэффициента оптической плотности культуральной среды в ходе культивирования микроорганизмов с антимикробными соединениями в жидкой питательной среде, с применением способа определения типа антимикробного действия, разработанного в ходе экспериментального исследования. В результате исследования безопасности тестируемых

соединений *in vitro*, установлено отсутствие мутагенных свойств соединений **T4**, **T7**, **T12** и наличие ДНК-повреждающего эффекта соединения **T1**.

Установлено, что механизм действия исследуемых соединений **T1**, **T4**, **T7**, **T12** включает воздействие на проницаемость клеточной стенки как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов, и, соединений **T1** и **T12** – на ДНК микробной клетки. В бактерицидных концентрациях соединения производные замещенных 5-, 6-, 7-аминоиндолов способны изменять проницаемость клеточной стенки микроорганизмов и оказывать ДНК-повреждающее действие, в бактериостатических концентрациях, вышеуказанные соединения, возможно, имеют дополнительные механизмы действия на микробную клетку.

ВЫВОДЫ

1. Штаммы рабочей коллекции микроорганизмов *S.pyogenes* (n=20), *S.pneumoniae* (n=19), *S.aureus* (n=52), *P.aeruginosa* (n=27) и *E.coli* (n=38) чувствительны к традиционным антимикробным препаратам (группы: аминогликозиды, макролиды, тетрациклины, пенициллины, цефалоспорины и др.) и новым соединениям на основе замещенных 5, 6, 7-аминоиндолов с МПК = 0,98-1000,0 мг/л.

2. Внеэкспериментальный прогноз наличия антимикробной активности в фармакологическом спектре исследуемых соединений, проведенный с помощью компьютерной системы прогнозирования биологической активности веществ – PASS, составил более 50 % (*Pa* более 0,500 вне зависимости от вероятности и прогнозной степени токсичности).

3. Полученные новые соединения на основе замещенных 5, 6, 7-аминоиндолов способны оказывать ингибирующее воздействие на рост и размножение микроорганизмов с МПК = 0,98-250,0 мг/л. Наибольшей активностью обладали соединения 2-хлор-*N*-(1,2,3-триметил-2,3-1*H*-индол-5-ил)ацетамид (**T7**), 2-хлор-*N*-(5-метокси-2,3-диметил-1*H*-индол-6-ил)ацетамид (**T4**), 2-хлор-*N*-(2,3-диметил-1*H*-индол-7-ил)ацетамид (**T1**), монохлорацетат 2,3-диметил-1*H*-индол-7-аммония (**T12**), которые проявляли антимикробную активность в отношении *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *E.coli* и *P.aeruginosa* более выражено, чем препараты сравнения бензалкония хлорид, диоксидин, хлоргексидин, нитрофурантоин и фосфомицин.

4. Показано, что коэффициент оптической плотности (K_D) культуральной среды в ходе совместного инкубирования микроорганизмов с разработанными антимикробными соединениями в жидкой питательной среде менее 1, что подтверждает способность изучаемых соединений вызывать гибель микроорганизмов и оказывать бактерицидный тип действия.

5. Соединения **T1**, **T4**, **T7** и **T12** вызывают увеличение шероховатостей клеточной стенки, разрушение, набухание и лизис клеток, что указывает на мембраноповреждающую активность исследуемых соединений. Размеры бактериальных клеток после воздействия на них данных соединений не отличались от исходных, и в среднем составляли 2,09×0,65 мкм для *P. aeruginosa*, 1,27×0,41 мкм для *E. coli* и 0,62×0,62 мкм для *S.aureus*.

6. Соединения **T4** и **T7** в диапазоне концентраций 100,0-1000,0 мг/л не обладают ДНК-повреждающим эффектом и не оказывают мутагенного действия. Соединение **T1**, проявляет дозозависимую мутагенность, не оказывает ДНК-повреждающее действие. Соединение **T12** демонстрирует дозозависимый ДНК-повреждающий эффект, но не индуцирует генные мутации типа как замены пар оснований, так и сдвига рамки считывания у тестерных штаммов *S.typhimurium* TA100 и TA98, соответственно.

РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Рабочая коллекция микроорганизмов *S.pyogenes*, *S.pneumonia*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, созданная для решения конкретных текущих задач по выполнению научно-исследовательских работ, может быть использована в области разработки и производства средств диагностики, специфической профилактики и лечения инфекционных болезней, диагностической деятельности в целях ускоренной идентификации вновь выделяемых возбудителей, решения задач эпидемиологии с определением происхождения и территориальной приуроченности вновь выявляемых штаммов.

2. Принимая во внимание вышеуказанные свойства новых абиотических факторов – соединений, на основе замещенных 5, 6, 7-аминоиндолов, дальнейшее исследование является перспективным в целях применения последних в качестве дезинфицирующих или химиотерапевтических средств.

3. Разработанный способ определения типа антимикробного действия можно использовать для установления характера действия на микроорганизмы новых групп соединений, вычисляя коэффициент оптической плотности культуральной среды в ходе культивирования микроорганизмов с антимикробными соединениями в жидкой питательной среде.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных изданиях, входящих в базы цитирования Scopus/Wos и перечень ВАК

1. Stepanenko, I.S. A new group of compounds derived from 4-, 5-, 6- and 7-aminoindoles with antimicrobial activity / I.S. Stepanenko, S.A. Yamashkin, Y.A. Kostina, **A.A. Batarsheva**, M.A. Mironov // Research Results in Pharmacology. – 2018. – Vol. 4. – Issue 3. – P.17-26. ВАК, Scopus SJR = 0,19, Цит. 13.

2. Степаненко, И.С. Изучение типа противомикробного действия новых соединений, синтезированных на основе замещенных бензаминоиндолов / И.С. Степаненко, С.А. Ямашкин, Ю.А. Костина, Е.Д. Слестников, **А.А. Батаршева** // Вестн. Рос. гос. мед. универ. (Вестник РГМУ). – 2019. – №2. – С.64-71. ВАК, WoS, Scopus, SJR = 0,16, Цит. 2.

3. **Масейкина, А.А.** Влияние на генетический аппарат микробной клетки соединений на основе замещенных 1n-индол-4-,5-,6-,7-иламинов / **А.А. Масейкина**, И.С. Степаненко, С.А. Ямашкин, Е.Д. Слестников // Инф. и иммун. – 2021. – Т.11. – №4. – С. 663-670. ВАК, WoS, Scopus, SJR = 0,2, Цит. 1.

4. **Масейкина, А.А.** Изучение морфоструктурных повреждений бактериальных клеток под воздействием хлорсодержащих производных 5-,6-,7-аминоиндолов с помощью сканирующего электронного микроскопа / **А.А. Масейкина**, И.С. Степаненко, Т.Н. Платкова, А.И. Кирютина, В.С. Малышева // Инф. и иммун. – 2023. – Т. 13. – №2. – С. 243-256. ВАК, WoS, Scopus, SJR = 0,2, Цит. 0.

Патенты

1. Пат. РФ 2687264, МПК G01N 33/15, C12Q 1/02. Способ определения типа противомикробного действия соединения, обладающего антимикробной активностью / И. С. Степаненко, С. А. Ямашкин, Ю. А. Костина, Е.Д. Слестников, Н.В. Жукова, **А.А. Батаршева**; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва». – № 2018128308; заявл. 02.08.2018; опубл. 13.05.2019; Бюлл. № 14 – 14 с.

2. Пат. РФ 2721833, МПК C07D 209/40. Способ получения трифторацетатов замещенных 6-аминоиндолов, обладающих противомикробным действием / И.С. Степаненко, С.А. Ямашкин, **А.А. Батаршева**, Е.Д. Слестников; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва». – № 2019125299; заявл. 09.08.2019; опубл. 22.05.2020; Бюлл. № 15 – 9 с.

3. Пат. РФ 2724605, МПК C07D 209/40. Способ получения монохлорацетатов замещенных 5-,6-,7-аминоиндолов, обладающих противомикробным действием / И.С. Степаненко, С.А. Ямашкин, **А.А. Батаршева**, Е.Д. Сладников; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва». – № 2019125333; заявл. 09.08.2019; опубл. 25.06.2020; Бюлл. № 18 – 9 с.

4. Патент на полезную модель РФ 209073, МПК H01M 8/16. Микробный топливный элемент / Н. В. Масейкин, **А. А. Масейкина**, И. С. Степаненко; заявитель и патентообладатель Масейкин Н. В., **Масейкина А. А.** – № 2021117491; заявл. 16.06.2021; опубл. 01.02.2022; Бюлл. № 4 – 12 с.

Публикации в иных изданиях

1. **Батаршева, А. А.** Исследование микрофлоры брюхоногих моллюсков / **А.А. Батаршева**, И.С. Степаненко // Сбор. конк. проект. VI Междунар. интеллект. конк. студ., аспирант., доктор., Россия, Москва, 15 мая 2017 г. / Discovery Science: University – 2017 – 2017. – С.31-39.

2. Кидяева, К.А. Исследование антибиотикочувствительности микроорганизмов, выделенных из зева и с кожи рук у студентов Медицинского института / К.А. Кидяева, **А.А. Батаршева**, Г.А. Солодовникова, И.С. Степаненко // Мат. науч. конф. Саранск, 6-13 декабря 2017 г. ч.2. Естественные науки. XLVI Огарёвские чтения. – 2018. – С. 339-343.

3. Степаненко, И.С. Противомикробная активность соединений на основе замещенных 4-,5-,6-,7-аминоиндолов / И.С. Степаненко, С.А. Ямашкин, Ю.А. Костина, **А.А. Батаршева**, Е.Д. Сладников // XXI Кашкинские чтения. Санкт-Петербург, 6-8 июня 2018 г. Пробл. мед. микол. – 2018. – Т.20. – №2. — С.117.

4. **Батаршева, А. А.** Выделение *Staphylococcus species* со слизистой носа и исследование антибиотикочувствительности выделенных штаммов / **А.А. Батаршева**, Ю.А. Костина, Е.Д. Сладников, И.С. Степаненко // Огарёв-online. – 2018. – №4 (109). – С.1-7. РИНЦ, Цит. 0.

5. **Батаршева, А.А.** Микробная электростанция / **А.А. Батаршева**, Н.В. Масейкин // Мат. Всерос. научн. конф. «Человек и окружающая среда: экология, здоровье, образование», Саранск, 30-31 мая 2019 г.– 2019. – С.129-154.

6. **Масейкина, А.А.** Монохлорацетаты замещенных 5-,6-,7-аминоиндолов, обладающие противомикробным действием / А.А. Масейкина, И.С. Степаненко, С.А. Ямашкин // XXIII Кашкинские чтения. Санкт-Петербург, 9-11 июня 2020 г. Пробл. мед. микол. – 2020. – Т.22. – №3. – С.102.

7. Степаненко, И.С. Изучение биологической активности калиевых солей замещенных пирроло[2,3-f]- и [3,2-f]хинолинкарбоновых кислот / И.С. Степаненко, С.А. Ямашкин, Н.В. Жукова, Е.Д. Сладников, **А.А. Масейкина** // Совр. пробл. науки и образ.. – 2020. – №6. ВАК, РИНЦ, IF- 0,421. Цит. 1.

Примечание: Батаршева, Batarsheva – фамилия Масейкиной А.А. до даты 21.09.2019 г.