

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский
государственный университет им. Н.П. Огарёва»

На правах рукописи

Масейкина Алена Александровна

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

Специальность: 1.5.11 – Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саранск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам	13
1.1.1 Эволюция лекарственной устойчивости	13
1.1.2 Механизмы лекарственной устойчивости	18
1.1.3 Проблемы лекарственной устойчивости у бактерий.....	20
1.1.4 Поиск новых мишеней для антибиотиков	23
1.2 Внеэкспериментальный прогноз биологической активности <i>in silico</i>	27
1.3 Общая характеристика алкалоидов – производных индола	29
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	36
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1 Исследуемые микроорганизмы	36
2.2 Исследуемые соединения	38
2.3 Методы культивирования и хранения микроорганизмов	43
2.4 Прогнозирование спектров активности веществ (PASS).....	44
2.5 Анализ антимикробного потенциала исследуемых соединений	45
2.5.1 Метод серийных разведений	46
2.5.2 Диско-диффузионный метод (ДДМ).....	47
2.6 Оценка воздействия исследуемых соединений на клеточную стенку прокариот	48
2.7 Оценка морфоструктурных повреждений бактериальных клеток под воздействием исследуемых соединений.....	49
2.8 Оценка типа противомикробного действия исследуемых соединений.....	50
2.9 Оценка генотоксичности и мутагенности исследуемых соединений в прокариотических тест-системах	52
2.9.1 Тест на ДНК-повреждающий эффект (REC-тест)	52
2.9.2 Полуколичественный метод учета мутаций у <i>S.typhimurium</i>	54
2.10 Анализ статистических результатов	56
3 ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ИНТЕРПРИТАЦИЯ.....	57

3.1 Биологическая активность хлорсодержащих производных замещенных 5-,6-,7-аминоиндолов.....	57
3.2 Характеристика микроорганизмов полученной рабочей коллекции	67
3.3 Исследование антимикробной активности исследуемых соединений.....	86
3.3.1 Оценка антибактериального потенциала	86
3.4 Исследование воздействия исследуемых соединений на клеточную стенку прокариот.....	93
3.5 Оценка морфоструктурных повреждений бактериальных клеток под воздействием исследуемых соединений.....	98
3.6 Оценка типа противомикробного действия исследуемых соединений.....	112
3.7 Исследование мутагенных и ДНК-повреждающих свойств тестируемых соединений <i>in vitro</i>	115
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	121
ВЫВОДЫ	123
РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	125
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	126
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	127
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	151

ВВЕДЕНИЕ

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]. Начиная с начала 20-го века, открытие и разработка антиинфекционной терапии в сочетании с улучшением санитарии и личной гигиены привели к резкому снижению смертности и заболеваний, вызванных микроорганизмами [Yin K., 2020]. Однако эти достижения были в основном реализованы в промышленно развитых странах с высоким уровнем дохода [Страчунский Л. С. и др., 2007]. Хотя страны с низким и средним уровнем дохода также извлекли выгоду из этих достижений, глобальное бремя болезней от инфекционных агентов остается поразительно высоким во многих частях мира, включая Африку, Индию и Юго-Восточную Азию [Онищенко Г. Г. и др., 2015; Кедрова О. В., 2015]. В совокупности инфекционные агенты ежегодно приводят к приблизительно 9 миллионам смертей, а также значительным экономическим затратам. 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].

Противомикробные 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]. 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 вышеобозначенной темы обусловлена понятной потребностью в получении и исследовании особенностей действия новых противомикробных соединений, имеющих высокий антимикробный потенциал и, в тоже время, имеющих низкую токсичность [Заман С. Б., 2017].

Рост количества новых противомикробных препаратов за последние два десятилетия стал результатом обширных исследований, в которых использовался растущий объем знаний, описывающих взаимодействие антибиотиков с их мишенями в бактериальных клетках. Информация, полученная от одного класса противомикробных агентов, часто использовалась для продвижения развития других классов. В случае бета-лактамов информация о взаимосвязях структура-активность, полученная из пенициллинов и цефалоспоринов, была быстро применена к цефамицинам, монобактамам, пенемам и карбапенемам с целью обнаружения агентов широкого спектра действия с заметно улучшенной эффективностью. Эти усилия привели к внедрению многих новых антибиотиков, которые демонстрируют выдающуюся клиническую эффективность и улучшенную фармакокинетику у людей. Но процесс разработки нового антибиотика трудоемок и сложен, начиная с ранних стадий испытаний *in vitro*, затем исследование эффективности и безопасности животных *in vivo*, и заканчивая фазами I, II и III клинических испытаний [Заман С. Б., 2017; Decuypere L. et al., 2018; Messaoudi A. et al., 2019].

В Российской Федерации существует законодательная потребность в поиске новых, лишенных токсичности и эффективных противомикробных соединений.

Эта потребность закреплена в Распоряжении Правительства РФ от 25 сентября 2017 года № 2045-р, которое касается стратегии предотвращения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 года.

Переход к технологиям здоровьесбережения, включающие в себя рациональное потребление антибактериальных препаратов отражен в Указе Президента РФ от 1 декабря 2016 г. № 642. «Стратегия научно-технологического развития Российской Федерации».

Исследования индола и его производных остаются актуальными в последние десятилетия. Это связано с тем, что индольные алкалоиды являются основой для создания как природных, так и синтетических физиологически активных веществ. Индол присутствует в молекулах биогенного амина серотонина и важной белковой аминокислоты триптофана, что делает его неотъемлемой частью живых систем. Присутствие аминогруппы в бензольной части молекулы у ароматических аминов обеспечивает возможность получения различных производных с их 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].

Цель работы – анализ антибактериального потенциала нового класса синтетических соединений – хлорсодержащих производных замещенных аминокислот индолов.

Задачи исследования:

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-1*H*-индол-7-ил)ацетамид (лабораторный шифр **T1**), 2-хлор-*N*-(5-метокси-2,3-диметил-1*H*-индол-6-ил)ацетамид (лабораторный шифр **T4**), 2-хлор-*N*-(1,2,3-триметил-1*H*-индол-6-ил)ацетамид (лабораторный шифр **T7**), монохлорацетат 2,3-диметил-1*H*-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-аминоиндоллов 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-Р 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 Т4, Т7 и Т12 *in vitro* на штаммах *S.typhimurium* ТА98 и *S.typhimurium* ТА100 и дозозависимая мутагенная активность соединения Т1 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 Т1 и Т12 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-аминоиндоллов, обладающих противомикробным действием (патент РФ №2721833).

Разработан способ получения монохлорацетатов замещенных 5-,6-,7-аминоиндоллов, 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 T1, T4, T7 и T12 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, диоксидина, 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 **T1**), 2-хлор-*N*-(5-метокси-2,3-диметил-1*H*-индол-6-ил)ацетамид (лабораторный шифр **T4**), 2-хлор-*N*-(1,2,3-триметил-1*H*-индол-6-ил)ацетамид (лабораторный шифр **T7**), монохлорацетат 2,3-диметил-1*H*-индол-7-аммония (лабораторный шифр **T12**) 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 полученных результатов

Валидность проделанных исследований обоснована их верификацией при проведении тестирования с применением разнообразных современных методов микробиологии, биохимии и молекулярной биологии, обладающих высокой специфичностью. Большинство исследований выполнены на современном оборудовании.

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.

Апробация результатов исследования

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 соединений).

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.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам

1.1.1 Эволюция лекарственной устойчивости

Антибиотики – это химические вещества, выделяемые бактериями и грибами, используемые для уничтожения или подавления микробов-конкурентов в микроокружении и, таким образом, являющиеся частью микробной самозащиты [Strelkauskas A. et al., 2016; Baker, J. J., 2006; Lee B. Y., 2017; Kamol, Y., 2017]. Они также могут быть полусинтетическими и полученными чисто синтетическим путем. В настоящее время много вторичных метаболитов бактерий и полусинтетических антимикробных агентов, полученных из натуральных продуктов, даже несмотря на то, что устойчивые к лекарственным средствам штаммы требуют постоянных модификаций исходного антибиотика. Химики-медики модифицируют структуры для создания полусинтетических производных с улучшенными свойствами. Некоторые природные антибиотики (такие как цефалоспорины и макролиды) имеют гораздо более сложную химическую структуру по сравнению с синтетическими антибиотиками (такими как сульфаниламидные препараты и хинолоны). Первое открытие успешного противомикробного соединения было сделано немецким врачом Паулем Эрлихом. Эрлих предположил, что для того, чтобы соединение было пригодно для терапевтического применения, оно должно быть селективно токсичным, то есть проявлять большую токсичность для целевого микроорганизма, чем для клеток-хозяев. В 1904 году он обнаружил, что краситель трипановый красный был активен против трипаносомы, вызывающей африканскую сонную болезнь, и предположил, что его можно использовать терапевтически. Позже П.Эрлих успешно синтезировал препарат арсфенамин (сальварсан), который использовался для лечения протозойной болезни. П.Эрлих, вместе с японским ученым, Сахачиро Хата

также обнаружил, что арсфенамин активен против спирохеты, вызывающей сифилис. Прогресс в поиске новых противомикробных препаратов в течение следующих 20 лет был медленным, пока в 1934 году не был введен профлавин [Patrick, G. L., 2009; Patrick G. L., 2013; Simões D. et al., 2018]. К сожалению, этот препарат был слишком токсичным, чтобы его можно было использовать против бактериальных инфекций, и он использовался в качестве дезинфицирующего средства и антисептика [Madigan M. T. et al., 2009; Prescott, L. M. et al., 2008; Inana M. E. et al., 2019].

Сульфонамидные препараты стали первыми и единственными эффективными антибактериальными средствами против системных бактериальных инфекций до появления пенициллина G. Герхард Домагк в 1930-х годах показал, что красный краситель производный сульфаниламида, синтезированный Байером, полностью защищал мышей от бактериальных инфекций. Позже работники Института Пастера показали, что краситель метаболизируется кишечными микроорганизмами до активной формы – сульфаниламида. Сульфаниламид (Пронтозил), коммерциализированный Байером, был первым сульфонамидом, за которым вскоре последовали сульфонамидные препараты, и сульфонамиды были успешно использованы для лечения стрептококковых инфекций [Prescott L. M. et al., 2008; Inana M. E. et al., 2019].

В 1928 году Александр Флеминг случайно обнаружил пенициллин, когда отметил его ингибирующее действие на золотистый стафилококк. Пенициллин был первым натуральным продуктом, выделенным из гриба *Penicillium notatum* [Projan S. J., 2007; Brown E. D. et al., 2016; Fleming A., 1929]. Говард Флори, Эрнст Чейн и Норман Хитли разработали пенициллин в качестве первого антибиотика. Впервые он был использован в терапевтических целях в 1941 году. Он активен в отношении грамположительных бактерий и спирохет, вызывающих сифилис. Говард Флори и его коллеги показали, что пенициллин G более эффективен в борьбе со стафилококковыми, стрептококковыми, пневмококковыми инфекциями и сифилисом. К сожалению, клинически значимая резистентность к пенициллину появилась в 1947 году, но это всё еще широко используемый препарат. Началом

эпохи антибиотиков принято считать период открытия пенициллина Александром Флемингом.

После клинического успеха пенициллина разработка хлорамфеникола, тетрациклина, эритромицина, рифампицина и ванкомицина была достигнута между 1940 и 1960 годами [Yoneyama H. et al., 2006; Chung P. Y., 2018]. Однако резистентность к двум первым широко используемым антибиотикам (пенициллину и стрептомицину) была зарегистрирована у клинических изолятов через несколько лет после их введения [Lakhundi S. et al., 2018; Medina E. et al., 2016; Otto M., 2017; Khan A. et al., 2018; Сычѐв Д. А. et al., 2018]. До введения пенициллина в 1940-х годах в качестве терапевтического средства была выделена бактериальная пенициллиназа [Sillankorva S. et al., 2018; Sagar S. et al., 2019], показывающая, что механизмы устойчивости бактерий уже были компонентами природных микробных популяций, а не только в следствии медицинского вмешательства человека [Brauner, A. et al., 2016]. Согласно исследованиям, резистентные элементы циркулировали в популяциях бактерий в течение тысячелетий, а проявили себя в момент появления эры антибиотиков. Это подтверждается тем фактом, что большинство антибиотиков получают из актиномицетов, обитающих в почве, и элементы устойчивости для самозащиты часто группируются в оперонах биосинтеза антибиотиков [Dhakai D. et al., 2019]. Соответственно, механизмы устойчивости ко многим антибиотикам в клинических изолятах берут свое начало из глобальной резистомы. Глобальная резистома – это комплекс всех генов резистентности к антибиотикам в геномах всех микроорганизмов – патогенных и непатогенных, обитающих в природных условиях в самых разнообразных биотопах [Виноградова К. А. и др., 2013; Егоров А. М. и др., 2018].

Цефалоспорин, который также содержит β -лактамное кольцо, был выделен из гриба, *Cephalosporium*, в 1948 году. Аналогично, многие полусинтетические производные были разработаны из этого исходного соединения. Открытие первого из аминогликозидных антибиотиков, стрептомицина, в 1940-х годах расширило антибактериальный спектр, включив туда грамотрицательные бактерии и микобактерии. Чуть позже были обнаружены тетрациклины, эритромицин и другие

макролиды.

В целом были разработаны полусинтетические производные, например, сульфаниламидные препараты, хинолоны, азолы и т. д. Фторхинолоны – это класс синтетических антибактериальных агентов, впервые синтезированных в начале 1960-х годов. С тех пор было синтезировано несколько поколений фторхинолонов [Чупахин О.Н. и др., 2018]. Они мешают бактериальной ДНК-гиразе ингибировать синтез нуклеиновых кислот. Основные классы антибактериальных агентов, например, группа β -лактамов и тетрациклинов, синтетические сульфонамиды и фторхинолоны, являются соединениями нового поколения с улучшенной стабильностью, фармакокинетикой и спектром активности.

Несмотря на большое количество эффективных антибактериальных агентов, которые были разработаны, лекарственная устойчивость возникла для всех основных классов антибактериальных средств, поэтому существует острая необходимость в разработке новых классов антимикробных соединений с различными микробными мишенями.

Введение антибиотиков в качестве средства для борьбы с бактериальной инфекцией считается одним из наиболее важных событий в истории медицины [Davies J. et al., 2010; Brown E. D. et al., 2016; Overbye K. M. et al., 2005; Dodds D. R., 2017].

Бактерии обладают способностью адаптироваться и приспосабливаться к изменениям в окружающей среде и впоследствии вырабатывать защитные механизмы для снижения их восприимчивости к антибиотикам [Högberg L. D. et al., 2010; O'Brien K. S. et al., 2019]. Хотя эта восприимчивость может быть достигнута посредством спонтанной мутации и изменения гена-мишени, большинство генов устойчивости к антибиотикам приобретаются с помощью горизонтального переноса генов. Гены устойчивости к антибиотикам обычно содержатся в мобильных генетических элементах, таких как бактериофаги, плазмиды и транспозоны, что позволяет им переноситься между бактериями. Горизонтальный перенос генов способствовал распространению генов устойчивости к антибиотикам через процессы обмена генами, такие как конъюгация, трансдукция

и трансформация.

Повсеместное использование антибиотиков (между 100 000 и 200 000 тонн в год во всем мире) обеспечили необходимые условия для мобилизации генов устойчивости, которые циркулируют в окружающей среде, в патогенных бактериях [Bengtsson-Palme J. et al., 2015; Vonev B. et al., 2019]. Следовательно, теперь появляется информация об устойчивости к любому антибиотику, когда-либо использовавшемуся в клинической практике [Hughes D. et al., 2017].

Противомикробные средства – это биохимические агенты, используемые в лечении для устранения или контроля инфекции путем воздействия на болезнетворные микроорганизмы [Fane M. E. L. et al., 2017]. Подобные средства могут активно уничтожать микроорганизмы или препятствовать его росту и размножению. Антимикробная активность лекарства зависит от дозы и продолжительности приема лекарства [Clatworthy A.E. et al., 2007; Nakatsuji T. et al., 2018]. Однако общая эффективность препарата ограничивается развитием лекарственной устойчивости [Geli P. et al., 2012; Read A. F., 2016]

Лекарственная устойчивость – это признак, который делает микроба менее восприимчивым к лекарству [Davies J. et al., 2010; Larsson D. G. J. et al., 2018; Yeh P.J. et al., 2009; Deak D. et al., 2016]. Лекарственная устойчивость проявляется различными способами, в том числе изменением мишеней и ферментативной функции лекарств, а также деградацией лекарств, снижением поглощения и оттоком лекарств. Независимо от механизма устойчивый микроорганизм испытывает снижение антимикробной активности (частично резистентный) или полное отсутствие лекарственной активности (полностью резистентный) [Wiesch P.A. et al., 2011; Holmes A. H. et al., 2016]. В присутствии лекарственного средства это дает преимущество устойчивому (мутантному) микроорганизму по сравнению с восприимчивым (дикого типа) микроорганизмом. Выбор устойчивых к лекарствам микроорганизмов вызывает пролиферацию лекарственной устойчивости у индивидуума, что приводит к медикаментозному лечению или неудаче лечения, в то время как распространение резистентной инфекции в популяции снижает эффективность лекарственного средства.

Распространение лекарственной устойчивости включает в себя два процесса. Во-первых, человек, который получает лечение, приобретает лекарственно-устойчивую инфекцию, а во-вторых, лекарственно-устойчивые микроорганизмы передаются другим людям, вызывая новые инфекции, которые распространяют лекарственную устойчивость среди населения [Pidcock L. J. V. et al., 2017]. Как правило, распространение лекарственно-устойчивой инфекции определяется вероятностью того, что лекарственно-устойчивый микроорганизм передается новому хозяину, которого затем лечат тем же лекарственным средством.

Для отдельного человека лекарственная устойчивость не вызывает проблем при условии, что имеется другое лекарственное средство, и оно эффективно против микроорганизма с лекарственной устойчивостью [Leale A. M. et al., 2018; Blanquart, F. et al., 2018]. Конечно, к этому препарату может развиваться также лекарственная устойчивость. На уровне населения лекарственную устойчивость можно было бы избежать или замедлить, если бы употребление препаратов было прекращено или нормировано, но на уровне отдельных лиц бессмысленно отказываться в необходимом лечении. Этот подход, тем не менее, важен в отношении нецелевого использования противомикробных препаратов, что ставит под угрозу успех лечения. Разумное использование противомикробных препаратов играет важную роль как для населения в целом, так и индивидуума [World Health Organization, 2012].

1.1.2 Механизмы лекарственной устойчивости

Устойчивость бактерий к антибиотикам является естественным явлением [Madigan M. T. et al., 2009; Okonkwo E. C. et al., 2018; Wang L. et al., 2019]. В природе микроорганизмы развивают мутации или приобретают гены устойчивости к общим метаболитам от других микроорганизмов в окружающей среде. Гены устойчивости легко передаются по горизонтальному переносу между родственными видами и даже между неродственными видами, поэтому они могут распространяться через микробные среды обитания, особенно при наличии давления отбора из-за

присутствия промышленных антибиотиков.

Существует несколько распространенных механизмов лекарственной устойчивости в бактерии.

1. Пониженное проникновение или проницаемость лекарств в клеточную мембрану возбудителей. Например, пенициллин G не эффективен против кишечных и родственных грамотрицательных бактерий, поскольку он не может проникнуть через наружную мембрану [Strelkauskas A. et al., 2016; Madigan M. T. et al., 2009; Prescott L. M. et al., 2008].

2. Изменение рецепторов-мишеней лекарственного средства снижает эффективность связывания препарата. Ванкомицин больше не эффективен против энтерококков, потому что D-аланил-D-аланин в энтерококковом пептидогликане заменен на D-аланил-D-лактат.

3. Антимикробные препараты также могут быть удалены транслоказами плазматической мембраны патогена. Эффлюксные насосы могут быть специфичны для одного лекарственного средства, например, в отношении устойчивости к тетрациклину. Насосы с множественной лекарственной устойчивостью относительно неспецифичны и могут выкачивать из клетки много разных неродственных лекарств. Грамотрицательные бактерии, такие как *E.coli* и *P.aeruginosa*, содержат этот тип системы оттока [Madigan M. T. et al., 2009; Prescott L. M. et al., 2008; Pang Z. et al., 2019; Garneau-Tsodikova S. et al., 2016].

4. Бактерии могут выделять ферменты, которые модифицируют лекарства, инактивируя их. Например, секреция бактериальных бета-лактамаз, которые гидролизуют β -лактамные антибиотики (например пенициллин, цефалоспорин) делает их клинически неэффективными, так как β -лактамное кольцо является ключевым структурным компонентом этих антибиотиков [Schwarz S. et al., 2016].

5. Бактерии могут выработать альтернативный метаболический/биохимический путь для производства своих продуктов, и они поглощают фолиевую кислоту из своего окружения, поэтому им не нужно синтезировать фолиевую кислоту, когда путь образования фолиевой кислоты блокируется сульфонамидными препаратами.

6. Некоторые антимикробные агенты могут быть неспособны ингибировать бактерии, если они не имеют структуры, на которую могут воздействовать антимикробные агенты. Другими словами, бактерии естественно устойчивы к некоторым противомикробным агентам. Бактерии микоплазмы естественным образом устойчивы к пенициллинам, поскольку не имеют клеточной стенки.

1.1.3 Проблемы лекарственной устойчивости у бактерий

При решении проблемы устойчивости к противомикробным препаратам, их рациональное употребление обычно воспринимается как сокращение общего потребления противомикробных препаратов [Elbourne A. et al., 2017; World Health Organization, 2001; World Health Organization, 2012]. Это основано на том принципе, что потребление противомикробных препаратов определяет степень воздействия лекарственного средства в микробной среде и, следовательно, общий выбор устойчивости [Wiesch P.A. et al., 2011; Lässig M. et al., 2017]. Это подтверждается исследованиями, сравнивающими использование противомикробных препаратов в разных странах, регионах и больницах, которые показали, что увеличение потребления противомикробных препаратов связано с большей распространенностью лекарственной устойчивости [MacFadden D. R. et al., 2018; Olesen S. W. et al., 2018; Leale A. M. et al., 2018]. Кроме того, лекарственная устойчивость чаще встречается у людей, которые ранее получали лекарственную терапию [Barlam T. F. et al., 2016].

Повышенное потребление антимикробных препаратов с течением времени привело к большей распространенности лекарственной устойчивости, что привело к увеличению затрат на здравоохранение [Batura N. et al., 2018; Lutgring J. D. et al., 2017]. Это стимулировало усилия по снижению общего потребления противомикробных препаратов путем борьбы с чрезмерным и неправильным использованием противомикробных препаратов в лечении пациентов, сельском хозяйстве и ветеринарии [Burne M. K. et al., 2019; He L. Y. et al., 2016]. Излишнее использование противомикробных препаратов включает неадекватное

лекарственное лечение, избыточное применение лекарств широкого спектра действия и употребление противомикробных препаратов в качестве стимуляторов роста [Walsh С., 2000]. Несоблюдение схем лечения и доступность противомикробных препаратов низкого качества также считается факторами, способствующими возникновению устойчивости к противомикробным препаратам [Tardy L. et al., 2019; Dye С. et al., 2016]. Важные принципы по ограничению потребления противомикробных препаратов включают разработку государственной политики, улучшение эпидемиологического надзора и управление устойчивостью к противомикробным препаратам, повышение квалификации медицинских работников, повышение осведомленности и просвещения общественности по вопросам устойчивости к противомикробным препаратам, регулирование доступности противомикробных препаратов, надлежащую диагностику и лечение заболеваний, соблюдение схем лечения и продвижение альтернатив противомикробному лечению [World Health Organization, 2010].

Множественное употребление противомикробных препаратов

Фармацевтическая промышленность предоставила множество вариантов лекарств для лечения инфекционных заболеваний и еще больше лекарств находится в процессе разработки [Windels E. M. et al., 2019; Lyons M. A., 2018].

Таким образом, полное определение рационального употребления препаратов должно также включать способы оптимального использования различных лекарств. Возможно, это использование более одного препарата одновременно. Такие стратегии, как комбинированная терапия, циклический прием и смешивание лекарственных препаратов, являются предлагаемыми методами замедления возникновения и распространения лекарственной устойчивости, при которых используются несколько лекарств [Baum M. et al., 2016; Barlam T. F. et al., 2016; Kennedy D. A. et al., 2017]. В любом случае использование нескольких лекарств целесообразно только тогда, когда это замедляет эволюцию лекарственной устойчивости по сравнению с использованием одного лекарства.

Комбинированная терапия

Комбинированная терапия считается эффективной, если она увеличивает результативность лекарства и снижает вероятность того, что человек приобретет устойчивую инфекцию в течение курса лечения (от мутации *de novo*) [Chen X. et al., 2016]. Тем не менее, исследования показали, что использование комбинированной терапии может фактически способствовать развитию лекарственной устойчивости [Hughes D. et al., 2017; Barbosa C. et al., 2017]. Например, частично устойчивый микроорганизм может испытывать только антимикробную активность некоторых компонентов лекарств. Следовательно, если комбинированная терапия основана на синергии дозы, частично резистентный микроорганизм может подвергаться воздействию более низких доз компонентных лекарств, превосходя микроорганизмы дикого типа и ускоряя эволюцию устойчивости ко всей комбинированной терапии.

Дальнейшая оценка комбинированной терапии должна учитывать полезность антагонистических дозовых взаимодействий для замедления развития лекарственной устойчивости. Точно так же необходимо более полное понимание мутационных путей и взаимодействий генов, чтобы быть уверенным, что комбинированная терапия представляет собой рациональное использование лекарств по сравнению с монотерапией.

Антимикробные препараты играют важную роль в оказании помощи людям в борьбе с инфекциями, вызванными патогенными микроорганизмами, обеспечивая тем самым успешное лечение микробных заболеваний. Быстро растущее появление микробных штаммов, устойчивых к существующим антимикробным агентам являются глобальной проблемой и серьёзным ограничением использования противомикробной химиотерапии, и эта значительная угроза особенно актуальна для больниц. Вспышки инфекций, вызванные устойчивыми к метициллину *S.aureus*, устойчивыми к ванкомицину энтерококками и множественной лекарственной устойчивостью *P.aeruginosa*, всё чаще регистрируются во всём мире [Pang Z. et al., 2019; Medina E. et al., 2016].

Устойчивость к противомикробным лекарственным средствам – это способность микроорганизмов противостоять биологическому воздействию

антиинфекционных химиотерапевтических агентов. Антимикробные агенты используются для медицинской и ветеринарной терапии, в качестве дезинфицирующих средств, антисептиков, сельскохозяйственных биоцидов, пищевых и кормовых добавок. Огромное количество антимикробных агентов, используемых во многих промышленных целях, вызывают возникновение и распространение лекарственной устойчивости и приводят к быстро растущему числу патогенных штаммов, которые не поддаются лечению противоинфекционными препаратами [Schwarz S. et al., 2016].

Стоимость устойчивости к антибиотикам

Недавняя консервативная оценка стоимости устойчивости к антибиотикам для государств-членов Европейского Союза составила 1,5 миллиарда евро, при этом примерно 25 000 пациентов в ЕС ежегодно умирают от инфекционных заболеваний, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью [Kumar A. et al., 2017]. В США и Европе наиболее проблемными патогенными микроорганизмами, связанными с устойчивостью к антибиотикам и внутрибольничными инфекциями, являются: *Enterococcus faecium*, *S.aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Acinetobacter baumannii*, *P.aeruginosa* и виды *Enterobacter*, которые были названы «ESKAPE»-патогены [Rice L. B., 2008; Santajit S. et al., 2016]. Эта коллекция патогенов имеет исключительное значение, поскольку они представляют собой парадигмы патогенеза, передачи и устойчивости.

Для борьбы с угрозой резистентности микроорганизмов к антибиотикам необходимо рационально и разумно использовать антибиотики и сочетать это со строгой и тщательной гигиенической политикой [Яковлев С. В., 2019]. Тем не менее одна только эта политика не может решить проблему устойчивости к антибиотикам, и разработка новых антимикробных препаратов имеет решающее значение для нашего будущего.

1.1.4 Поиск новых мишеней для антибиотиков

Увеличение появления резистентности к антибиотикам у микроорганизмов в сочетании с другими трудностями, с которыми сталкивается фармацевтическая промышленность, показала необходимость в разработке новых подходов к открытию и исследованию потенциальных антимикробных соединений. Один из таких подходов – это применение методов скрининга нового поколения. Скрининг новых антибиотиков против штамма *E. coli*, обладающего устойчивостью к обычно используемым антибиотикам, автоматически отбираются при успешном воздействии на штамм в потенциальный новый класс противомикробных соединений [Baltz R. H., 2019]. Во-вторых, использование методов, таких как технология экспрессии генов *in vivo* и направленный мутагенез, может оказаться полезным для новых противомикробных соединений путем определения генов, необходимых для инфекционного процесса [Wei T. et al., 2019; Yoneyama H. et al., 2006]. Согласно исследованиям, профили экспрессии патогенных микроорганизмов во время инфекционного процесса *in vivo* сильно различаются по сравнению с профилями, которые выполняются в богатых питательных средах *in vitro*. Поэтому использование методов, которые могут потенциально определить мишени, могут помочь в разработке и поиске антимикробных препаратов. Использование багажа знаний, полученных в ходе реализации проектов по секвенированию микробного генома, открывает большое поле для создания и исследования новых противомикробных соединений. Анализ последовательностей генома патогенных микроорганизмов позволяет выделить консервативные ферменты, которые необходимы для роста и размножения бактерий. Исследование, проведенное в Великобритании, показало анализ геномов нескольких респираторных патогенных микроорганизмов на предмет основных консервативных генов, отсутствующих у людей [Rosamond J. et al., 2000; Fields F. R. et al., 2017]. С помощью подробного биоинформатического анализа можно выбрать потенциальных кандидатов для разработки новых антимикробных соединений. Наконец, выявление новых экологических ниш, населенных бактериями, продуцирующими антибиотики, может привести к появлению ранее неизвестных биологически активных соединений [Wright G. D. et al., 2007;

Vimbela G. V. et al., 2017]. Абиссомицин С (который ингибирует бактериальный биосинтез *n*-аминобензойной кислоты) был выделен из недавно идентифицированной морской актиномицетной бактерии [Genilloud O., 2017]. Другие источники новых бактерий, продуцирующих антибиотики, включают: бактериальные симбионты насекомых [Flórez L. V. et al., 2017] и членистоногих [Cambronero-Heinrichs J. C. et al., 2019], актиномицеты, обитающих в почве, так как известно, что идентифицировано ~ 2% антибиотиков, продуцируемых *Streptomyces* [Wohlleben W. et al., 2016]. Потенциальные новые мишени для новых антибиотиков включают пептид-деформилазу [Yuan Z. et al., 2001; Fieulaine S. et al., 2016], бактериальный синтез жирных кислот [Heerding D. A. et al., 2001; Tahtaci H. et al., 2018], немевалонатный путь и сигнальные сети (двухкомпонентные системы и пути обнаружения кворума).

Количество новых противоинфекционных препаратов, появившихся на рынке в период с 1962 по 2000 год, было очень низким. Были обнаружены фторхинолоны [Idowu T. et al., 2017]. Самые новые природные антибиотики, которые введены в клиническую практику, оказались представителями класса оксазолидинонов, а именно линезолид в 2000 году. Все другие новые препараты имеют узкий спектр действия, эффективный только против нескольких патогенов или только одного типа.

Согласно данным Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медицинских препаратов с 2009 по 2012 год в США были зарегистрированы два новых препарата – телаванцин и цефтаролин фосамил. Затем по программе GAIN в 2014 и в начале 2015 года были одобрены пять новых антибиотиков далбаванцин, сивекстро (тедизолида фосфат), орбактив (оритаванцин), зербакса (цефтолозан + тазобактам) и авиказ (цефтазидим + авибактам).

За последние годы в период с 2016 по настоящее время были одобрены еще несколько антибиотиков. Это меропенем-варобактам, делафлоксацин, лефамулин, фосфомицин, цефидерокол, плазомицин, омадациклин, иклаприм, эравациклин (Рисунок 1).

Другая причина заключается в том, что разработка новых антибактериальных агентов является дорогостоящим и длительным процессом. По этой причине многие фармацевтические компании прекратили или ограничили свои усилия по разработке новых противомикробных препаратов. Только несколько фармацевтических компаний в настоящее время работают в этой области. Известны основные клеточные мишени для антибиотиков, которые убивают или подавляют рост микроорганизмов. Основные клеточные мишени: бактериальная клеточная стенка, бактериальная плазматическая мембрана, синтез бактериальных белков, бактериальных нуклеиновых кислот и метаболизма бактерий.

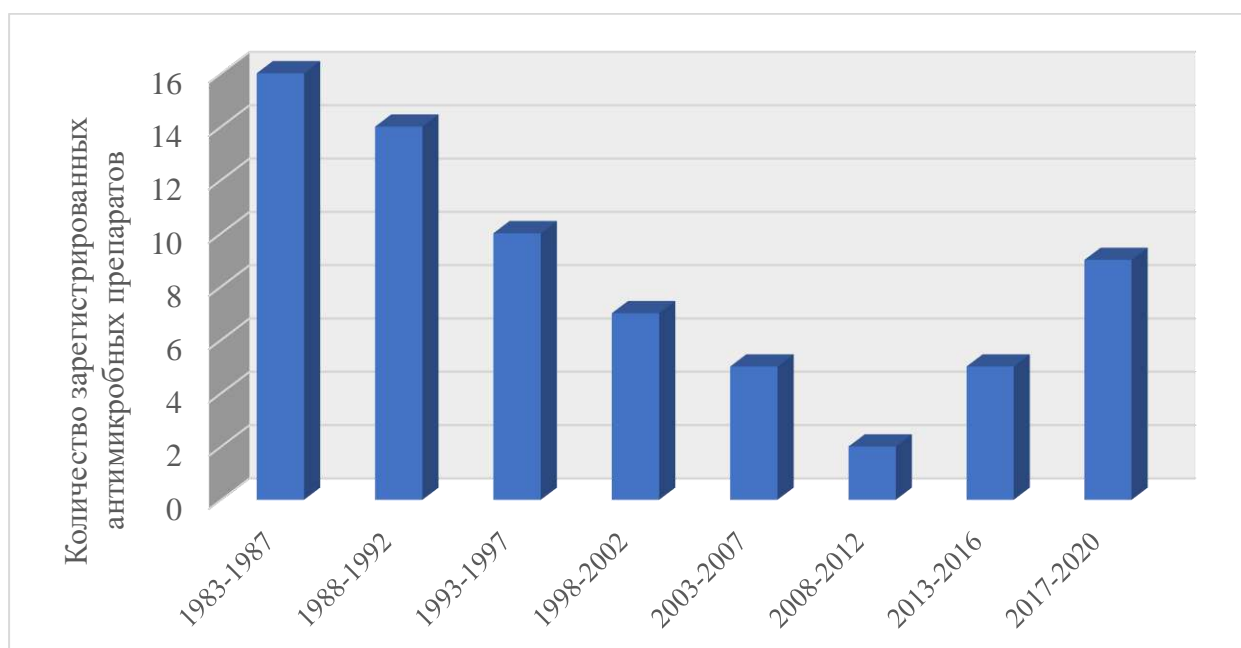


Рисунок 1 – Количество новых антимикробных препаратов, зарегистрированных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медицинских препаратов – агентством Министерства здравоохранения и социальных служб США за 5-летний период, вплоть до 2020 года

Разработка новых лекарств должна быть сосредоточена на некоторых новых мишенях для ингибирования, таких как синтез жирных кислот [Ali J. Et al., 2018; Chung V. C. et al., 2016]. Есть данные, что белок тирозин-фосфатаза может быть возможной клеточной мишенью [Mascarello A. et al., 2016; Kupferschmidt K., 2016; Wilson B. A. et al., 2016; Day T. et al., 2016; Iredell J. et al., 2016; Allerberger F. et al., 2016].

1.2 Внеэкспериментальный прогноз биологической активности *in silico*

При поиске новых противомикробных соединений на первых этапах исследования мы имеем только структурную формулу. Еще 30 лет назад никто представить не мог, что, зная формулу химического соединения можно предсказать его биологическую активность. Одна из таких компьютерных систем прогнозирования биологической активности веществ – Prediction of Activity Spectra for Substances – PASS. Она позволяет анализировать формулы исследуемых соединений среди множества молекул, которые содержатся в программе. Система включает десятки тысяч молекул органических веществ различных химических классов, демонстрирующих множество видов биологической активности, которая используется для прогноза наличия (Pa) или отсутствия (Pi) активности [Филимонов Д. А. и др., 2006; Филимонов, Д. А., 2014].

PASS – это компьютерная программа для прогнозирования спектров биологической активности органических соединений, подобных лекарствам. В качестве входных данных может выступать двумерная структура химического соединения либо длинный список веществ, на выходе программа выдает список биологической активности со значениями вероятности [Vijaya P. et al., 2021; Shahzadi I. et al., 2021; Филимонов Д. А. и др., 2006; Филимонов, Д. А., 2014].

Спектр биологической активности – это внутреннее свойство соединения, которое отражает различные фармакологические эффекты, физиологические и биохимические механизмы действия и специфическую токсичность (мутагенность, канцерогенность, тератогенность и эмбриотоксичность). Активность во многом зависит от структурной природы соединения. Эти новые виды активности соединения обеспечивают понимание терапевтических применений [Vijaya P. et al., 2021; Shahzadi I. et al., 2021; Филимонов Д. А. и др., 2006; Филимонов, Д. А., 2014].

Веб-приложение предсказывает спектр биологической активности соединения на основе его структуры. Инструменты прогнозирования PASS построены с использованием 20000 основных соединений из базы данных MDDR

(созданной Accelrys и Prous Science). База данных содержит более 180000 биологически значимых соединений и постоянно обновляется. Спектр прогнозируемой активности включает 65 из 374 фармакологических эффектов, 176 из 2755 молекулярных механизмов, 7 из 50 токсических эффектов, 11 из 121 условий метаболизма при заданных по умолчанию точках отсечения $P_a > P_i$. Например, при прогнозировании такого эффекта, как ингибирование псевдолизина или системы омпитинов, когда значения вероятности наличия активности превышают значения вероятности отсутствия активности ($P_a > P_i$) свидетельствуют о том, что мишенями исследуемого химического вещества могут выступать соответствующие белки (Рисунок 2, 3). Необходимо, однако, отметить, что эти расчётные оценки требуют экспериментальной проверки [Vijaya P. et al., 2021; Shahzadi I. et al., 2021; Филимонов Д. А. и др., 2006; Филимонов, Д. А., 2014].

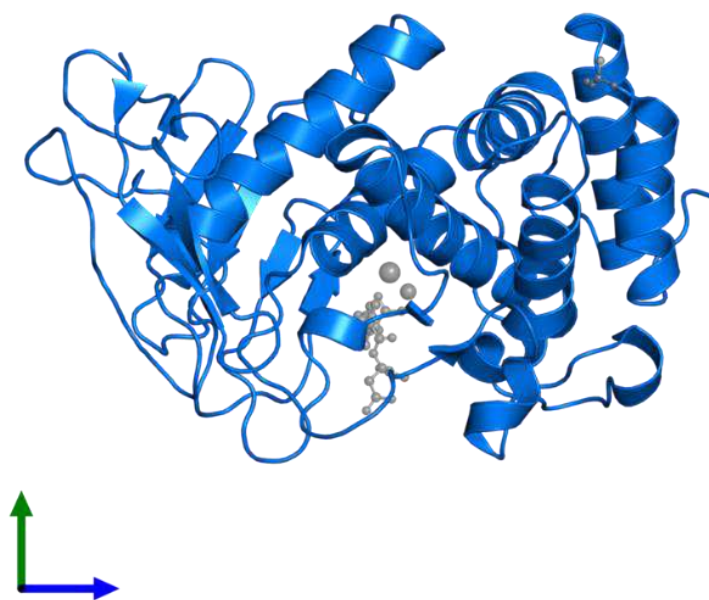


Рисунок 2 – Трёхмерная структура псевдолизина (эластаза В), разрешение 1,4 Å [Thayer, M. M. et al., 1992].

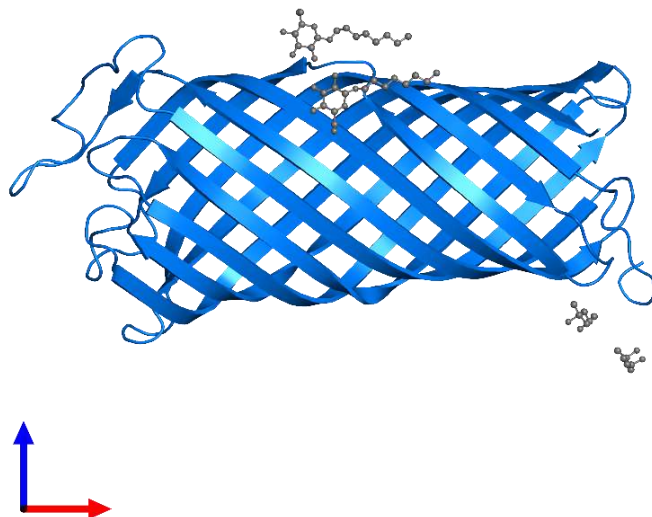


Рисунок 3 – Трёхмерная структура опптинов, разрешение 2,6 Å [Vandeputte-Rutten, L. et al., 2001].

Компьютерное проектирование лекарств поможет оптимизировать молекулы и отводы лекарств и ускорит процесс разработки лекарств [Vijaya P. et al., 2021; Shahzadi I. et al., 2021; Филимонов Д. А. и др., 2006; Филимонов, Д. А., 2014].

1.3 Общая характеристика алкалоидов – производных индола

Индол является универсальным фармакофором, привилегированным каркасом и выдающимся гетероциклическим соединением с широким спектром фармакологической активности благодаря различным механизмам действия. Активная часть молекулы действующего вещества участвует в построении многих белков: белковая аминокислота – триптофан, биогенные амины – триптамин, серотонин, стимулятор роста – гетероауксин, витамин – пирролохинолинхинон, алкалоиды индольного ряда и другие, а также синтетических лекарственных препаратов широкого спектра действия. В последние годы было проведено множество исследований, посвященных синтезу и анализу различных терапевтических перспектив этого компонента. Рассматривая отношение

структура-активность, были выявлены активные фармакофоры различных производных индола, отвечающих за противоопухолевую, противосудорожную, противомикробную, противотуберкулезную, противомаларийную, противовирусную, противодиабетическую и другие различные активности, которые были исследованы в последние пять лет [Тринеева О. В. и др., 2019; Ямашкин С. А. и др., 2020; Степаненко И. С. и др., 2021].

В растительных организмах триптофан превращается в стимулятор роста гетероауксин. 5-гидрокситриптофан (5-НТР), метаболит триптофана, был предложен в качестве препарата для лечения эпилепсии и депрессии [Вартанян Р. С., 2004].

Вне организма триптофан может быть синтезирован из индола. В промышленных масштабах, как незаменимую белковую аминокислоту, синтетический триптофан добавляют в комбикорма для животных.

Чтобы получить усвояемый для животных чистый L-триптофан, микробиологически используют штаммы дрожжей *Candida utilis*, а питательной средой в этом процессе выступает антраниловая кислота [Найда А. В. и др., 2018; Ветчинова Д. В. и др., 2018].

Серотонин, также известный как 5-гидрокситриптамин или 5-НТ, обнаруживается в основном в мозге, кишечнике и тромбоцитах. Его основное предназначение – передавать сообщения между нервными клетками. Также считается, что он активен в сокращении гладких мышц и способствует благополучию и счастью. В качестве предшественника мелатонина, серотонин участвует в регулировании циклов сна и бодрствования, а также внутренних часов организма.

Ему приписывают роль в регулировании аппетита, эмоций и моторных, когнитивных и вегетативных функций. Тем не менее, неизвестно, влияет ли серотонин напрямую на данные функции или же играет общую роль в координации нервной системы [Muller C. P. et al., 2020].

Триптамин (2-(1*H*-индол-3-ил)этанамин) представляет собой аминокислотиндол, состоящий из индола, имеющего 2-аминоэтильную группу в 3-

положении. Он играет роль человеческого метаболита, растительного метаболита и мышинового метаболита. Это аминоалкилиндол, индольный алкалоид. Триптамин является моноаминовым соединением, которое является общей молекулой-предшественником для многих гормонов и нейротрансмиттеров. Биосинтез обычно происходит из аминокислоты триптофана, а триптамин, в свою очередь, действует как предшественник других соединений. Замены в молекуле триптамина дают начало группе соединений, известных под общим названием триптамины. Наиболее известными триптаминами являются серотонин, важный нейротрансмиттер, и мелатонин, гормон, участвующий в регуляции цикла сна и бодрствования [URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tryptamine>].

Мелатонин (основной гормон эпифиза, регулятор циркадного ритма всех живых организмов) тормозит излишнее возбуждение ЦНС, обеспечивает засыпание и поддержание сна, активизирует иммунитет, уменьшает уровень системного артериального давления, снижает сахар и холестерин в крови, увеличивает концентрацию калия в организме [Slominski A. T. et al., 2017].

Гетероауксин (3-индолилуксусная кислота) – вещество группы ауксинов, фитогормон, стимулятор роста растений [Сафина, Г. Ф. и др., 2018]. Химическое вещество высокой физиологической активности, образующееся в растениях и влияющее на ростовые процессы, является одним из наиболее широко распространённых ауксинов.

Индометацин (1-(4-хлорбензоил)-5-метокси-2-метил-1*H*-индол-3-уксусная кислота) – синтетический нестероидный производный индола с противовоспалительной активностью и химиопрофилактическими свойствами. Как нестероидный противовоспалительный препарат (НПВП), индометацин ингибирует фермент циклооксигеназу, тем самым предотвращая опосредованное циклооксигеназой образование аддуктов ДНК гетероциклическими ароматическими аминами [Lucas S., 2016]. Оказывает противовоспалительное, обезболивающее и жаропонижающее действие.

Пиндолол (1-(1*H*-индол-4-илокси)-3-(пропан-2-иламино)пропан-2-ол) является неселективным блокатором бета-адренергических рецепторов, который

широко используется для терапии гипертонии и стенокардии [URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pindolol>].

Мексамин является производным триптамина, тесно связанным с нейротрансмиттерами серотонина и мелатонина. Было показано, что 5-метокситриптамин естественным образом встречается в организме на низких уровнях. Он биосинтезируется путем деацетилирования мелатонина в шишковидной железе [Shemer A. V. et al., 1991].

Псилоцин (3-[2-(диметиламино)этил]-1*H*-индол-4-ол) содержится в большинстве психоделических грибов вместе с фосфорилированным аналогом псилоцибином. Псилоцин является препаратом Списка I в соответствии с Конвенцией о психотропных веществах. Изменяющие сознание эффекты псилоцина сильно варьируются и субъективны, но напоминают эффекты, вызванные ЛСД и мескалином [URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4980>].

Существуют полициклические системы с индольным фрагментом в молекулах. Пиразидол (пирлиндол) – препарат классифицируется как обратимый ингибитор фермента моноаминоксидазы типа А (также известный как препарат RIMA). Он был разработан и в настоящее время используется в России в качестве антидепрессанта [Майбурова А. С. и др., 2018].

Резерпин ингибирует образование биопленок *S.aureus* и ингибирует метаболическую активность бактерий, присутствующих в биопленках [Parai D. et al., 2019].

Винкристин является химиотерапевтическим препаратом, используемым для лечения ряда видов рака. Такие как острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, болезнь Ходжкина, нейробластома и мелкоклеточный рак легких [World Health Organization, 2010].

Из лизергиновой кислоты получают диэтиламид лизергиновой кислоты, который является мощным серотонинергическим галлюциногеном или психоделиком, который моделирует изменённое состояние сознания [Carhart-Harris R. L. et al., 2016].

Согласно проведенному обзору литературы существуют биологически активные соединения, молекулы которых построены с участием бензольного кольца индола (Рисунок 4). Такими соединениями являются *N*-[индолил]трифторацетилацетамиды [Тринеева О. В. и др., 2019; Ямашкин С. А. и др., 2020; Степаненко И. С. и др., 2021].

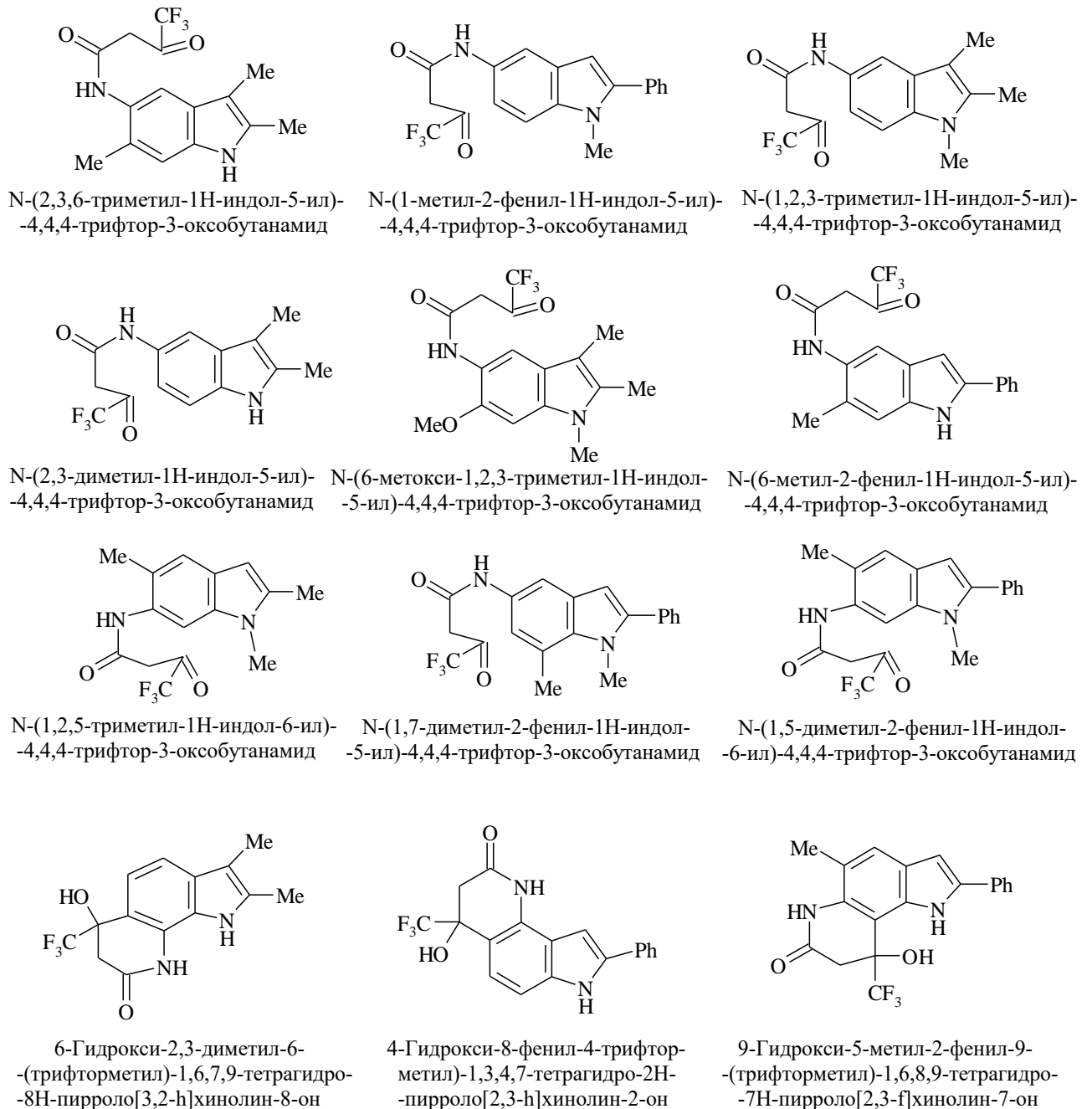
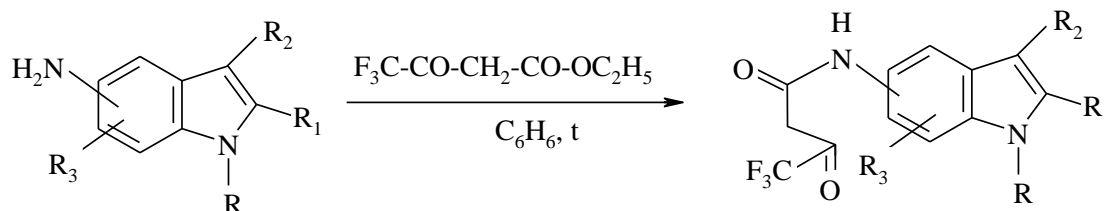


Рисунок 4 – Молекулярные структуры некоторых *N*-[индолил]трифторацетилацетамидов

Для синтеза таких соединений в качестве исходных используют замещенные 4-,5-,6-,7-аминоиндолы [Степаненко И. С. и др., 2018; Ямашкин С. А. и др., 2019].

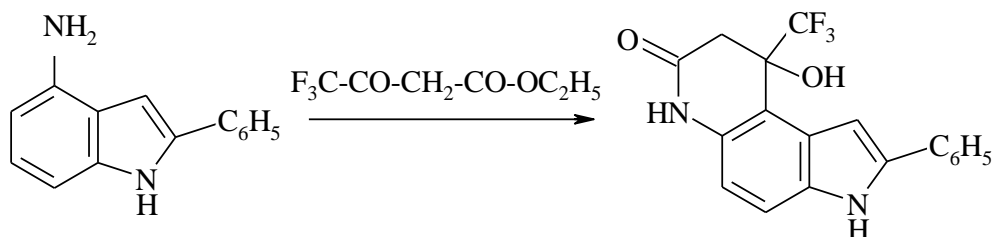
Синтез *N*-[индолил]трифторацетилацетамидов осуществляют по ниже приведенной схеме.



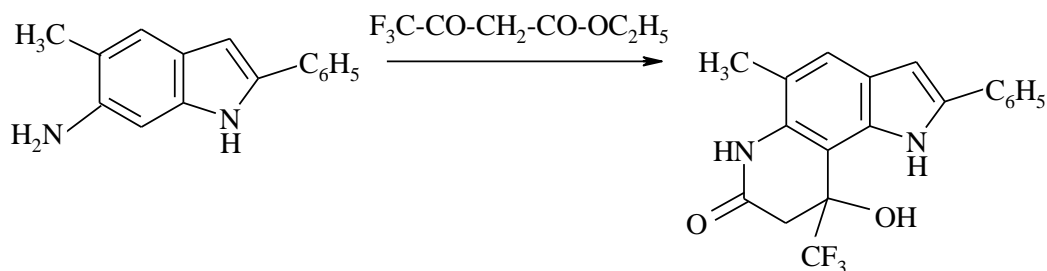
$R=H,CH_3$; $R_1=CH_3,C_6H_5$; $R_2=H,CH_3$; $R_3=H,CH_3,OCH_3$; 4- $NH_2(NH)$,5- $NH_2(NH)$,6- $NH_2(NH)$,7- $NH_2(NH)$

Некоторые аминокислоты при взаимодействии с трифторацетоуксусным эфиром образуют циклические амиды, что означает, что в процессе реакции аминогруппа взаимодействует с этоксикарбонильной функцией, а также образуется конденсированное неароматическое кольцо.

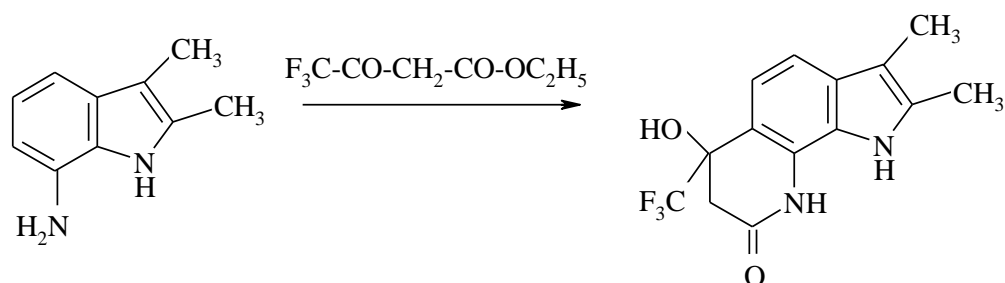
Примером такой реакции является образование циклического амида 2-фенил-4-аминоиндола при реакции с трифторацетоуксусным эфиром:



То же самое происходит с 5-метил-2-фенил-6-аминоиндолом, образующим циклический амид в тех же условиях.



Аналогично реагирует 2,3-диметил-7-аминоиндол, образуя циклический амид при взаимодействии с трифторацетоуксусным эфиром.



Все эти N-[индол-4-,5-,6-,7-ил]трифторацетилацетамиды, подвергнутые биоскринингу, проявляют антимикробную активность против грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, которые являются возбудителями различных инфекционных заболеваний человека. Данный эффект сравним с известным противомикробным препаратом – диоксидином (2,2-бис-[гидрокси-метил]хиноксалин-1,4-ди-N-оксид) [Степаненко И.С. и др., 2018].



По результатам исследований, направленных на изучение связи между активностью и характером замещения в индольном фрагменте и местом расположения амидной группировки, было выявлено, что наиболее высокую противомикробную активность обнаруживают N-[индол-4-,6-,7-ил]амиды, особенно те, которые образуют циклическую структуру [Степаненко И. С. и соавт., 2018; Ямашкин С. А. и др., 2019; Ямашкин С. А. и др., 2020; Степаненко И. С. и др., 2021].

Также были обнаружены соединения с различной биологической активностью, в молекулах которых дополнительное пиридиновое кольцо смежно с бензольным фрагментом индольного бицикла. Эти соединения известны как пирролохинолины.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Исследуемые микроорганизмы

Исследование антибактериальной активности новых растворимых в воде соединений с содержанием хлорметила в индольном ряду включало использование как грамотрицательных, так и грамположительных микроорганизмов, содержащих эталонные штаммы из музейных коллекций и клинические образцы из лечебных учреждений.

В работе использовались музейные штаммы бактерий:

P.aeruginosa ATCC 27853 (ФГУН «ГИСК им. Л. А. Тарасевича») впервые был выделен из образца крови в больнице в 1971 году. Широко используется в качестве модельного штамма для контроля питательных сред, изучения чувствительности к антибиотикам, развития биопленок и метаболической активности *Pseudomonas spp.* Он встречается в почве, воде, кожной флоре и в большинстве искусственных сред по всему миру. Это бактерия тонкой палочковидной формы (1,5–3×0,5 мкм), подвижная, имеет полярный жгутик, в окраске по Граму – грамотрицательная.

S.aureus 6538-P (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России) был обнаружен умеренно устойчивым к пенициллину в 1944 году с использованием диска Penicillin P2. Штамм используется для контроля питательных сред, изучения чувствительности к антибиотикам. Это неподвижные, грамположительные, неспорообразующие кокки, сложенные в форме гроздей винограда, коротких цепочек; располагаются парами и поодиночке. Среди особенностей штамма стоит отметить выработку пигмента желтого-оранжевого цвета, α -гемолизина, коагулазы, ДНК-азы, лецитиназы.

E.coli ATCC 25922 был приобретен в ФБУН «ГНЦ ПМБ» («ГКПМ – Оболенск»). Штамм ATCC 25922 является контрольным штаммом CLSI для

тестирования чувствительности к противомикробным препаратам, контроля качества питательных сред. Первоначально был выделен из клинического образца человека, собранного в Сиэтле в 1946 году. Этот штамм не производит веротоксин и используется в качестве отрицательного контроля продукции термолабильного токсина (LT). Бактерии представляют собой небольшие (2,5-3×0,5-0,8 мкм) подвижные полиморфные палочки с закругленными концами.

S.aureus MRSA ATCC 43300 (Becton Dickinson France S.A.A.) устойчив к метициллину и оксациллину. Штамм используется при тестировании чувствительности к антибиотикам, оценке качества агара Мюллера-Хинтона, в исследовании и разработке новых лекарств.

S.pyogenes ATCC 19615 (Becton Dickinson France S.A.A.) впервые был выделен из глотки ребенка после жалоб на боли в горле. Неподвижный бета-гемолитический клинический изолят ATCC 19615 используется для контроля качества в различных коммерчески доступных тестах. Бактерия вызывает инфекции мягких тканей, синдром токсического шока и пневмонию.

Salmonella typhimurium TA100 и *Salmonella typhimurium* TA98 предоставлены из коллекции микроорганизмов кафедры генетики ФГБОУ ВО «МГУ им. М. В. Ломоносова».

Для проведения исследования были использованы изоляты более 150 микроорганизмов, полученные от пациентов с различными неспецифическими заболеваниями органов дыхания, мочевыводящих путей и кишечника. Исследуемые штаммы микроорганизмов были предоставлены микробиологическими лабораториями ГБУЗ РМ «Республиканская инфекционная клиническая больница» и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Мордовия», Саранск. Важно отметить, что названия этих штаммов не содержат персональных данных пациентов, таких как фамилия, имя, этническая принадлежность, возраст, религия, гендерная идентичность и прочее.

Из рода *Streptococcus* были исследованы 19 штаммов *S.pyogenes* и 20 штаммов *S.pneumoniae*. В качестве материала, из которого были выделены микроорганизмы, использовалась слизь из носа, зева, носоглотки, моча, мокрота,

секционный материал, фекалии.

Представители рода *Staphylococcus* (*S.aureus* (n=52)) были получены из слизи зева, носа, носоглотки, моча, фекалии, раневое отделяемое, а также секционный материал.

Из рода *Pseudomonas* было выделено 27 штаммов *P.aeruginosa*. Материалом для выделения возбудителя была слизь из зева, носа, носоглотки, моча, фекалии и секционный материал.

E.coli было культивировано 38 штаммов. В качестве материала, из которого были выделены микроорганизмы, использовалась слизь из носа, зева, носоглотки, моча, мокрота, секционный материал, фекалии.

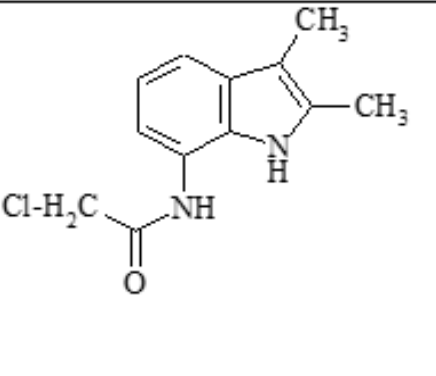
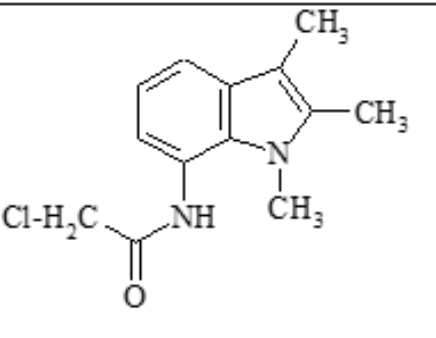
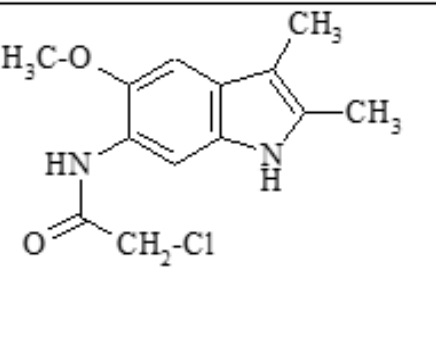
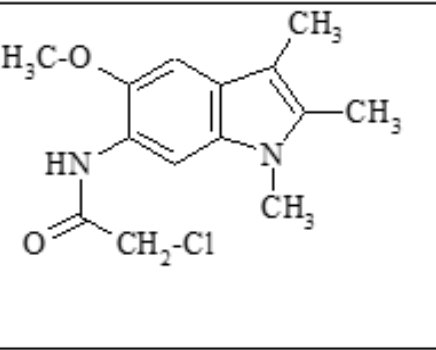
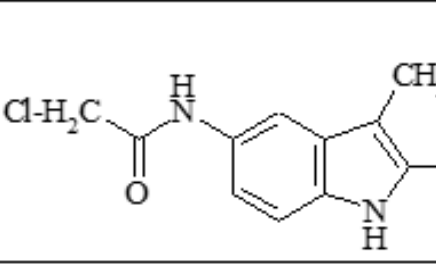
Верификацию опытных штаммов микроорганизмов осуществляли бактериологическими методами по классической методике [Приказ МЗ СССР №535 от 22.04.1985г.]. Конечную идентификацию микроорганизмов и определение их чувствительности к традиционным антимикробным препаратам выполняли с использованием автоматической бактериальной системы «Sensititre» (UK).

2.2 Исследуемые соединения

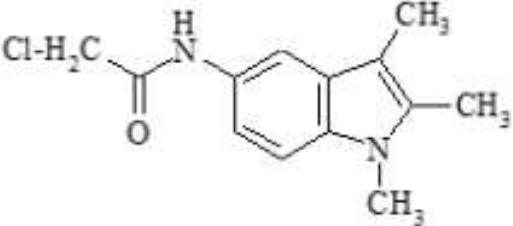
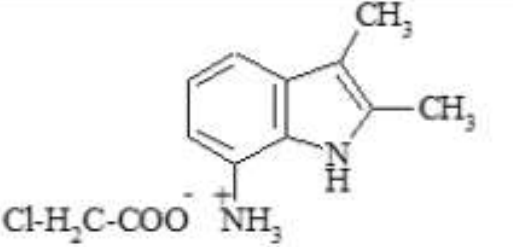
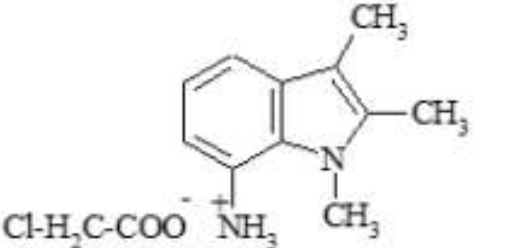
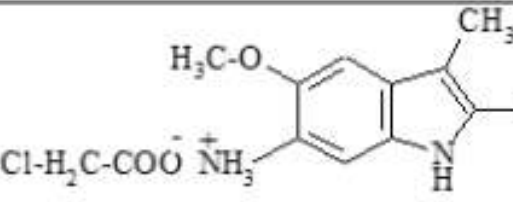
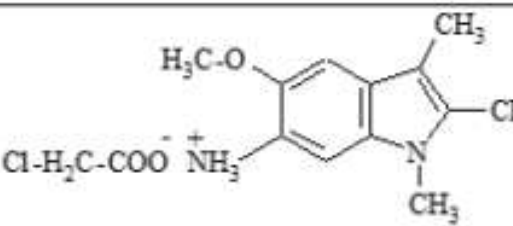
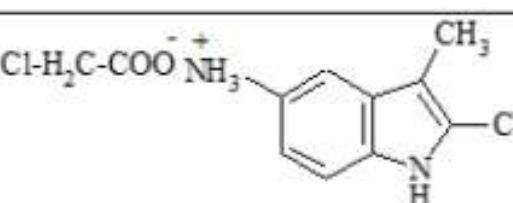
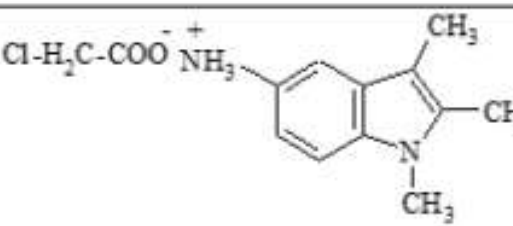
Исследуемые соединения были спроектированы и синтезированы на кафедре химии, технологии и методики обучения в ФГБОУ ВО «МГПИ им. М.Е. Евсевьева» в г. Саранск. Они были предоставлены для исследования доктором химических наук, профессором С. А. Ямашкиным. Структура и уникальность новых соединений были подтверждены с помощью современных методов спектрального и физико-химического анализа, таких как инфракрасная спектроскопия (ИК), масс-спектрометрия, УФ-спектроскопия, ЯМР ¹H-спектроскопия, тонкослойная хроматография и элементный анализ.

Наименования исследуемых соединений были присвоены с помощью программы ACDLABS IUPAC Name Generator, а структурные формулы соединений были нарисованы с использованием программы ISIS Draw 2.4 (Таблица 1).

Таблица 1. Молекулярные структуры исследуемых производных 5-,6-,7-аминоиндолов

Структурная формула	Название, лабораторный шифр
	2-хлор- <i>N</i> -(2,3-диметил-1 <i>H</i> -индол-7-ил)ацетамид [Т-1]
	2-хлор- <i>N</i> -(1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индол-7-ил)ацетамид [Т-2]
	2-хлор- <i>N</i> -(5-метокси-2,3-диметил-1 <i>H</i> -индол-6-ил)ацетамид [Т-4]
	2-хлор- <i>N</i> -(5-метокси-1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индолил-6-ил)ацетамид [Т-5]
	2-хлор- <i>N</i> -(2,3-диметил-1 <i>H</i> -индол-5-ил)ацетамид [Т-6]

Продолжение Таблицы 1

Структурная формула	Название, лабораторный шифр
	2-хлор- <i>N</i> -(1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индол-5-ил)ацетамид [Т-7]
	Монохлорацетат-2,3-диметил-1 <i>H</i> -индол-7-аммония [Т-12]
	Монохлорацетат 1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индол-7-аммония [Т-13]
	Монохлорацетат 2,3-диметил-5-метокси-1 <i>H</i> -индол-6-аммония [Т-8]
	Монохлорацетат 5-метокси-1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индол-6-аммония [Т-9]
	Монохлорацетат 2,3-диметил-1 <i>H</i> -индол-5-аммония [Т-10]
	Монохлорацетат 1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индол-5-аммония [Т-11]

В работе применялись противомикробные вещества как препараты сравнения: антисептические средства бензалкония хлорид, хлоргексидина биглюконат; антибиотики диоксидин, фосфомицин, нитрофурантоин; ампициллин, цефазолин, азитромицин, линкомицин, ципрофлоксацин и фторсодержащие производные замещенных 4-, 6-, 7-аминоиндолов, с доказанным противомикробным действием, исследованные ранее [Степаненко И. С. и др., 2019].

Бензалкония хлорид – биоцидный препарат, широко используемый в дезинфицирующих растворах. Дезинфицирующие средства широко применяются на всех этапах обработки пищевых продуктов, посуды, приборов, а также в домашних хозяйствах, птицеводстве, животноводстве и производстве фармацевтических препаратов. Их основная цель – эффективное уничтожение патогенных микроорганизмов на поверхностях. Бензалконий хлорид принадлежит к классу четвертичных аммониевых биоцидов, известных своими двойными биоцидными и моющими свойствами. Этот биоцид обеспечивает высокую эффективность благодаря взаимодействию катионных поверхностно-активных веществ с клеточными и внутриклеточными мембранами, а также участием в различных биохимических процессах, связанных с ними. Они играют важную роль в клеточной адгезии, передаче сигналов клеткам, а также контроле проницаемости для ионов и питательных органических молекул. Это обеспечивает выживание клеток и их способность эффективно взаимодействовать с окружающей средой. Благодаря этим механизмам, бензалконий хлорид обладает высокой активностью против бактерий, водорослей, грибков и вирусов в оболочке, и при этом для достижения желаемых результатов требуются низкие концентрации [Kim M. et al., 2018]. Для препарата сравнения бензалкония хлорид МПК относительно штаммов *Pseudomonas* spp. имеют значения в диапазоне 50.0-200.0 мг/л, *Klebsiella michiganensis* 15.6-62.5 мг/л [Петров С. Ю. и др., 2013].

Хлоргексидина биглюконат, р-р д/местного и наружного применения, 0.05%. (ОАО «САМАРАМЕДПРОМ»). Этот препарат является формой глюконатной соли хлоргексидина, который является бигуанидным соединением и применяется в качестве антисептика с местной антибактериальной активностью. Хлоргексидина

биглюконат обладает положительным зарядом и взаимодействует с отрицательно заряженной поверхностью микробной клетки, что приводит к нарушению целостности её мембраны. При проникновении внутрь клетки хлоргексидина биглюконат вызывает выход внутриклеточных компонентов, что в итоге приводит к гибели клетки. Для препарата сравнения хлоргексидина биглюконата МПК относительно штаммов *Staphylococcus* spp. составляет 4.0-10.0 мг/л, *Pseudomonas* spp. 80.0-150.0 мг/л, *E.coli* 20.0-250.0 мг/л, *Streptococcus* spp. 1.0-100.0 мг/л [Щетинин Е. В. и др., 2014; Квашнина Д. В. и др., 2016].

Нитрофурантоин – противомикробный препарат широкого спектра действия, хотя и обладает малой активностью в отношении видов *Pseudomonas*, но применяется местно при ожогах, язвах, ранах и кожных инфекциях. Он является антибактериальным препаратом, эффективным против грамотрицательных и грамположительных бактерий. Для препарата сравнения нитрофурантоин МПК относительно штаммов *Staphylococcus* spp. составляет 7.9-62.5 мг/л, *Streptococcus* spp. 3.9-15.8 мг/л, *E.coli* 3.9-15.8 мг/л [Страчунский Л. С. и др., 2007; КР МАКМАХ, 2021].

Диоксидин – отечественный синтетический препарат широкого спектра действия, производное ди-*N*-оксихиноксалина. Механизм антибактериального действия диоксидаина связан с повреждением бактериальных клеток за счет активации свободнорадикальных механизмов, которые влекут за собой необратимые изменения структуры нуклеотида. Для препарата сравнения диоксидаина МПК относительно штаммов *Staphylococcus* spp. составляет 8.0-1024.0 мг/л, *Pseudomonas* spp. 4.0-1024.0 мг/л, *E.coli* 2.0–64.0 мг/л, *Streptococcus* spp. 64.0-1024.0 мг/л [Падейская Е. Н., 2011; Попов Д. А. и др., 2013].

Фосфомицин – антибиотик широкого спектра действия, открытый в Испании в 1969 году. Он обладает бактерицидной активностью против широкого спектра бактерий, включая грамотрицательные микроорганизмы и некоторые грамположительные бактерии, такие как стафилококки. Первоначально фосфомицин вводили парентерально и только пациентам с тяжелыми инфекциями. Сегодня он часто выпускается как фосфомицина трометамол, пероральная

формула, рекомендованная для лечения инфекций мочевыводящих путей. Фосфомицина трометамол в разовой дозе показан для лечения женщин с неосложненными инфекциями мочевыводящих путей. Для препарата сравнения фосфомицина МПК относительно штаммов *Staphylococcus* spp. составляет 0.98-31.25 мг/л, *Streptococcus* spp. 1.96-250.0 мг/л, *E.coli* 0.98-1.96 мг/л, *Pseudomonas* spp. 1.96-7.9 мг/л [Астахова А. В. и др., 2014; Raz R., 2018; КР МАКМАХ, 2021].

Ампициллин (порошок для приготовления раствора для в/м и в/в введения ОАО «Синтез») [Астахова А. В. и др., 2014; Страчунский Л.С. и др., 2007].

Цефазолин (порошок для приготовления раствора для в/м и в/в введения ОАО «Синтез») [Астахова А. В. и др., 2014; Страчунский Л.С. и др., 2007].

Азитромицин (порошок для приготовления суспензии для приема внутрь АО «АВВА РУС») [Астахова А. В. и др., 2014; Страчунский Л.С. и др., 2007].

Линкомицин (раствор для в/в и в/м введения ОАО «Дальхимфарм») [Страчунский Л.С. и др., 2007].

В качестве растворителя использовали препарат «Димексид» (производство ОАО «Марбиофарм, концентрат для приготовления растворов для наружного применения) и стерильную дистиллированную воду.

2.3 Методы культивирования и хранения микроорганизмов

В исследовании использовали следующие питательные среды: бульон LB по Lennox; мясопептонный бульон (МПБ) ЗАО «НИЦФ»; мясопептонный агар (МПА) ЗАО «НИЦФ»; среда Эндо (коммерческая) ФС 42-350498 ЗАО «НИЦФ»; среда Эндо (M029R) HiMedia Laboratories Pvt.Limited; основа колумбийского кровяного агара (M144) HiMedia Laboratories Pvt.Limited; агар Мюллера-Хинтона (M173) HiMedia Laboratories Pvt.Limited; бульон Мюллера-Хинтона (M391) HiMedia Laboratories Pvt.Limited; висмут-сульфит-агар ЗАО «НИЦФ».

Бактерии хранили под вазелиновым маслом в полужидком агаре при 4-8°C. Для этого метода применяли минеральное стерильное масло медицинского назначения (вазелиновое масло с удельной плотностью 0.865–0.890 г/см³), которое

стерилизовали в сушильном шкафу при температуре 170 °С в течение 1-2 ч [Кривушина А. А. и др., 2019; Vaid R. K. et al., 2018; МУ 2.1.4.1057-01]. Микробные культуры выращивали в пробирках с столбиками агаризованной среды. Затем в пробирки с выросшими микроорганизмами в стерильных условиях наливали слой вазелинового масла высотой не менее 2 см.

Слой масла защищал микробные культуры от высыхания, в тоже время снижая их метаболическую активность. Покрытые маслом культуры держали в вертикальном положении в холодильнике. Для проверки целостности культур периодически проверяли их жизнеспособность. 1-2 раза в год культуры пересевали на свежеприготовленную среду. Для этого применяли инокуляционные иглы и петли. При обжиге иглы (петли) следует осторожно пользоваться ей, чтобы брызги масла не попали на окружающие предметы. Перед проведением исследования осуществляли перенос в соответствующую питательную среду и выращивали в течение ночи при 37 °С. Свежую колонию использовали для получения рабочей суспензии в растворе 0.9% NaCl с оптической плотностью равной 0.5 стандарта мутности по Мак-Фарланду (что соответствует примерно 10^8 КОЕ/мл).

2.4 Прогнозирование спектров активности веществ (PASS)

Для мониторинга наличия (Pa) или отсутствия (Pi) активности применялась компьютерная программа прогнозирования биологической активности веществ PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), основанная на прогнозе 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). В своей работе мы использовали версию 9.1, зарегистрированную в 2007 году. Внеэкспериментальное исследование было проведено совместно с сотрудниками лаборатории «Сектор прогнозирования и контроля качества научных исследований отдела химии, технологии синтетических лекарственных средств и аналитического контроля», АО «ВНЦ БАВ».

Инструмент интерпретирует биологические активные спектры, используя 2D-структуру молекул. Структура молекулы может быть нарисована с использованием ACD/ChemSketch, версия 12. Структура молекулы может быть сохранена в документе ChemSketch 2.0 (* .SK2) или MDL Mol files (* .mol) либо напрямую загружаться на веб-сайт PASS для прогнозирования спектров биологической активности молекулы. Структуру также можно нарисовать непосредственно на веб-сайте прогнозирования PASS с помощью апплета JAVA, который использует программу 2D-рисования химических эскизов (MarvinSketch) [Vijaya P. et al., 2021; Shahzadi I. et al., 2021].

Инструмент прогнозирования PASS прогнозирует соотношение Pa:Pi (активный:неактивный) при пороге прогнозирования, равном Pa > 30%, Pa > 50% и Pa > 70%. Средняя точность прогноза составляет около 95% в соответствии с оценкой перекрестной проверки исключения по одному (Leave-One-Out). Точность прогноза PASS зависит от исчерпывающей информации о спектре биологической активности для каждого соединения, доступной в обучающем наборе PASS. Для последующего исследования *in vitro* избирались соединения с вероятностью наличия противомикробной активности в спектре более 50%, т.е. Pa более 0.500 вне зависимости от вероятности и прогнозной степени токсичности.

2.5 Анализ антимикробного потенциала исследуемых соединений

Изучение антибактериального потенциала новых водорастворимых хлорсодержащих соединений производных аминокислотного ряда проводили с использованием грамотрицательных и грамположительных музейных (эталонных) культур микроорганизмов, а также лабораторных штаммов, полученных от больных. Для измерения антимикробной активности тестируемых соединений использовали два метода: метод серийных разведений в бульоне (макротетодом «пробирочным») и диско-диффузионный метод (ДДМ) [Приказ МЗ СССР №535 от 22.04.1985г.; СП 1.2.036-95; Миронов А. Н. и др., 2012; Козлов Р. С. и др., 2018]. Антибактериальную активность рассматриваемых соединений исследовали в

диапазоне концентраций от 0.98 до 250.0 мг/л.

2.5.1 Метод серийных разведений

Была использована модификация метода серийных разведений для определения МПК и интерпретировано в соответствии с критериями EUCAST (Версия 13.0, действует с 01.01.2023). Рабочий раствор разводили в различных концентрациях 250.0; 125.0; 62.5; 31.3; 15.7; 7.9; 3.9; 1.96 и 0.98 мг/л в стерильном питательном бульоне Мюллер-Хинтон (МХБ) в пробирках. Используя стандартную нихромовую петлю объемом 0.8 мм³, брали культуру бактерии инокулировали в пробирки с стерильным физиологическим раствором и доводили до стандарта мутности равной 0.5 по Мак-Фарланду [Leclercq R. et al., 2013; МУК 4.2.1890-04].

Опыт проводили в микроцентрифужных пробирках объемом 1.5 мл. Итоговый объем составил 1 мл каждого разведения рассматриваемого соединения с конечной концентрацией микроорганизма примерно 5×10^5 КОЕ/мл.

Навески опытного вещества взвешивали на аналитических весах РА 114С (Ohaus) с дискретностью 0.0001 и I классом точности. Концентрация основных растворов исследуемых веществ составляла 1.0 мг/мл. Базовые растворы готовили с учетом их активности. С помощью основных растворов были приготовлены рабочие смеси. Из рабочих растворов готовили двукратные разведения опытных веществ. Конечная концентрация опытного соединения в питательной среде была равной 250.0 мг/л и бралась при подсчетах за основу.

С помощью автоматического дозатора с одноразовыми наконечниками раскапали 500.0 мкл бульона Мюллер-Хинтона по микропробиркам. Всего пробирок было десять штук. Последняя являлась контролем. Затем был приготовлен необходимый ряд разведений. Рабочий раствор в количестве 500.0 мкл добавляли в первую пробирку, уже содержащую 500.0 мкл бульона. Аккуратно перемешивали и новым наконечником переносили 500.0 мкл раствора во вторую пробирку, имевшую первоначально 500.0 мкл бульона. Это повторяли до тех пор,

пока не был готов весь ряд необходимых разведений. Из последней пробирки 500.0 мкл бульона удаляли в контейнер для сброса отходов. Затем добавляли 500.0 мкл взвеси исследуемого микроорганизма с МХБ в каждую пробирку. Пробирки инкубировали при 37 °С в течение 20 ч и затем наблюдали на предмет роста или мутности. «Отрицательный» контроль инкубировали в холодильнике при 4 °С также 20 ч. Для определения минимальной бактерицидной концентрации (МБК) петлю бульона из каждой пробирки, не проявляющего роста, инокулировали в чашку с питательным агаром. После этого равные объемы стерильного питательного бульона добавляли в пробирки и инкубировали дополнительно в течение 24 ч при 37 °С. Затем пробирки и чашки с агаром исследовали на предмет роста или помутнения невооруженным глазом [CLSI, 2020]. Эксперименты были проведены в трёх повторностях.

2.5.2 Диско-диффузионный метод (ДДМ)

Для определения чувствительности микроорганизмов к противомикробным соединениям с помощью ДДМ использовали бумажные диски (MUNKTELL). С помощью автоматического дозатора с одноразовыми наконечниками диски пропитывали исследуемым соединением. Диски, пропитанные дистиллированной водой, использовали в качестве контроля.

Используя стандартную нихромовую петлю объемом 0.8 мм³, брали культуру бактерии инокулировали в пробирки с стерильным физиологическим раствором и доводили до стандарта мутности равной 0.5 по Мак-Фарланду. В итоге в каждой пробирке содержалось примерно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл микроорганизмов [Matuschek E. et al., 2014].

Засев чашек Петри с питательной средой осуществляли с помощью стерильных зонд тампонов промышленного производства (полистирол + вискоза, производства Deltalab в индивидуальной бумажно-пластиковой упаковке). Тампон погружали в приготовленную микробную взвесь, затем излишки инокулюма удаляли, отжав тампон о стенки пробирки. Штриховыми движениями в трёх

направлениях, поворачивая чашку Петри на 60° проводили посев. Определение зоны задержки роста осуществляли с помощью линейки-лекало (HiMedia Laboratories Pvt.Limited).

Оценка противомикробного потенциала исследуемых соединений в ДДМ определялась в крестах по нижеуказанной схеме:

- «+++» 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 [МУК 4.2.1890-04].

2.6 Оценка воздействия исследуемых соединений на клеточную стенку прокариот

Краситель кристаллический фиолетовый (CV) является ионным основным красителем и применяется в методах простого и дифференциального окрашивания прокариотических клеток. CV действует на отрицательно заряженные группы, которые находятся на клеточной поверхности бактерий. Способность клеточной стенки бактерий удерживать кристаллический фиолетовый была использована для изучения проницаемости клеточной стенки [Devi K. P. et al., 2010].

Изменение проницаемости клеточной стенки было обнаружено с помощью методики окрашивания кристаллическим фиолетовым [Зелди М.И., 2019]. Для приготовления суспензий бактериальных клеток использовали бульон LB по Lennox. Клетки подвергались центрифугированию при 4500 об/мин в течение 5 минут при 4 °С. После этого дважды промывали и ресуспендировали в фосфатно-буферном растворе с значением pH=7,4. Исследуемые соединения добавляли в концентрациях от 1.96 до 500.0 мг/л к суспензии клеток, которая затем инкубировалась при 37 °С в течение 30 минут. В качестве контрольных образцов готовили пробирки аналогичным образом без обработки. В эксперименте также

использовался 1% раствор поверхностно-активного Твина 20 в качестве препарата сравнения.

Далее, клетки собирались путем центрифугирования при 9300 об/мин в течение 5 минут. После этого клетки ресуспендировали в фосфатно-буферном растворе, содержащем 10.0 мг/л кристаллического фиолетового. Суспензия клеток инкубировали в течение 10 минут при 37 °С. Затем взвесь центрифугировали при 13400 об/мин в течение 15 минут. Оптическая плотность супернатанта измерялась на фотометре «Эксперт 003» при длине волны 590 нм.

Величина оптической плотности раствора кристаллического фиолетового, который первоначально использовался в анализе, была принята за 100%. Процент поглощения кристаллического фиолетового во всех образцах рассчитывали по следующей формуле [1]:

$$CV = \frac{\text{Значение оптической плотности образца}}{\text{Значение оптической плотности раствора кристаллического фиолетового}} \times 100\% \quad [1]$$

2.7 Оценка морфоструктурных повреждений бактериальных клеток под воздействием исследуемых соединений

В данном разделе использованы материалы статьи автора диссертации [Масейкина А.А. и др., 2023]. Для исследования структурных изменений в бактериальных клетках, вызванных изучаемыми соединениями, применялся метод сканирующей электронной микроскопии. Целостность клеточной структуры играет важную роль в жизнедеятельности бактерий. Клеточная стенка и мембраны грамположительных и грамотрицательных бактерий выполняют функцию физического, осмотического и метаболического барьера между внутренним содержимым бактериальной клетки и окружающей средой.

Необходимо отметить, что целостность мембраны играет ключевую роль в обеспечении всех этих функций [Сазыкин Ю. О. и др., 1991]. Нарушение целостности мембраны может привести к метаболическим нарушениям и гибели клеток, а также способно вызвать образование пор. Наблюдение за изменениями в клеточной структуре бактерий с помощью СЭМ может помочь более детально

понять механизмы гибели клеток, позволяя лучше исследовать этот процесс [Greenwood D. et al., 1972; Hartmann M. et al., 2010].

В ходе исследования использовались опытные штаммы *P.auruginosa*, *S.aureus* и *E.coli* из рабочей коллекции, которые выращивались в течение ночи в бульоне LB. Далее, суспензии клеток центрифугировали при скорости 5000 об/мин в течение 10 минут, а осадок тщательно промывали стерильным фосфатным буфером. Примерно 2×10^8 микробных клеток каждого опытного штамма переносили в пробирку типа Эппендорф объемом 1.5 мл и инкубировали с исследуемыми соединениями заданной концентрации (500.0 мг/л) в течение часа. Концентрацию микробных клеток определяли по оптической плотности.

После инкубации, клетки повторно промывали фосфатным буфером и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 минут. Затем производили фиксацию в 2,5% растворе глутарового альдегида в течение 15 минут. После фиксации клетки снова промывали фосфатным буфером и последовательно обезвоживали, погружая в растворы этанола с возрастающей концентрацией (30, 50, 70, 90 и 96%). Каждый этап промывки и обезвоживания длился 10 минут. Затем клетки обезвоживали в чистом ацетоне (99,8%).

Для получения готовых образцов бактерий, которые подлежали дальнейшему анализу, были высушены в критической точке с использованием установки Leica CPD 300, после чего поверхность образцов была покрыта слоем золота с помощью Quorum 150 RESplus. Исследования морфоструктурных изменений проводились на сканирующем электронном микроскопе Tescan Mira 3 [Marcellini L. et al., 2010].

2.8 Оценка типа противомикробного действия исследуемых соединений

Для оценки типа противомикробного действия исследуемых соединений был использован метод короткой экспозиции в физиологическом растворе при комнатной температуре. В начале, стандартной нихромовой петлей объемом 0.8 мм³, мы инокулировали культуры бактерий в пробирки с 1.0 мл стерильного

физиологического раствора, доводя концентрацию до стандарта мутности, равной 0.5 по Мак-Фарланду. Затем, в другие пробирки, содержащие взвеси бактерий, добавляли растворы исследуемых соединений различной концентрации в физиологическом растворе. В качестве контроля использовали пробирки с микробной взвесью, в которые не добавляли исследуемые соединения.

В ходе эксперимента фиксировали время и, спустя пять, десять, пятнадцать, тридцать минут, один, два и четыре часа, производили высевы в пробирки с 1 мл бульона Мюллер-Хинтона. После этого, инкубировали при 37 °С и наблюдали в течение 5 суток. Визуально определяли наличие роста микроорганизмов в пробирках при проходящем свете. Если рост был замечен практически сразу, это указывало на отсутствие бактерицидной активности исследуемых соединений. Если рост все же происходил, но замедленно, то говорили о бактериостатическом типе действия соединения [Першин Г. Н. и др., 1971]. В процессе работы возникла необходимость доработать методику. В дополнение рост микроорганизмов регистрировали по изменению оптической плотности культуральной жидкости с помощью фотометра «Эксперт 003». Испытания проводили в стерильных кюветах объемом 1.0 мл при длине волны 600 нм. Зависимость оптической плотности тестируемого соединения с микробной культурой обнуляли в соответствии с оптической плотностью тестируемого вещества. Значение оптической плотности в кювете, содержащей микроорганизмы с тестируемыми соединениями, сравнивали с оптической плотностью в кювете, содержащей микроорганизмы без исследуемых соединений [Миронов А. Н. и др., 2012].

Помимо описанной выше методики использовали другой способ для определения антимикробного действия (бактериостатического или бактерицидного). Он основан на вычислении коэффициента оптической плотности культуральной среды в процессе культивирования микроорганизмов с антимикробными соединениями в жидкой питательной среде [Степаненко И. С. и соавт., 2018; Степаненко И. С. и др., 2019].

Для этого использовали МПК штаммов бактерий в объеме 1 мл и увеличивали МПК исследуемого соединения в два, три, четыре и шесть раз.

Измерение оптической плотности культуральной среды производилось в присутствии штамма бактерий, культивируемого при МПК, а также в культуральной среде с исследуемым микроорганизмом при культивировании без исследуемого соединения. Для этого мы вливали культуральную жидкость в объеме 1 мл в стерильные кюветы и определяли оптическую плотность с помощью фотометра «Эксперт-003» при использовании длины волны 600 нм. Коэффициент оптической плотности культуральной среды вычисляли по формуле [2]:

$$K_D = \frac{D_1 + D_2 + D_3 + \dots + D_n}{n} \times 100, \quad [2],$$

где K_D – коэффициент оптической плотности культуральной среды,

D – оптическая плотность культуральной жидкости при культивировании микроорганизмов в присутствии различных концентраций противомикробного соединения,

n – количество исследованных концентраций соединения.

Значение коэффициента K_D более 1 указывает на то, что исследуемое соединение обладает бактериостатическим действием в отношении исследуемого микроорганизма, а если K_D менее 1, то исследуемое соединение обладает бактерицидным действием в отношении исследуемого микроорганизма [Степаненко И. С. и др., 2019].

Исследуемые соединения применялись в виде раствора, используя «Димексид» в качестве растворителя.

В качестве препаратов для сравнения были использованы традиционные антибиотики: линкомицин и азитромицин – как бактериостатические антимикробные препараты, и цефазолин и ампициллин – как бактерицидные препараты.

2.9 Оценка генотоксичности и мутагенности исследуемых соединений в прокариотических тест-системах

2.9.1 Тест на ДНК-повреждающий эффект (REC-тест)

Для определения ДНК-повреждающей активности исследуемых хлорсодержащие производных замещенных 5-,6-,7-аминоиндолов применена чашечная модификация Rec-теста [Bridges B. A., 1972; Bridges B. A. et al., 1973; Leifer et al., 1981].

Тестерные штаммы переносят в жидкую питательную среду LB по Lennox и инкубируют при температуре 37 °С в течение 18 ч. На чашку Петри с плотной питательной средой LB по Lennox, в концентрации среды 2%, высевают тестерные бактерии сплошным газоном. Чашки выдерживают при комнатной температуре примерно 60–90 минут. Затем на поверхность питательной среды ставят стерильный бумажный диск, диаметром 20 мм. Диски пропитывают раствором исследуемого вещества в объеме 100.0 мкл. В чашке с негативным контролем на диск наносится 100.0 мкл растворителя, в чашке с позитивным контролем наносят 100.0 мкл раствора известного ДНК-повреждающего соединения, такого как нитрофурал в концентрации 500.0 мг/л. Полученные чашки Петри оставляют на сутки при температуре 37 °С. Определяют зону ингибирования роста тестерных штаммов бактерий.

ДНК-повреждающий эффект рассчитывали по диаметрам зон ингибирования роста тестерных штаммов *E.coli*, дефектных по определенным путям репарации: recA (общая рекомбинация, нарушена пострепликативная репарация ДНК, SOS ответ клетки), Wp2 («дикий» тип) [Иголина Е. В. И др., 2016; Сидоров Р. Ю. и др., 2017; Felkner, I.C. et al., 1977]. Расхождение между диаметрами зон ингибирования роста бактерий дикого типа и мутантов по разным путям репарации ДНК является показателем ДНК-повреждающей активности исследуемых соединений.

ДНК-повреждающий эффект определяется по формуле [3]:

$$\text{ДНК – повреждающий эффект(\%)} = 100 - \frac{X_a - X_b}{Y_a - Y_b} \quad [3],$$

где X_a и X_b – размеры зон ингибирования роста тестерного штамма с дефектом репарации ДНК (X_a) и тестерного штамма дикого типа (X_b) в негативном контроле, мм; Y_a и Y_b – размеры зон ингибирования роста штаммов с дефектом репарации ДНК (Y_a) и штамма дикого дикого типа (Y_b) при действии исследуемого соединения, мм.

2.9.2 Полуколичественный метод учета мутаций у *S.typhimurium*

Тест Эймса (анализ обратной мутации *S.typhimurium*) – это бактериальный краткосрочный тест для выявления токсинов с использованием мутагенности бактерий. Тест Эймса обнаруживает мутации в гене нуждающегося в гистидине бактериального штамма, который продуцирует независимый от гистидина штамм. Тест Эймса является одним из наиболее часто применяемых тестов в токсикологии. Этот анализ проверяет почти все новые фармацевтические и химические вещества, используемые в промышленности. Тест Эймса назван в честь Брюса Н. Эймса из Калифорнийского университета в Беркли, который разработал этот тест на мутагенность [Nohmi T., 2019].

Некоторые требующие гистидина бактериальные штаммы *S.typhimurium* используются для тестирования мутагенности. Каждый штамм тестера содержит разные типы мутаций в опероне гистидина. Из-за этой мутации штамм тестера не способен образовывать колонии на агаре без или с очень низким содержанием гистидина. Если в этом штамме, требующем гистидина, индуцируется мутация, которая генерирует независимый от гистидина штамм, например, путем восстановления гена дикого типа, он приобретёт способность образовывать колонии даже на минимальном агаре (Рисунок 3). Поскольку мутация восстанавливает независимый от гистидина фенотип дикого типа, тест Эймса классифицируется как «обратный» мутационный анализ.

В работе в качестве тестерных были использованы штаммы *S.typhimurium* TA100 и TA98, которые являются ауксотрофами по гистидину за счет точечной мутации в гистидиновом опероне. При действии мутагенных факторов тестерный штамм TA100 ревертируют к прототрофности путем замены пар оснований, а штамм TA98 – за счет генных мутаций по типу сдвига рамки считывания. Мутация гена *uvr B* нарушает процесс эксцизионной репарации. Синтез липополисахаридов нарушается мутацией *rfa*, которая сопровождается повышением проницаемости

клеточной стенки и облегчением проникновения мутагена. Тестерные штаммы имеют также плазмиду устойчивости к ампицилину рКМ 101, содержащую в своей структуре ген *umu C*, что повышает вклад ошибочной репарации в процесс мутагенеза и, стало быть, чувствительность штамма.

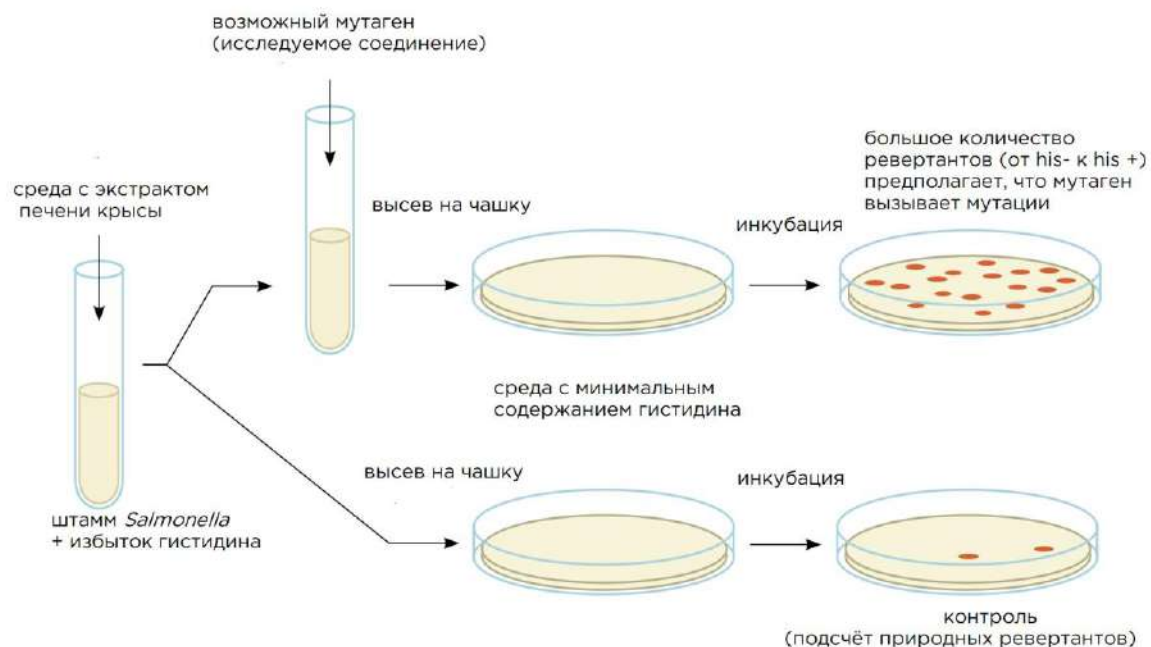


Рисунок 5 – Схема постановки теста Эймса

[\[https://www.biotechfront.com/2021/01/ames-test-overview.html\]](https://www.biotechfront.com/2021/01/ames-test-overview.html)

В качестве позитивного контроля для каждого штамма использовали известный мутаген: раствор 2-нитрофлуорена для ТА98 (2.0 мкг/чашку), раствор азиды натрия для ТА100 (0.1 мкг/чашка); в качестве негативного контроля – ДМСО (растворитель).

Согласно интерпретации результатов при проведении теста Эймса, тестируемые вещества считаются мутагенными, если число колоний-ревертантов, выросших в их присутствии, точно больше (чем в 2 раза) числа колоний-ревертантов в негативном контроле [Gronow M., 2019].

2.10 Анализ статистических результатов

Статистический анализ результатов проводили методами вариационной статистики, достоверность результатов оценивали с помощью метода определения t-критерия Стьюдента [Ланг Т. А., Сесик М., 2011; Миронов А. Н. и др., 2012]. Результаты считались статистически достоверными при отличии от контроля $\leq 0,05$. Данные обрабатывали статистически на Intel Atom N570, применяя программу Stat 7.0. В работе использовали персональный компьютер и стандартный набор программ по статистике.

Обработку полученных данных по чувствительности микроорганизмов к антибиотикам проводили с помощью программы AMRcloud [Кузьменков А.Ю. и др., 2019].

3 ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ИНТЕРПРИТАЦИЯ

3.1 Биологическая активность хлорсодержащих производных замещенных 5-,6-,7-аминоиндолов

Неэкспериментальный прогноз наличия (Pa) или отсутствия (Pi) активности в серии изученных замещенных 5-, 6-, 7-аминоиндолов было отправной точкой для последующих экспериментальных лабораторных этапов нашей работы. Был рассчитан прогноз потенциальной биологической активности (Таблица 2). Все исследуемые соединения (лабораторные шифры **T1-2**, **T4-13**) были отобраны для экспериментального изучения, так как вероятность наличия противомикробной активности в их спектре составила более 50%, т.е. $P_a \geq 0.500$ [Hodgson E. et al., 2004].

Согласно исследованию *in silico* для новых соединений прогнозируется следующая противомикробная активность: *Pseudolysin inhibitor* (ингибитор псевдолизина) [Lalithambika B. et al., 2016; Yang J. et al., 2015]; *Omptin inhibitor* (ингибитор омптина) [Hritonenko V. et al., 2007]; *Undecaprenyldiphosphomuramoylpentapeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase inhibitor* (ингибитор трансферазы MurG); *UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase inhibitor* (ингибитор UDP-N-ацетилглюкозамин 4-эпимеразы) [Carbone V. et al., 2018]; *Bacterial efflux pump inhibitor* (ингибитор бактериальных насосов оттока) [Alav I. et al., 2018]; *Antituberculosic* (противотуберкулезная активность); *Anti-Helicobacter pylori* (противохелибактерная активность); *Trp proteinase Porphyromonas gingivalis inhibitor* (ингибитор Trp протеаз *Porphyromonas gingivalis*); *Botulin neurotoxin A light chain inhibitor* (ингибитор легкой цепи ботулинического токсина типа А) [Yowler B. C. et al., 2002]; *D-amino-acid dehydrogenase inhibitor* (ингибитор дегидрогеназы D-аминокислот) [Akita H. et al., 2018] *antibacterial, ophthalmic* (противомикробная активность в офтальмологии) [Lee A. E. et al., 2019]; *sepsis treatment* (терапия сепсиса) [Rhodes A. et al., 2017]; *coccolysin inhibitor* (ингибитор

Таблица 2 – Прогностическая вероятность противомикробной активности исследуемых соединений

Соединение, лабораторный шифр	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	Активность
2-хлор- <i>N</i> -(2,3-диметил-1 <i>H</i> -индол-7-ил)ацетамид (лабораторный шифр Т-1)	0.714	0.017	Pseudolysin inhibitor (ингибитор псевдолизина)
	0.315	0.085	Botulin neurotoxin A light chain inhibitor (ингибитор легкой цепи ботулинического токсина типа А)
	0.569	0.054	Omp _{tin} inhibitor (ингибитор омптина)
	0.390	0.055	Trp proteinase <i>Porphyromonas gingivalis</i> inhibitor (ингибитор Trp протеаз <i>Porphyromonas gingivalis</i>)
	0.203	0.144	Undecaprenyldiphospho-muramoylpentapeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase inhibitor (ингибитор трансферазы MurG)
	0.172	0.121	D-amino-acid dehydrogenase inhibitor (ингибитор дегидрогеназы D-аминокислот)
	0.153	0.128	Antirickettsial (противориккетсиозная)
	0.197	0.177	Antimycobacterial (противомикобактериальная)
2-хлор- <i>N</i> -(1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индол-7-ил)ацетамид (лабораторный шифр Т-2)	0.637	0.034	Pseudolysin inhibitor (ингибитор псевдолизина)
	0.470	0.091	Omp _{tin} inhibitor (ингибитор омптина)
	0.349	0.074	Trp proteinase <i>Porphyromonas gingivalis</i> inhibitor (ингибитор Trp протеаз <i>Porphyromonas gingivalis</i>)
	0.267	0.152	Botulin neurotoxin A light chain inhibitor (ингибитор легкой цепи ботулинического токсина типа А)
	0.177	0.173	Anti- <i>Helicobacter pylori</i> (противохелибактерная активность)
	0.146	0.143	Antirickettsial (противориккетсиозная)

Продолжение Таблицы 2

Соединение, лабораторный шифр	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	Активность
2-хлор- <i>N</i> -(5-метокси-2,3-диметил-1 <i>H</i> -индол-6-ил)ацетамид (лабораторный шифр Т-4)	0.511	0.156	Pseudolysin inhibitor (ингибитор псевдолизина)
	0.236	0.184	Trp proteinase <i>Porphyromonas gingivalis</i> inhibitor (ингибитор Trp протеаз <i>Porphyromonas gingivalis</i>)
	0.266	0.243	Omp tin inhibitor (ингибитор омптина)
2-хлор- <i>N</i> -(5-метокси-1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индолил-6-ил)ацетамид (лабораторный шифр Т-5)	0.725	0.015	Pseudolysin inhibitor (ингибитор псевдолизина)
	0.528	0.067	Omp tin inhibitor (ингибитор омптина)
	0.390	0.055	Trp proteinase <i>Porphyromonas gingivalis</i> inhibitor (ингибитор Trp протеаз <i>Porphyromonas gingivalis</i>)
	0.289	0.077	Antituberculosic (противотуберкулезная)
	0.302	0.100	Botulin neurotoxin A light chain inhibitor (ингибитор легкой цепи ботулинического токсина типа А)
	0.195	0.098	D-amino-acid dehydrogenase inhibitor (ингибитор дегидрогеназы D-аминокислот)
	0.173	0.091	Antirickettsial (противориккетсиозная)
	0.221	0.149	Antimycobacterial (противомикобактериальная)
	0.203	0.144	Undecaprenyldiphospho-muramoylpentapeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase inhibitor (ингибитор трансферазы MurG)
	0.135	0.113	Antileprosy (противолепрозная активность)
0.120	0.104	Bacterial efflux pump inhibitor (ингибитор бактериальных насосов оттока)	

Продолжение Таблицы 2

Соединение, лабораторный шифр	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	Активность
	0,181	0.165	Anti- <i>Helicobacter pylori</i> (противохелибактерная активность)
	0.030	0.030	D-amino-acid oxidase inhibitor (ингибитор оксидазы D-аминокислот)
2-хлор-N-(2,3-диметил-1 <i>H</i> -индол-5-ил)ацетамид (лабораторный шифр Т-6)	0.605	0.044	Pseudolysin inhibitor (ингибитор псевдолизина)
	0.427	0.112	Omp _{tin} inhibitor (ингибитор омптина)
	0.349	0.074	Trp proteinase <i>Porphyromonas gingivalis</i> inhibitor (ингибитор Trp протеаз <i>Porphyromonas gingivalis</i>)
	0.255	0.173	Botulin neurotoxin A light chain inhibitor (ингибитор легкой цепи ботулинического токсина типа А)
	0.166	0.102	Antirickettsial (противориккетсиозная)
	0.193	0.140	Anti- <i>Helicobacter pylori</i> (противохелибактерная активность)
	0.130	0.122	Antileprosy (противолепрозная активность)
Монохлорацетат 2,3-диметил-5-метокси-1 <i>H</i> -индол-6-аммония (лабораторный шифр Т-8)	0.576	0.144	Pseudolysin inhibitor (ингибитор псевдолизина)
	0.398	0.168	Omp _{tin} inhibitor (ингибитор омптина)
	0.268	0.141	Trp proteinase <i>Porphyromonas gingivalis</i> inhibitor (ингибитор Trp протеаз <i>Porphyromonas gingivalis</i>)
2-хлор-N-(1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индол-5-ил)ацетамид (лабораторный шифр Т-7)	0.623	0.038	Pseudolysin inhibitor (ингибитор псевдолизина)
	0.580	0.050	Omp _{tin} inhibitor (ингибитор омптина)
	0.514	0.005	D-amino-acid dehydrogenase inhibitor (ингибитор дегидрогеназы D-аминокислот)
	0.434	0.023	Antituberculosic (противотуберкулезная)

Продолжение Таблицы 2

Соединение, лабораторный шифр	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	Активность
	0.368	0.048	Antimycobacterial (противомикобактериальная)
	0.336	0.064	Botulin neurotoxin A light chain inhibitor (ингибитор легкой цепи ботулинического токсина типа А)
	0.341	0.079	Trp proteinase <i>Porphyromonas gingivalis</i> inhibitor (ингибитор Trp протеаз <i>Porphyromonas gingivalis</i>)
	0.267	0.010	Antirickettsial (противориккетсиозная)
	0.219	0.005	Sepsis treatment (терапия сепсиса)
	0.277	0.079	Undecaprenyldiphospho-muramoylpentapeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase inhibitor (ингибитор трансферазы MurG)
	0.199	0.010	Antichlamydial (Trachoma) (активность против <i>Chlamydia trachomatis</i>)
	0.239	0.072	Anti- <i>Helicobacter pylori</i> (противохелибактерная активность)
	0.238	0.083	Coccolysin inhibitor (ингибитор кокколизина)
	0.222	0.110	Cell Wall biosynthesis inhibitor (ингибитор биосинтеза клеточной стенки)
	0.178	0.082	Antiseptic (антисептическая)
	0.151	0.056	Antibacterial, ophthalmic (противомикробная активность в офтальмологии)
	0.111	0.022	D-Ala-D-Ala ligase inhibitor (ингибитор D-аланин-D-аланин лигазы)
	0.245	0.160	Peptidoglycan glycosyltransferase inhibitor (ингибитор гликозилтрансферазы пептидогликана)
	0.245	0.160	<i>Serratia marcescens</i> nuclease inhibitor (ингибитор нуклеазы <i>Serratia</i>)

Продолжение Таблицы 2

Соединение, лабораторный шифр	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	Активность
	0.123	0.066	<i>marcescens</i>) UDP-N-acetylglucosamine-dolichyl-phosphate N-acetylglucosaminophosphotransferase inhibitor (ингибитор UDP-N-ацетил-D-глюкозамин долихил-фосфат N-ацетил-D-глюкозамин-фосфотрансферазы)
	0.122	0.092	Bacterial efflux pump inhibitor (ингибитор бактериальных насосов оттока)
Монохлорацетат 5-метокси-1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индол-6-аммония (лабораторный шифр Т-9)	0.499	0.148	Pseudolysin inhibitor (ингибитор псевдолизина)
	0.290	0.216	Omp _{tin} inhibitor (ингибитор омптина)
	0.258	0.153	Trp proteinase <i>Porphyromonas gingivalis</i> inhibitor (ингибитор Trp протеаз <i>Porphyromonas gingivalis</i>)
Монохлорацетат 2,3-диметил-1 <i>H</i> -индол-5-аммония (лабораторный шифр Т-10)	0.635	0.035	Pseudolysin inhibitor (ингибитор псевдолизина)
	0.549	0.060	Omp _{tin} inhibitor (ингибитор омптина)
	0.395	0.053	Trp proteinase <i>Porphyromonas gingivalis</i> inhibitor (ингибитор Trp протеаз <i>Porphyromonas gingivalis</i>)
	0.216	0.082	D-amino-acid dehydrogenase inhibitor (ингибитор дегидрогеназы D-аминокислот)
	0.168	0.160	Coccolysin inhibitor (ингибитор кокколизина)
Монохлорацетат 1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индол-5-аммония (лабораторный шифр Т-11)	0.512	0.085	Pseudolysin inhibitor (ингибитор псевдолизина)
	0.455	0.098	Omp _{tin} inhibitor (ингибитор омптина)

Продолжение Таблицы 2

Соединение, лабораторный шифр	<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	Активность
	0.381	0.059	Trp proteinase <i>Porphyromonas gingivalis</i> inhibitor (ингибитор Trp протеаз <i>Porphyromonas gingivalis</i>)
Монохлорацетат-2,3-диметил-1 <i>H</i> -индол-7-аммония (лабораторный шифр Т-12)	0.623	0.038	Pseudolysin inhibitor (ингибитор псевдолизина)
	0.590	0.048	Omp tin inhibitor (ингибитор омптина)
	0.395	0.053	Trp proteinase <i>Porphyromonas gingivalis</i> inhibitor (ингибитор Trp протеаз <i>Porphyromonas gingivalis</i>)
	0.191	0.102	D-amino-acid dehydrogenase inhibitor (ингибитор дегидрогеназы D-аминокислот)
	0.189	0.185	Antituberculosic (противотуберкулезная)
Монохлорацетат 1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индол-7-аммония (лабораторный шифр Т-13)	0.544	0.068	Pseudolysin inhibitor (ингибитор псевдолизина)
	0.498	0.079	Omp tin inhibitor (ингибитор омптина)
	0.381	0.059	Trp proteinase <i>Porphyromonas gingivalis</i> inhibitor (ингибитор Trp протеаз <i>Porphyromonas gingivalis</i>)

кокколизина); *antirickettsial* (противориккетсиозная); *antimycobacterial* (противомикобактериальная); *antileprosy* (противолепрозная активность); *antichlamydial* (Trachoma) (активность против *Chlamydia trachomatis*); *cell Wall biosynthesis inhibitor* (ингибитор биосинтеза клеточной стенки); *D-Ala-D-Ala ligase inhibitor* (ингибитор D-аланин-D-аланин лигазы); *peptidoglycan glycosyltransferase inhibitor* (ингибитор гликозилтрансферазы пептидогликана); *Serratia marcescens nuclease inhibitor* (ингибитор нуклеазы *Serratia marcescens*) и другие.

Ингибирование псевдолизина и системы омпинов – наиболее часто встречающаяся противомикробная активность тестируемых соединений. Псевдолизин (Рисунок 4) является ключевым фактором вирулентности синегнойной палочки. Этот фактор вирулентности является высокотоксичным, вызывая повреждение и инвазию тканей, действуя на компоненты иммунной системы, стимулирует рост бактериальной биопленки [Saint-Criq V. et al., 2018; Lalithambika B. et al., 2016]. Псевдолизин разрушает ткани человека путем растворения эластина. Фермент псевдолизин катализирует гидролиз белков, включая эластин, коллаген типов III и IV, фибронектин и иммуноглобулин А, обычно с объемной гидрофобной группой в Р1' [Yang J. et al., 2015; Yu H. et al., 2017]. После формирования биопленки бактериальные клетки проявляют высокую устойчивость к иммунному ответу и антимикробным препаратам. Возникающий в отношении биопленки микроорганизмов, воспалительный ответ неэффективен при очистке биопленки и вместо этого увеличивает воспалительный цикл у хозяина [Moore J. E. et al., 2017; Jesaitis A. J. et al., 2003].

У всех исследуемых соединений прогнозируется противомикробная активность, связанная с подавлением системы омпинов. Омпины (Рисунок 5) представляют собой семейство бактериальных протеаз. Это семейство включает OmpT и OmpP *E.coli*, SopA *Shigella flexneri*, PgtE *Salmonella enterica* и Pla *Yersinia pestis*. Они локализуются в наружной мембране представленных грамотрицательных энтеробактерий [Hritonenko V. et al., 2007]. Большинство белков омпинов участвуют в реализации бактериального патогенеза [Kukkonen

M. et al., 2004]. Также они являются факторами бактериальной вирулентности и действуют как протеазы, адгезины или инвазины. Из-за их патогенной активности разработка специфических ингибиторов протеаз против протеаз омптина может открыть многообещающие перспективы для новых противомикробных терапевтических средств. [Okuno K. et al., 2017; Grodberg J. et al., 1988; Smiley S. T. et al., 2019].

Ботулинический токсин типа А, продуцируемый бактерией *Clostridium botulinum*, является одним из самых сильных токсинов, известных человечеству, несмотря на это, его повсеместно применяют в косметологии для предотвращения развития морщин путем парализации мышц лица [Yowler B. C. et al., 2002]. Разработка сильных противоядий от токсина чрезвычайно сложна. Исследуемые соединения **T1, T2, T5, T6, T7** согласно проведенному исследованию проявили противомикробную активность, позволяющую ингибировать легкую цепь ботулинического токсина типа А.

D-аминодегидрогеназа представляет собой бактериальный фермент, который катализирует окисление D-аминокислот в их соответствующие оксокислоты. Он содержит как флаavin, так и негемовое железо в качестве кофакторов. Фермент обладает очень широкой специфичностью и может действовать на большинство D-аминокислот. D-аминокислоты контролируют ремоделирование клеточной стенки в зависимости от фазы роста и запускают разборку биопленки [Akita H. et al., 2018]. Исследуемые соединения с лабораторным шифром **T1, T5, T7, T10, T12** согласно проведенному исследованию проявляют противомикробную активность, позволяющую ингибировать дегидрогеназу D-аминокислот.

У всех исследуемых соединений спрогнозирована противомикробная активность – ингибирование протеазы Trp *Porphyromonas gingivalis*. *P.gingivalis* относится к семейству *Bacteroidaceae* и является неподвижной, грамотрицательной, палочковидной, анаэробной, патогенной бактерией. Сильная протеазная активность *P.gingivalis* является важным свойством вирулентности этих организмов.

У **T5** и **T7** прогнозируется противомикробная активность, связанная с ингибированием бактериальных эффлюксных насосов оттока. Эффлюксный насосы способны выводить из клетки различные токсичные соединения, такие как антибиотики, тяжелые металлы, органические загрязнители, вещества растительного происхождения, сигналы кворума, бактериальные метаболиты и нейротрансмиттеры посредством активного оттока, который является жизненно важной частью метаболизма [Alav I. et al., 2018].

Трансфераза MurG – это белок, участвующий в пути биосинтеза пептидогликана, который является частью биогенеза клеточной стенки. Ингибирование трансферазы MurG показано у соединений **T1**, **T5** и **T7**.

У соединений **T1**, **T2**, **T5**, **T6** и **T7** прогнозировалась возможность наличия противориккетсиозной активности. Противотуберкулезная активность у **T5**, **T7** и **T12**. Противолепрозная активность отмечена у **T5** и **T6**. Болезнь Хансена – это хроническое инфекционное заболевание, вызываемый микобактериями *Mycobacterium leprae* и *Mycobacterium lepromatosis*, протекающий с поражением кожи, периферической нервной системы, иногда передней камеры глаза, верхних дыхательных путей выше гортани, яичек, а также кистей и стоп. У **T2**, **T5**, **T6** и **T7** прогнозировалась возможность наличия противохелибактерной активности. Распространённость этой инфекции очень широка, почти 50% населения земли инфицированы бактерией *Helicobacter pylori*. Противомикобактериальная активность – у соединений **T1**, **T5**, **T7**. Противомикробная активность, сопровождающаяся ингибированием кокколизина возможна у **T7** и **T10**.

Наличие противомикробной активности исследуемых соединений, выявленных в ходе исследования *in silico*, является предметом отдельного исследования и должно быть подтверждено путем непосредственного экспериментального тестирования *in vitro* или *in vivo*.

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

3.2 Характеристика микроорганизмов полученной рабочей коллекции

Собранная рабочая коллекция содержала 156 клинических штаммов бактерий, из которых 91 штамм – грамположительные микроорганизмы, 65 – грамотрицательные микроорганизмы (Рисунок 6). Грамотрицательные микроорганизмы собранной коллекции относятся к порядкам *Pseudomonadales* и *Enterobacterales* и содержат изоляты *P.aeruginosa* (n=27) и *E.coli* (n=38) соответственно, грамположительные микроорганизмы – *Bacillales* и *Lactobacillales*, содержащие изоляты *S.aureus* (n=52), *S.pyogenes* (n=19) и *S.pneumoniae* (n=20).

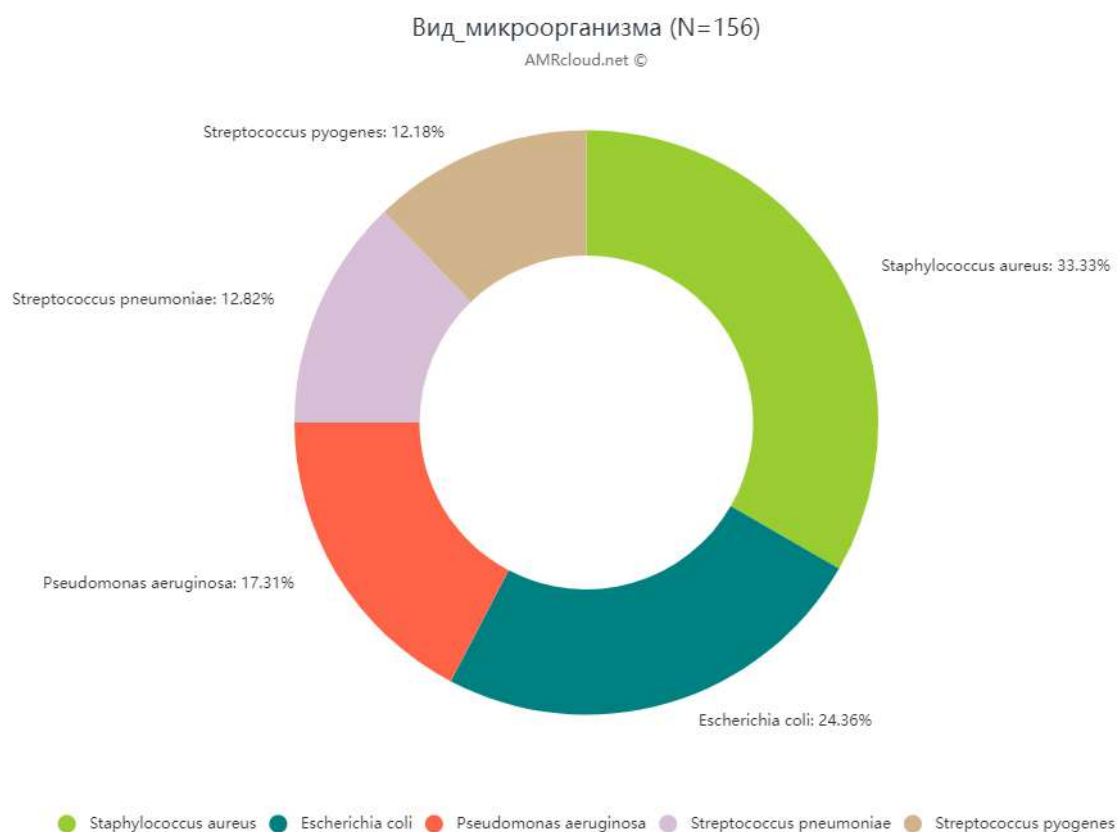


Рисунок 6 – Видовое разнообразие рабочей коллекции

У изолятов *E.coli* наблюдалась высокая чувствительность к карбапенемам, в частности имипенему (96.3%), меропинему (96.3%), дорипенему (94.74%) и эртапенему (88.46%). Из группы пенициллинов широкого спектра действия хорошей активностью в отношении *E.coli* обладает препарат пиперациллин-

тазобактам (88.89%). Нитрофурантоин активен против изолятов *E.coli* в 82.35% случаях. Среди аминогликозидов высокую активность показал амикацин (77.78%).

Резистентность изоляты *E.coli* проявили к пиперациллину (100%) и ампициллину (89.47%), относящиеся к группе пенициллинов. Также из группы тетрациклинов 19 изолятов из 19 исследуемых проявили устойчивость к тигециклину.

Штаммы *E.coli* также были чувствительны при повышенной экспозиции к цефалоспорином (цефепим – 73.68% и цефазолин – 62.96%) и фторхинолонам (левофлоксацин – 70.37% и ципрофлоксацин – 29.41%) (Рисунок 7).

На основании полученных данных об устойчивости выделенных штаммов к ряду антибиотиков, с помощью онлайн платформы для анализа данных по антибиотикорезистентности AMRcloud [Кузьменков А.Ю. и др., 2019], была выявлена ассоциированная устойчивость выделенных штаммов *E.coli* (Рисунок 8).

Из всех исследуемых антибиотиков высокую активность против *P.aureginosa* показали аминогликозиды (амикацин – 92%, тобрамицин – 88%). Среди карбапенемов – меропенем в более, чем 50% случаях был активен по отношению к *P.aureginosa*.

Штаммы *P.aureginosa* резистентны к тикарциллину, как в комбинации с клавулановой кислотой (73.08%), так и без (100%).

При повышенной экспозиции штаммы *P.aureginosa* были чувствительны к цефепиму (85.19%) из группы цефалоспоринов, из фторхинолонов левофлоксацин – 85.19% и ципрофлоксацин – 75%, азтреонаму (84.62%) из монобактамов, цефтазидиму (84.62%) – цефалоспорин и имипенему (80%) (Рисунок 9). Из группы пенициллинов широкого спектра действия, активностью при повышенной экспозиции, в отношении *P.aureginosa* обладает препарат пиперациллин, как в комбинации с тазобактамом (76.92%), так и без (76%).

На основании полученных данных об устойчивости выделенных штаммов к ряду антибиотиков, с помощью онлайн платформы для анализа данных по

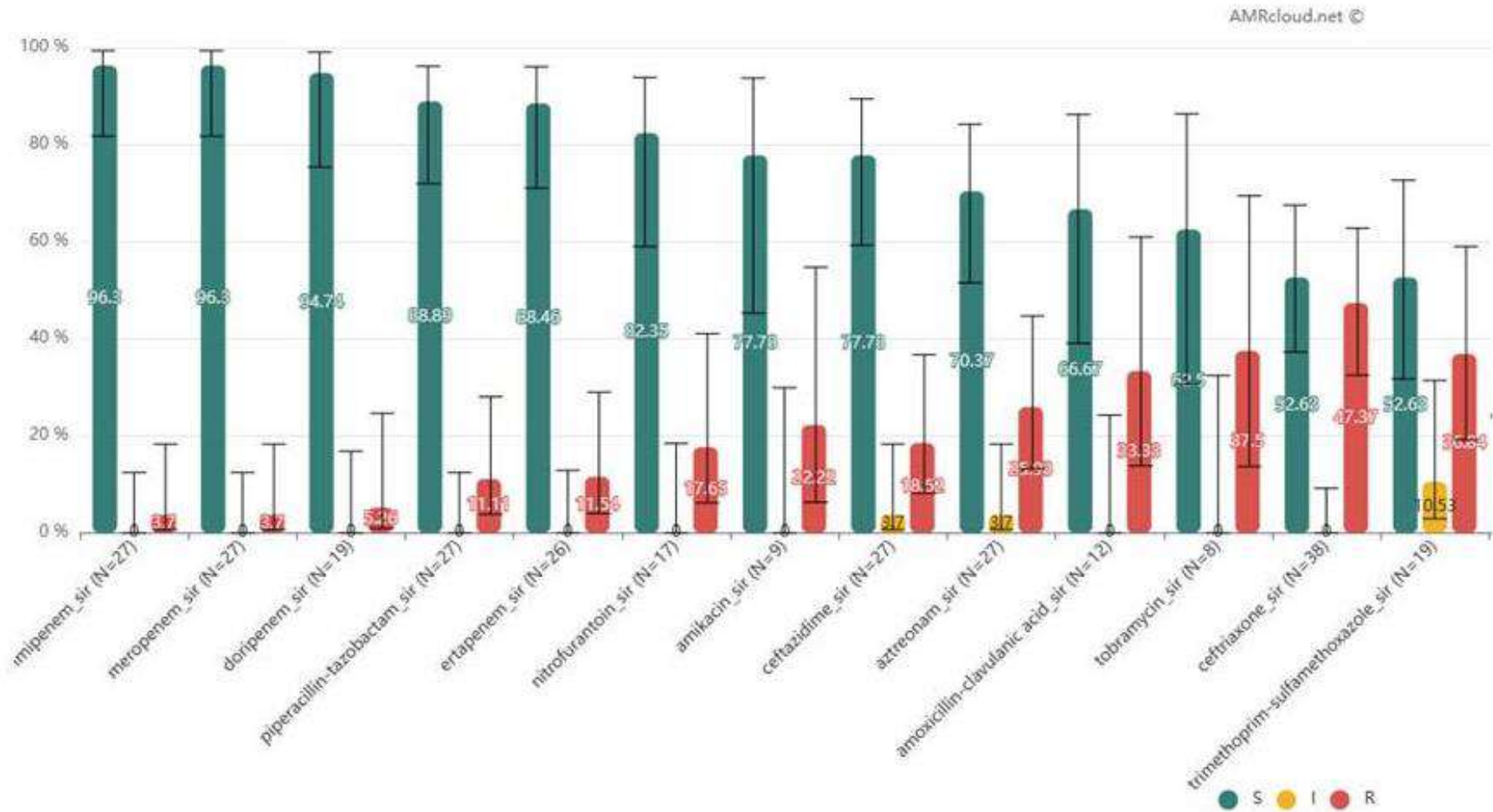


Рисунок 7 – Чувствительность штаммов *E. coli* к традиционным антимикробным препаратам

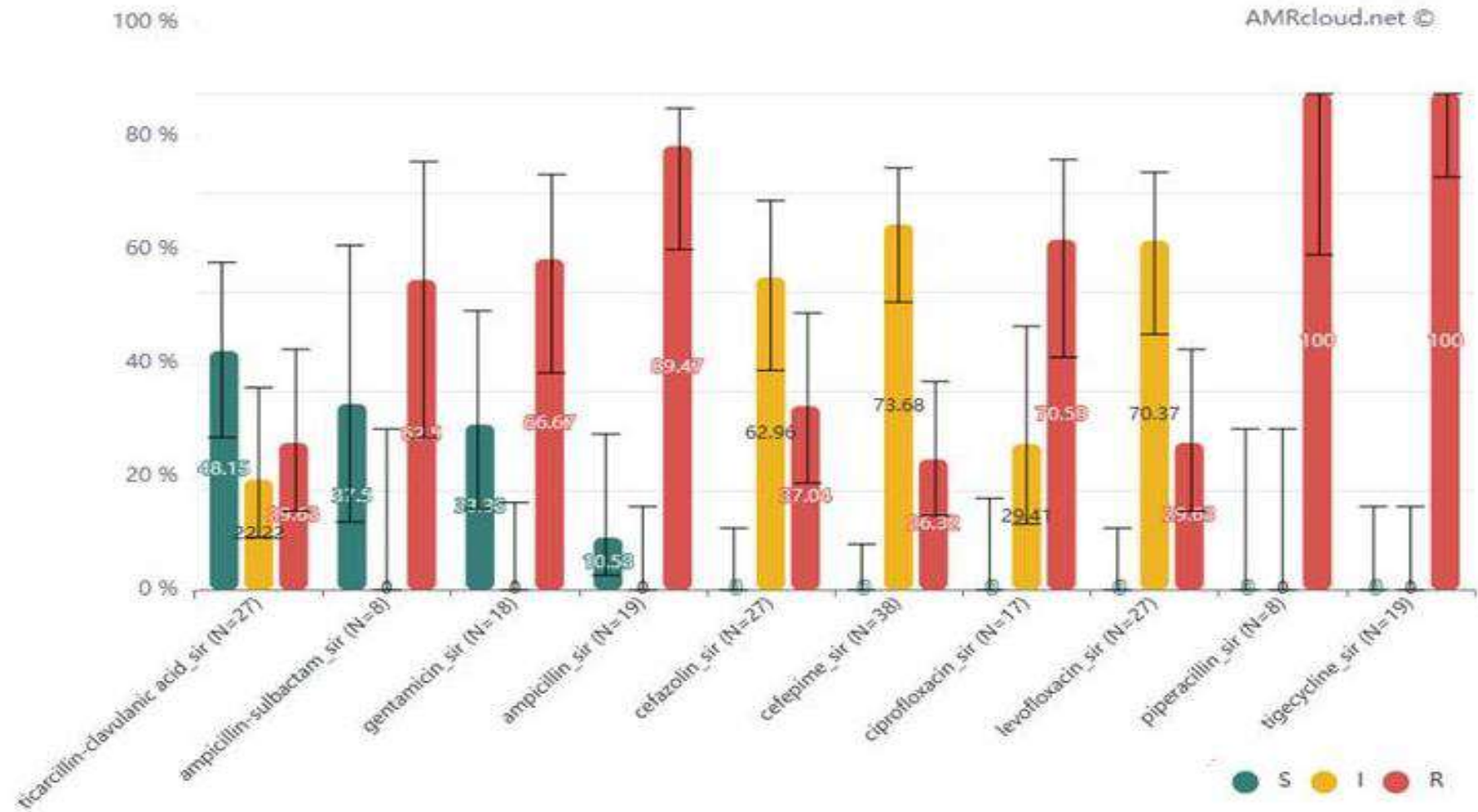


Рисунок 7 – Чувствительность штаммов *E.coli* к традиционным антимикробным препаратам (продолжение)

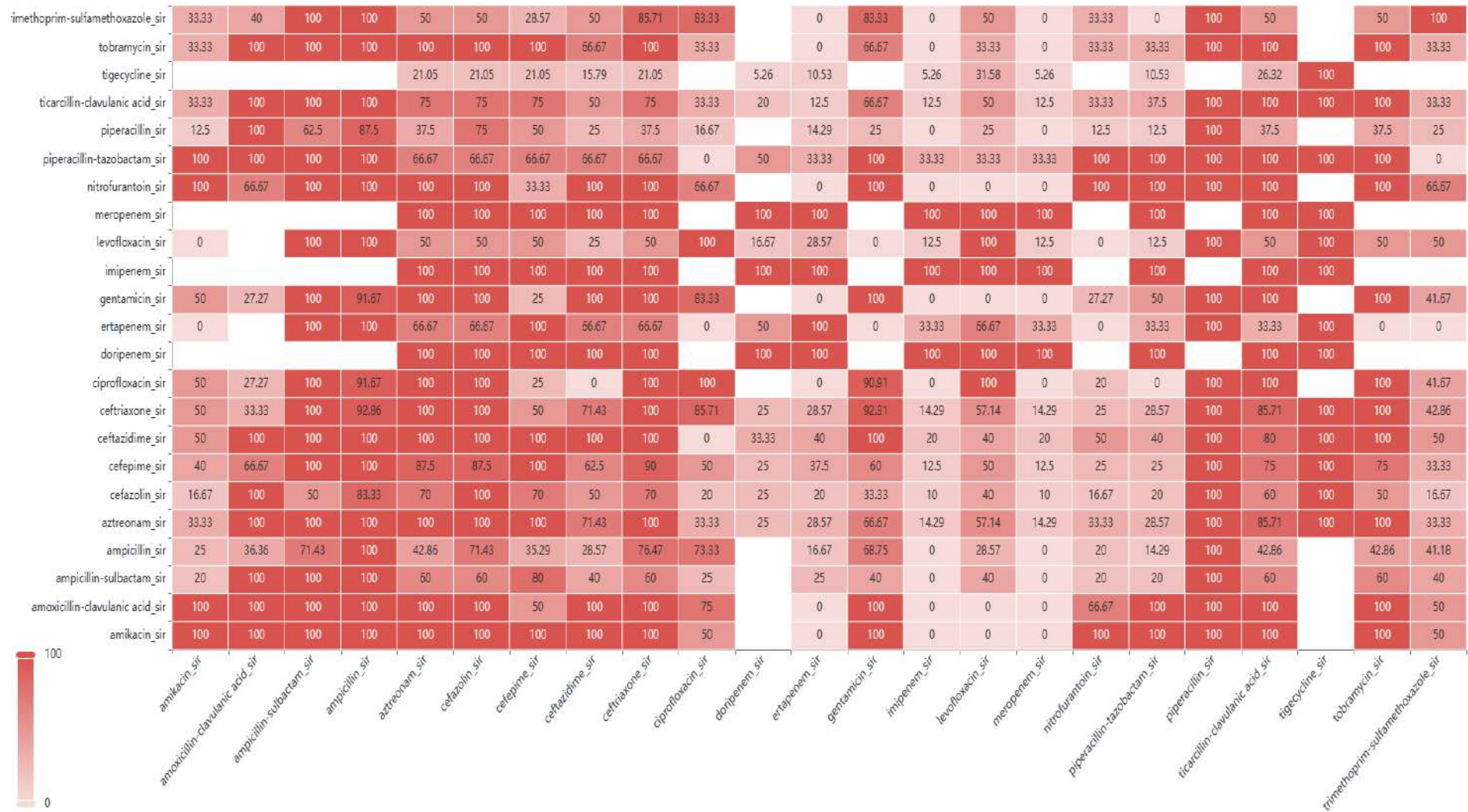


Рисунок 8 – Ассоциированная устойчивость выделенных штаммов *E.coli* к традиционным противомикробным препаратам

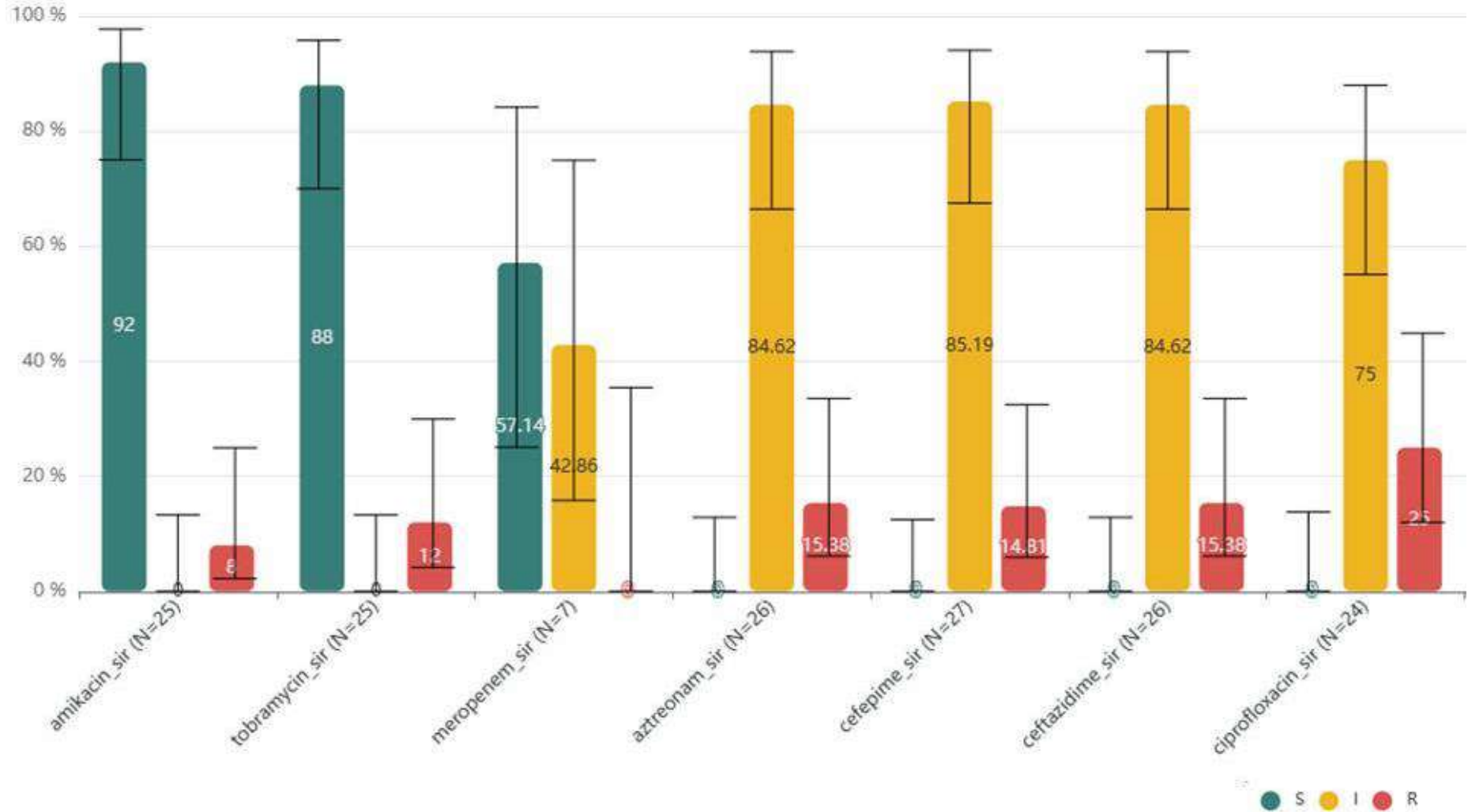


Рисунок 9 – Чувствительность штаммов *P. aeruginosa* к традиционным антимикробным препаратам

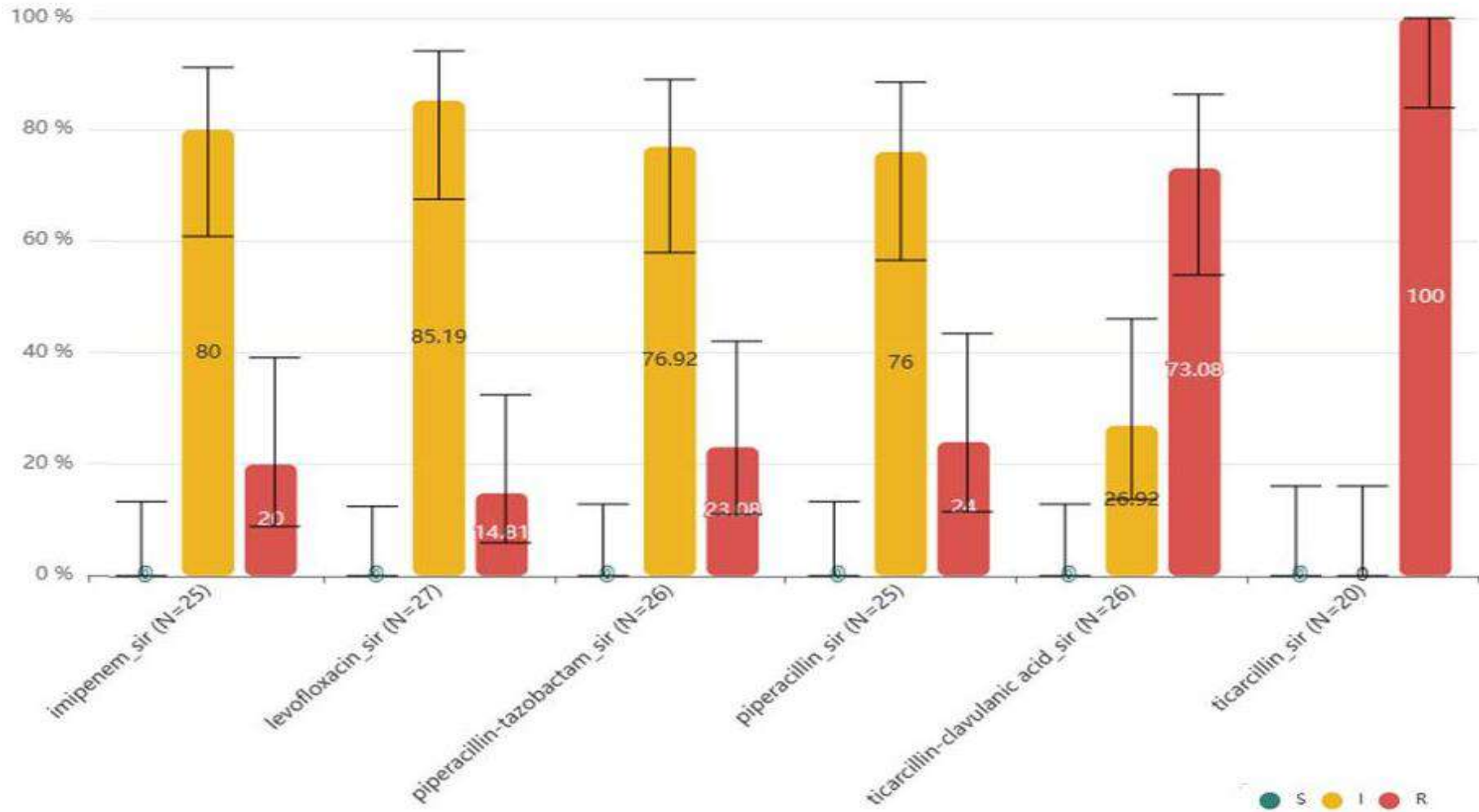


Рисунок 9 – Чувствительность штаммов *P. aeruginosa* к традиционным антимикробным препаратам (продолжение)

антибиотикорезистентности AMRcloud [Кузьменков А.Ю. и др., 2019], была выявлена ассоциированная устойчивость выделенных штаммов *P.aureginosa* (Рисунок 10).

Бактерии *S.pneumoniae* были чувствительны к ванкомицину из группы гликопептидов во всех 20 исследованиях из 20. Хлорамфеникол также проявлял высокую активность (80%) в отношении *S.pneumoniae*. Левофлоксацин проявлял активность (90%) при повышенной экспозиции по отношению к штаммам *S.pneumoniae*.

Что касается резистентности выделенных бактерий, то больше всего она проявлялась к группе макролидов, а именно к азитромицину (73.68%) и эритромицину (75%), из группы пенициллинов к амоксициллин-клавулановой кислоте (100%), также к тетрациклину (75%) и цефуроксиму (78.95%) (Рисунок 11). Ассоциированная устойчивость выделенных штаммов *S.pneumoniae* к традиционным противомикробным препаратам представлена на рисунке 12.

Высокую чувствительность показали штаммы *S.pyogenes* к линезолиду (100%) из группы оксазолидинонов, к ванкомицину (100%) из группы гликопептидов и к тигециклину (100%). Также при повышенной экспозиции левофлоксацина *S.pyogenes* проявлял чувствительность у 17 из 19 изолятов, а у 2 изолятов выявилась устойчивость. Азитромицин и эритромицин не воздействовали на штаммы *S.pyogenes* в 76.92 и 84.21% случаев. Помимо макролидов *S.pyogenes* устойчив к тетрациклину (78.95%) (Рисунок 13). Ассоциированная устойчивость выделенных штаммов *S.pyogenes* к традиционным противомикробным препаратам представлена на рисунке 14.

Все выделенные изоляты *S.aureus* были чувствительны к нескольким традиционным антибиотикам, в частности к даптомицину, линезолиду, оксациллину, тигециклину и ванкомицину. Также высокую активность в отношении исследуемых бактерий показали гентамицин – 88.46%, цефтаролин – 83.33%, азитромицин – 85.71%, эритромицин – 77.5%, сульфаметоксазол-триметоприм – 82.69% и клиндамицин – 76%. Изоляты *S.aureus* проявили

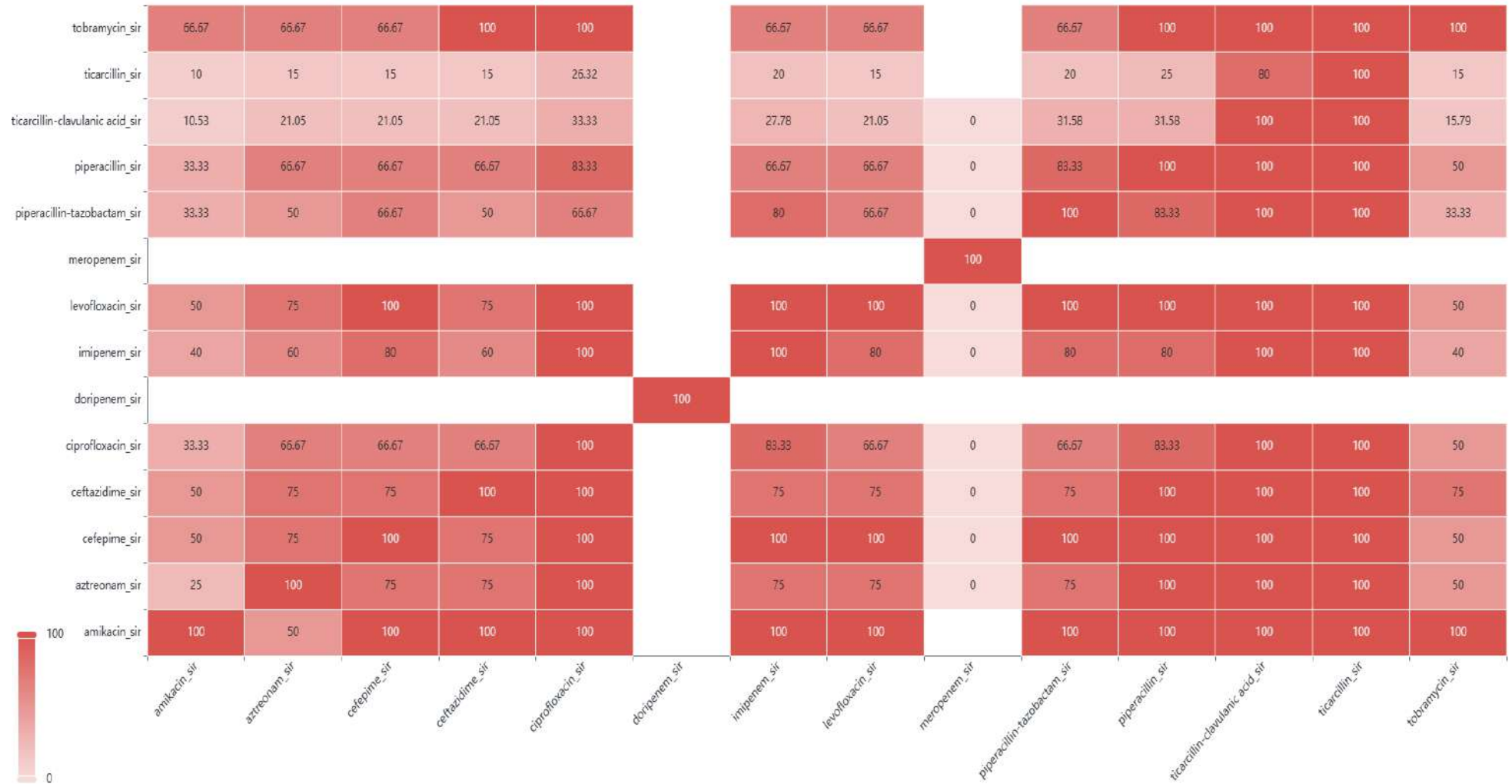


Рисунок 10 – Ассоциированная устойчивость выделенных штаммов *P.aeruginosa* к традиционным противомикробным препаратам

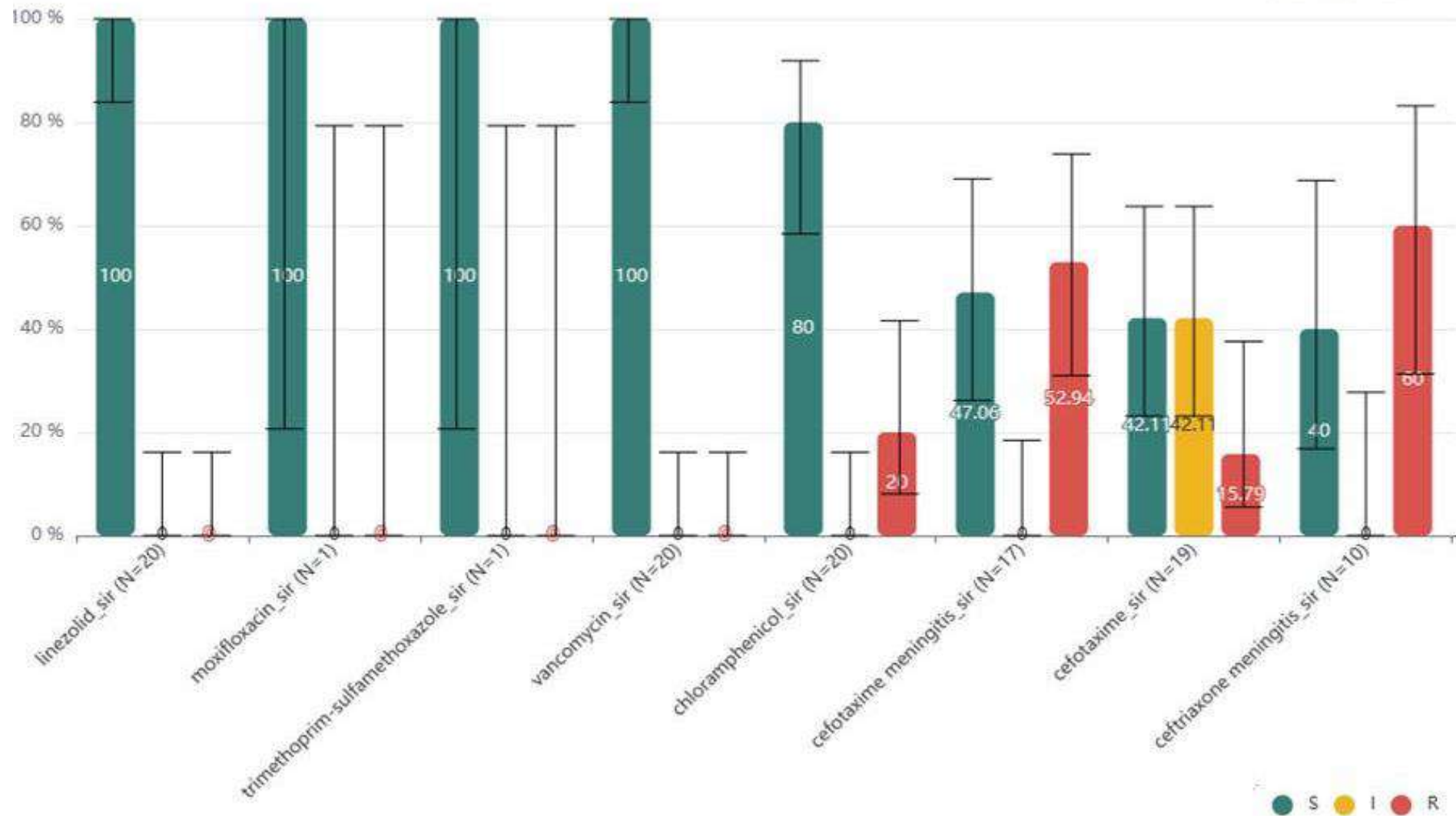


Рисунок 11 – Чувствительность штаммов *S.pneumoniae* к традиционным антимикробным препаратам

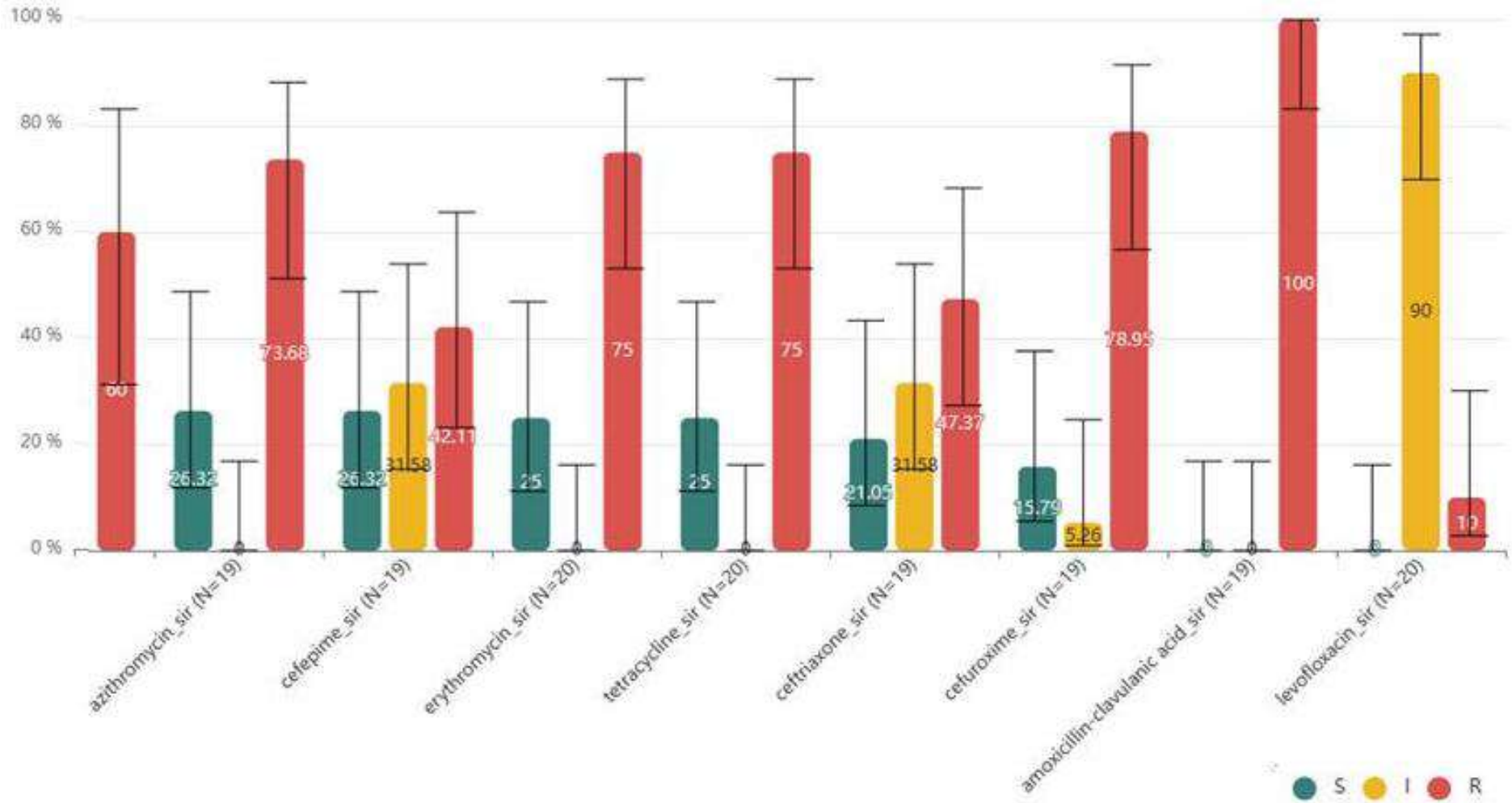


Рисунок 11 – Чувствительность штаммов *S.pneumoniae* к традиционным антимикробным препаратам (продолжение)



Рисунок 12 – Ассоциированная устойчивость выделенных штаммов *S.pneumoniae* к традиционным противомикробным препаратам

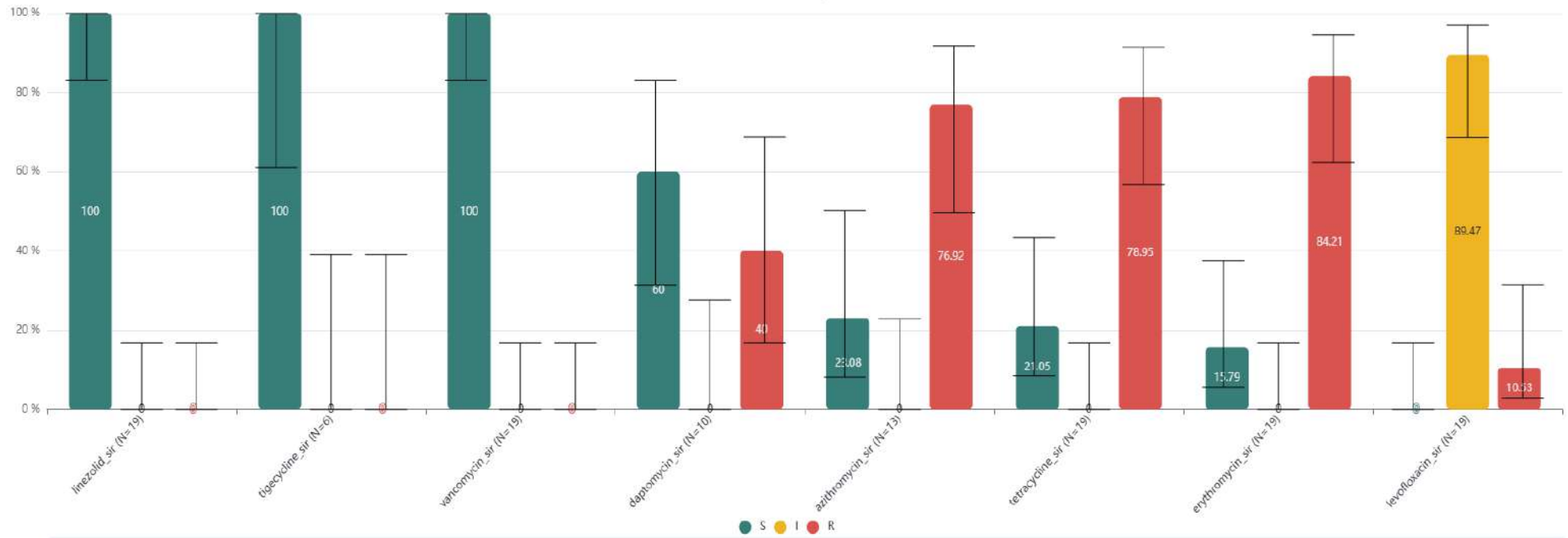


Рисунок 13 – Чувствительность штаммов *S. pyogenes* к традиционным антимикробным препаратам

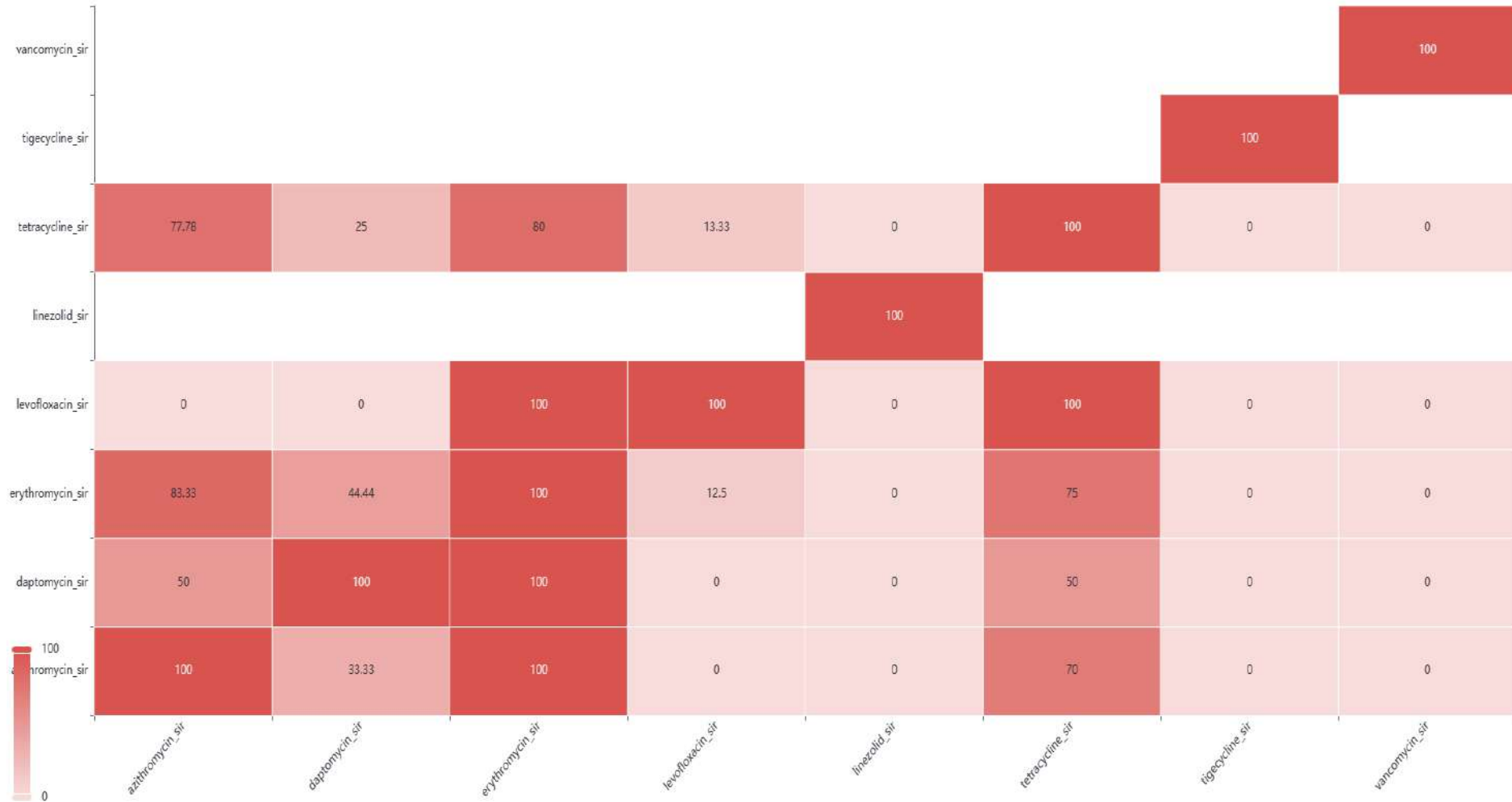


Рисунок 14 – Ассоциированная устойчивость выделенных штаммов *S.pyogenes* к традиционным противомикробным препаратам

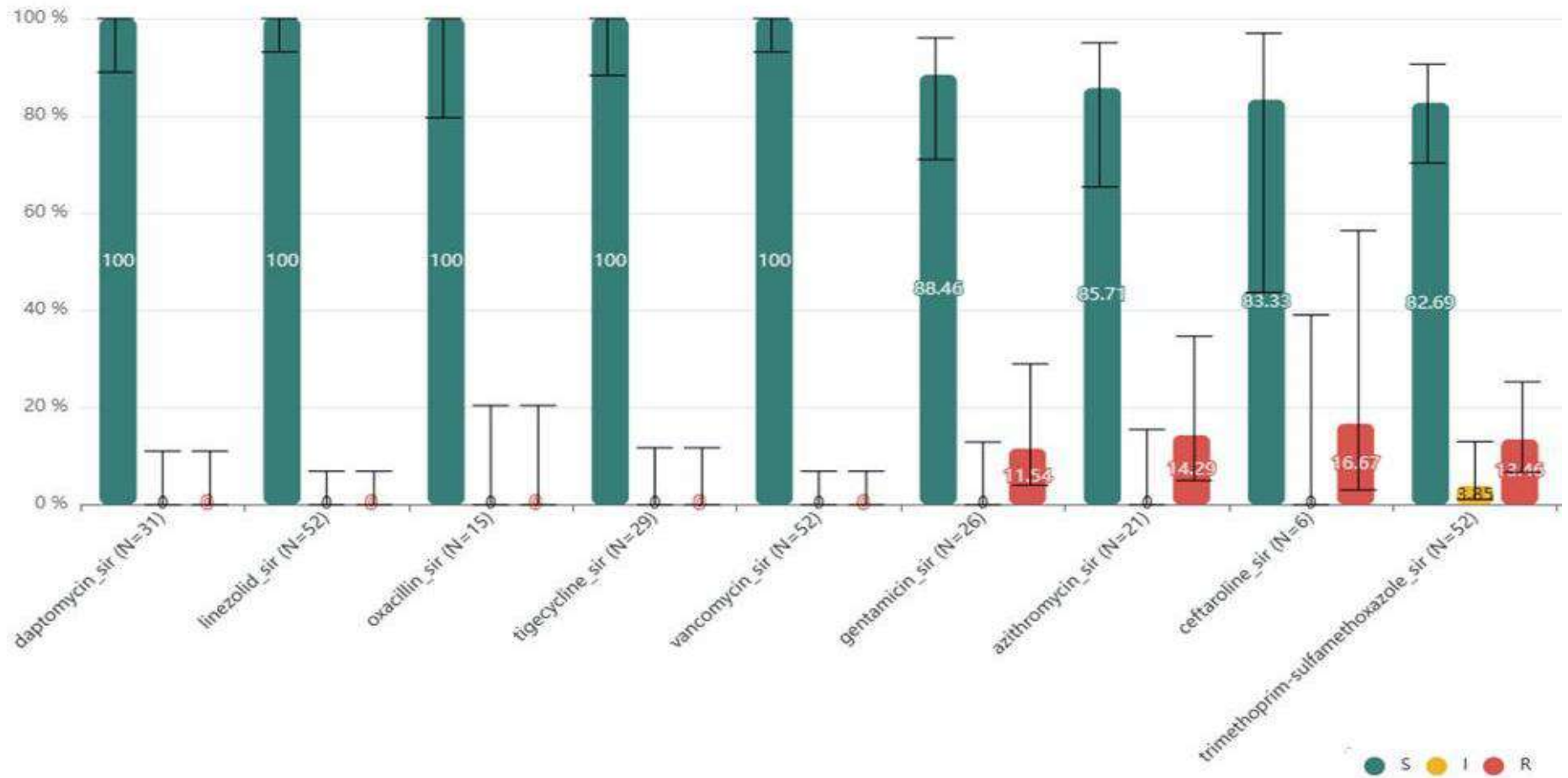


Рисунок 15 – Чувствительность штаммов *S. aureus* к традиционным антимикробным препаратам

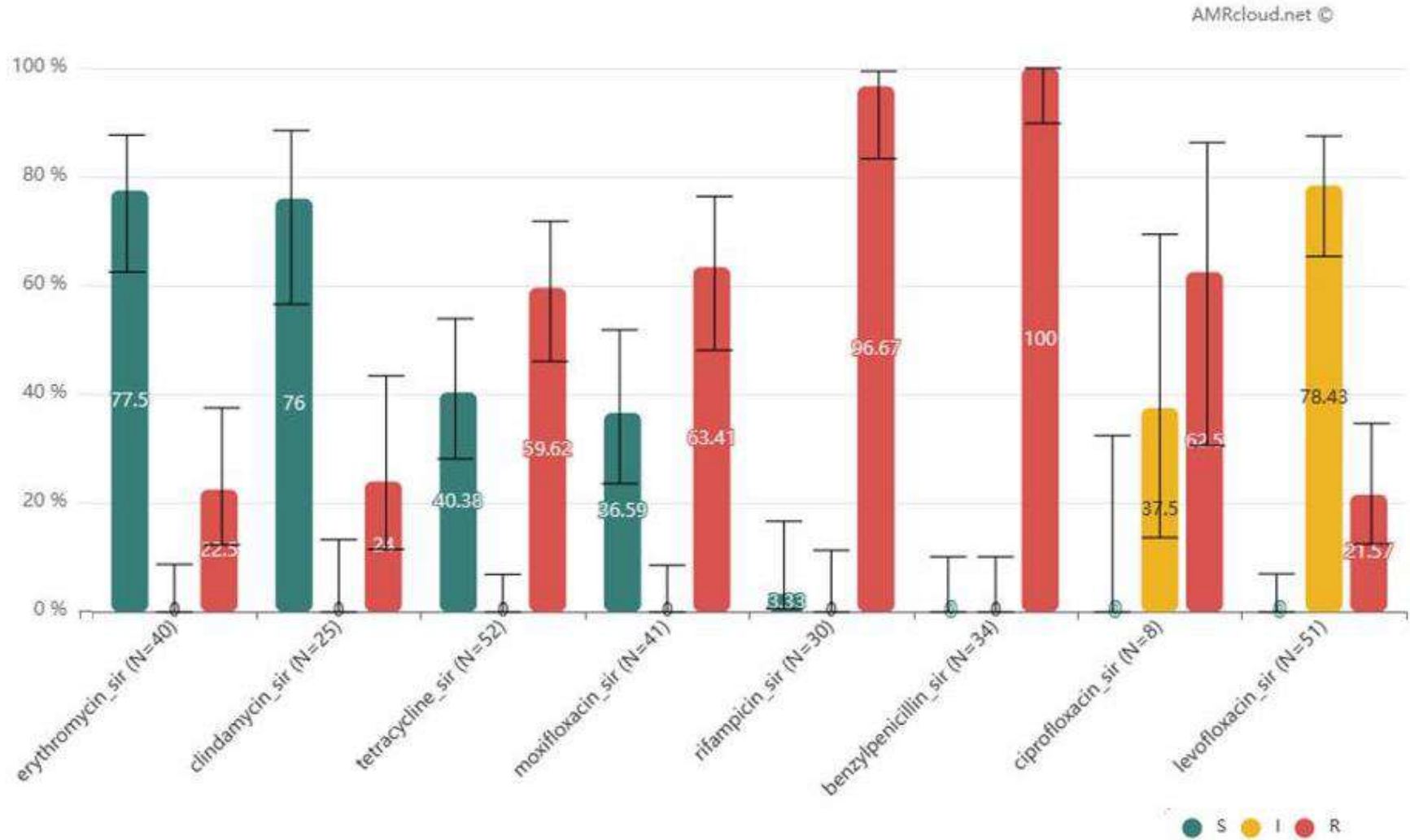


Рисунок 15 – Чувствительность штаммов *S.aureus* к традиционным антимикробным препаратам (продолжение)

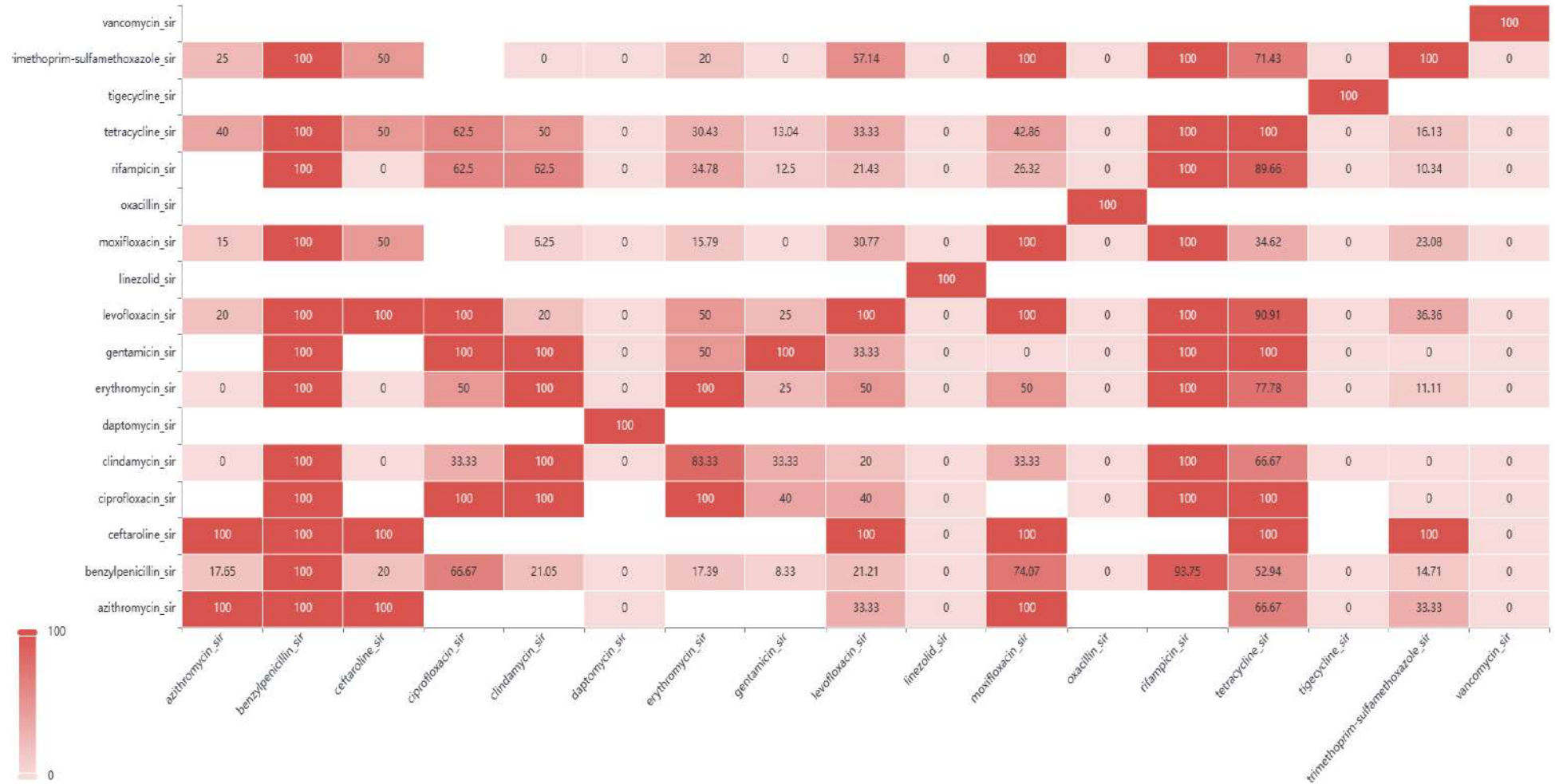


Рисунок 16 – Ассоциированная устойчивость выделенных штаммов *S.aureus* к традиционным противомикробным препаратам

Таблица 3 – Устойчивость выделенных изолятов бактерий к традиционным антимикробным препаратам

АМП	Доля резистентных изолятов (%R) и число резистентных/число выделенных изолятов									
	<i>E.coli</i> (n=38)		<i>P.aureginosa</i> (n=27)		<i>S.pneumoniae</i> (n=20)		<i>S.pyogenes</i> (n=19)		<i>S.aureus</i> (n=52)	
imipenem_sir	3.7%*	1/27	20%**	5/25	–	–	–	–	–	–
meropenem_sir	3.7%*	1/27	0%**	0/7	–	–	–	–	–	–
tigecycline_sir	100%*	19/19	–	–	–	–	–	–	–	–
doripenem_sir	5.26%**	1/19	0%**	0/1	–	–	–	–	–	–
piperacillin-tazobactam_sir	11.11%**	3/27	23.08%**	6/26	–	–	–	–	–	–
ertapenem_sir	11.54%**	3/26	–	–	–	–	–	–	–	–
nitrofurantoin_sir	17.65%**	3/17	–	–	–	–	–	–	–	–
ceftazidime_sir	18.52%**	5/27	15.38%**	4/26	–	–	–	–	–	–
amikacin_sir	22.22%**	2/9	8%**	2/25	–	–	–	–	–	–
aztreonam_sir	25.93%**	7/27	15.38%**	4/26	–	–	–	–	–	–
cefepime_sir	26.32%**	10/38	14.81%**	4/27	42.11%**	8/19	–	–	–	–
levofloxacin_sir	29.63%**	8/27	14.81%**	4/27	10%**	2/20	10.53%**	2/19	21.57%**	11/51
ticarcillin-clavulanic acid_sir	29.63%**	8/27	–	–	–	–	–	–	–	–
amoxicillin-clavulanic acid_sir	33.33%**	4/12	–	–	100%*	19/19	–	–	–	–
trimethoprim-sulfamethoxazole_sir	36.84%**	7/19	–	–	0%**	0/1	–	–	13.46%*	7/52
cefazolin_sir	37.04%**	10/27	–	–	–	–	–	–	–	–
tobramycin_sir	37.5%**	3/8	12%**	3/25	–	–	–	–	–	–
ceftriaxone_sir	47.37%**	18/38	–	–	47.37%**	9/19	–	–	–	–
ceftriaxone meningitis_sir	–	–	–	–	60%**	6/10	–	–	–	–
tigecycline_sir	100%**	19/19	–	–	–	–	0%**	0/6	0%*	0/29

Продолжение Таблицы 3

gentamicin_sir	66.67%**	12/18	–	–	–	–	–	–	11.54%**	3/26
ampicillin-sulbactam_sir	62.5%**	5/8	–	–	–	–	–	–	–	–
ciprofloxacin_sir	70.59%**	12/17	25%**	6/24	–	–	–	–	62.5%**	5/8
ampicillin_sir	89.47%**	17/19	–	–	–	–	–	–	–	–
piperacillin_sir	100%**	8/8	24%**	6/25	–	–	–	–	–	–
ticarcillin_sir	–	–	100%*	20/20	–	–	–	–	–	–
ticarcillin-clavulanic acid_sir	–	–	73.08%**	19/26	–	–	–	–	–	–
linezolid_sir	–	–	–	–	0%*	0/20	0%*	0/19	0%*	0/52
vancomycin_sir	–	–	–	–	0%*	0/20	0%*	0/19	0%*	0/52
moxifloxacin_sir	–	–	–	–	0%**	0/1	–	–	63.41%**	26/41
cefotaxime_sir	–	–	–	–	15.79%**	3/19	–	–	–	–
cefotaxime meningitis_sir	–	–	–	–	52.94%**	9/17	–	–	–	–
chloramphenicol_sir	–	–	–	–	20%**	4/20	–	–	–	–
azithromycin_sir	–	–	–	–	73.68%**	14/19	76.92%**	10/13	14.29%**	3/21
erythromycin_sir	–	–	–	–	75%**	15/20	84.21%**	16/19	22.5%**	9/40
tetracycline_sir	–	–	–	–	75%**	15/20	78.95%**	15/19	59.62%**	31/52
cefuroxime_sir	–	–	–	–	78.95%**	15/19	–	–	–	–
daptomycin_sir	–	–	–	–	–	–	40%**	4/10	0%*	0/31
rifampicin_sir	–	–	–	–	–	–	–	–	96.67%*	29/30
benzylpenicillin_sir	–	–	–	–	–	–	–	–	100%*	34/34
oxacillin_sir	–	–	–	–	–	–	–	–	0%**	0/15
ceftaroline_sir	–	–	–	–	–	–	–	–	16.67%**	1/6
clindamycin_sir	–	–	–	–	–	–	–	–	24%**	6/25

* – точность результата $\geq 80\%$;** – точность результата $< 80\%$

устойчивость к следующим антибиотикам – тетрациклин, моксифлоксацин, рифампицин, бензилпенициллин и ципрофлоксацин (Рисунок 15).

На рисунке 16 представлена ассоциированная устойчивость выделенных штаммов *S.aureus* к традиционным противомикробным препаратам. Резистентность всех выделенных изолятов бактерий представлена в таблице 3.

Все полученные микроорганизмы были различны по своей чувствительности к традиционным антимикробным препаратам и были использованы в дальнейшем исследовании.

3.3 Исследование антимикробной активности исследуемых соединений

3.3.1 Оценка антибактериального потенциала

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 грамотрицательным и грамположительным тестерным и опытным штаммам микроорганизмов и ее сравнение с ранее исследованными соединениями производными 4-, 5-, 6-, 7-бензаминоиндолов (Таблица 4,5).

С помощью применения метода серийных разведений в жидкой питательной среде и диско-диффузионного метода оценивали антимикробную активность *in vitro*.

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.

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.

Таблица 4 – Противомикробная активность исследуемых соединений в отношении тест-штаммов микроорганизмов (метод серийных разведений)

№ п/п	Шифр исследуемого соединения	Для <i>S.aureus</i> 6538-P , 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	6 D*	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0

Продолжение Таблицы 4

№ п/п	Шифр исследуемого соединения	Для <i>S.aureus</i> 6538-P , 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
18	17*	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0
19	3 D*	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0
20	2 D*	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0
21	64 D*	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0
22	32 D*	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0
23	43 D*	125.0	125.0	≤ 250.0	62.5	≤ 250.0
24	243 D*	125.0	125.0	≤ 250.0	125.0	≤ 250.0
25	235 D*	125.0	125.0	250.0	62.5	250.0
26	66 D*	125.0	125.0	≤ 250.0	125.0	≤ 250.0
27	39 D*	31.25	31.25	250.0	31.25	≤ 250.0
28	1 D*	≤ 250.0	≤ 250.0	≤ 250.0	125.0	≤ 250.0
29	4 D*	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. Batarsheva (Maseykina) // Bulletin of Russian State Medical University. – 2019. – № 2. – P. 57-64.

Таблица 5 – Противомикробная активность исследуемых соединений в отношении опытных штаммов микроорганизмов (метод серийных разведений)

№ 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	Дпоксидин	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	Фосфомцин	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
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

Продолжение Таблицы 5

№ п/п	Шифр исследуемого соединения	Для <i>Staphylococcus</i> <i>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
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.

Вышеуказанные соединения демонстрируют активность, превышающую таковую препаратов сравнения бензалкония хлорида, хлоргексидина биглюконата, диоксида, нитрофурантоина и фосфомицина.

Также противомикробная 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. et al., 2018]. МПК исследуемых соединений значительно ниже по сравнению с производными фторзамещенных 4-, 6-, 7-аминоиндолов, таким образом, исследуемые соединения превосходят фторзамещенные производные по антимикробной активности.

Согласно результатам диско-диффузионного метода, антибактериальное действие рассмотренных соединений проявляется как в отношении грамотрицательных, так и грамположительных бактерий (Рисунок 17). Результаты выполненного анализа представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Противомикробная активность исследуемых соединений относительно опытных штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Клинический штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)			
	T1	T4	T7	T12
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=5)	20±4	19±5	19±4	21±3
<i>Escherichia coli</i> (n=5)	19±2	20±3	20±5	20±2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=5)	20±2	20±4	19±3	21±3

Примечание: соединение высокоактивно – полное отсутствие роста в диаметре >25 мм; соединение активно – полное отсутствие роста в диаметре 16-25 мм; соединение малоактивно – полное отсутствие роста в диаметре 10-15 мм; соединение неактивно – задержка роста не наблюдается.

В результате изучения представленной группы соединений мы обнаружили следующее. Из подгруппы веществ, полученных на основе производных замещенных 5-аминоиндолов, наиболее активным является соединение с лабораторным шифром T7 (Таблица 4, 5). Имеет выраженную антимикробную активность к грамположительным коккам, представителям родов *Staphylococcus*,

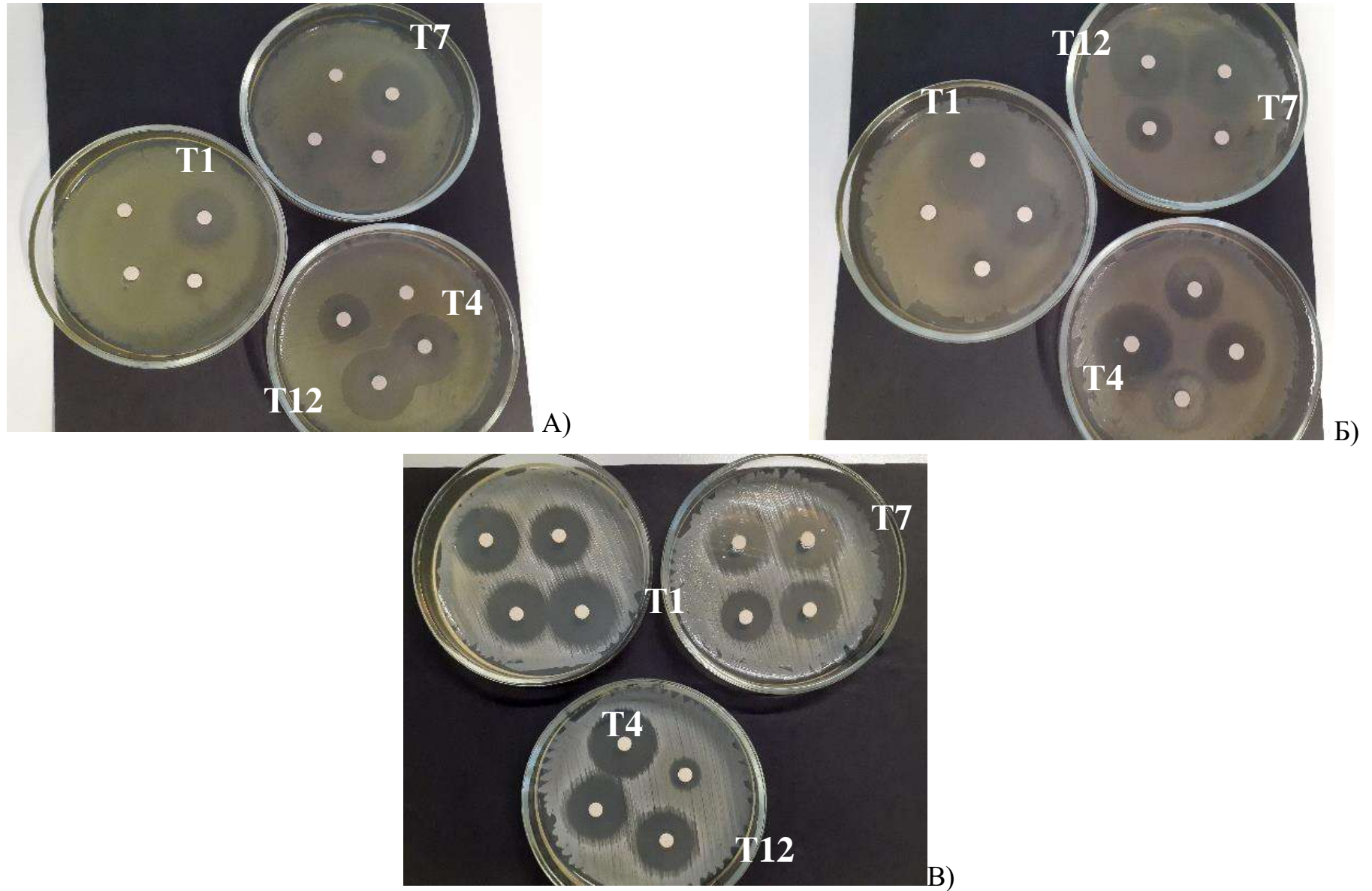


Рисунок 17 – Противомикробная активность исследуемых соединений относительно опытных штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод). А) *P.aeruginosa*; Б) *E.coli*; В) *S.aureus*.

Streptococcus, активно подавляет рост грамотрицательных микроорганизмов, представителей рода *Escherichia*, *P.aeruginosa*.

Из группы производных 7-аминоиндолов, хорошую противомикробную активность проявляют амиды с лабораторным шифром **T1** и **T12**.

В группе особенно успешных соединений, полученных на основе 6-аминоиндолов и используемых для биологического этапа исследования, вещество с лабораторным шифром **T4** проявило антимикробную активность. Соединение **T4** высокоактивно против грамотрицательных микроорганизмов, включая *P.aeruginosa*.

При этом, отмеченные выше соединения не уступают по активности препаратам сравнения диоксидину, нитрофурантоину, фосфомицину и мирамистину, хлоргексидину биглюконат и бензалконию хлорид. Соединения с лабораторными шифрами **T2**, **T10** и **T11** оказались менее активны как в отношении грамотрицательных, так и грамположительных тестерных штаммов микроорганизмов.

Согласно полученным результатам выполненного анализа, антибактериальное действие рассмотренных соединений проявляется как в отношении грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. Для дальнейшего исследования были выбраны 4 соединения 2-хлор-*N*-(2,3-диметил-1*H*-индол-7-ил)ацетамид (**T1**), 2-хлор-*N*-(5-метокси-2,3-диметил-1*H*-индол-6-ил)ацетамид (**T4**), 2-хлор-*N*-(1,2,3-триметил-2,3-1*H*-индол-5-ил)ацетамид (**T7**), монохлорацетат 2,3-диметил-1*H*-индол-7-аммония (**T12**). Выбор осуществлялся исходя из биологической активности, оптимального соотношения антибактериального потенциала, способа получения и растворимости в воде.

3.4 Исследование воздействия исследуемых соединений на клеточную стенку прокариот

В ходе исследования, направленного на оценку воздействия тестируемых соединений на целостность клеточной стенки микроорганизмов *S.aureus* 6538-Р и

E.coli 25922 ATCC, было установлено, что все проверяемые соединения способствуют нарушению взаимодействия красителя кристаллический фиолетовый с клеточной стенкой, что проявляется в уменьшении поглощения клеткой данного красителя (Таблица 7, 8).

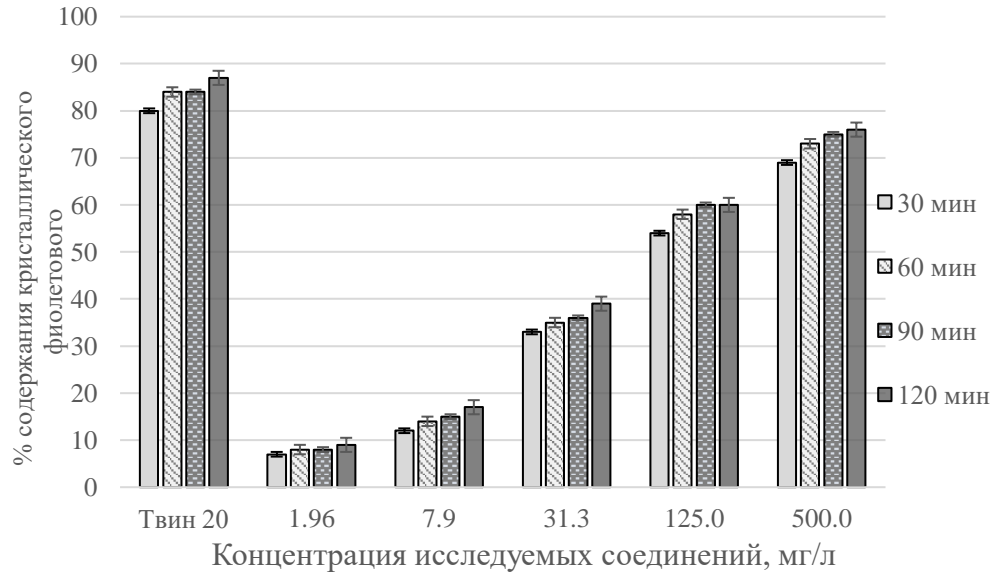
Таблица 7 – Воздействие исследуемых соединений **T1, T4, T7, T12** на клеточную стенку *S.aureus* ATCC 6538-P

Образцы	Концентрация, мг/л	Процент поглощения кристаллического фиолетового микроорганизмом при воздействии противомикробных соединений в жидкой питательной среде			
		30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
T1	1.96	7.1±0.05	8.6±0.50	8.1±0.50	9.4±1.38
	7.9	12.3±1.50	14.2±1.45	15.2±2.23	17.1±2.17
	31.3	33.2±3.05	35.3±3.50	36.3±3.45	39.3±4.45
	125.0	54.5±4.32	58.3±5.78	60.6±6.89	60.3±4.57
	500.0	69.5±3.78	73.4±3.89	75.0±4.78	76.1±4.25
T4	1.96	5.1±0.89	6.1±0.95	6.43±0.98	6.2±0.98
	7.9	10.6±1.23	13.1±1.56	14.5±1.46	14.6±3.79
	31.3	29.9±5.12	31.2±4.34	33.3±2.50	33.2±3.23
	125.0	49.2±5.32	49.6±3.67	50.5±2.55	52.1±1.78
	500.0	59.4±4.56	60.7±2.46	62.5±1.89	63.6±3.00
T7	1.96	6.2±0.10	8.3±1.50	8.2±1.45	8.0±1.65
	7.9	14.2±1.42	15.3±0.67	17.7±2.34	18.1±2.81
	31.3	32.4±2.06	33.4±1.56	34.5±4.34	34.4±3.76
	125.0	51.7±1.73	52.3±1.83	57.5±2.19	57.5±4.29
	500.0	64.1±3.81	68.4±4.80	70.4±6.10	70.5±6.12
T12	1.96	8.1±1.27	9.5±1.34	9.7±1.98	9.1±1.90
	7.9	10.2±1.40	14.1±12.06	17.1±2.12	17.1±1.90
	31.3	31.5±2.76	35.1±4.60	37.4±4.51	37.2±5.90
	125.0	53.5±3.08	56.2±5.70	57.4±5.07	61.2±2.09
	500.0	67.8±5.29	68.2±4.87	71.3±1.73	73.2±1.73
Твин-20 (1% p-p)		80.1±5.78	84.2±4.10	84.9±1.67	87.8±4.39

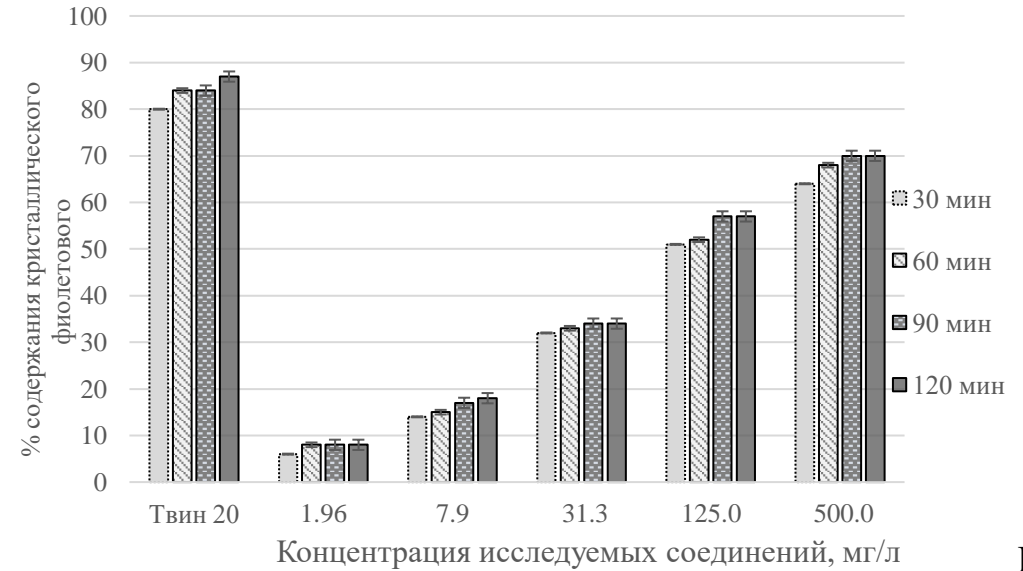
Таблица 8 – Воздействие исследуемых соединений **T1, T4, T7, T12** на клеточную стенку *E.coli* 25922 ATCC

Образцы	Концентрация, мг/л	Процент поглощения кристаллического фиолетового микроорганизмом при воздействии противомикробных соединений в жидкой питательной среде			
		30 мин	60 мин	90 мин	120 мин
T1	1.96	5.0±0.53	6.0±1.60	6.0±1.40	6.0±0.78
	7.9	10.0±1.98	13.0±2.02	14.0±1.65	14.0±2.13
	31.3	29.0±3.59	31.0±4.04	33.0±3.05	33.0±3.89
	125.0	49.0±5.60	49.0±5.75	50.0±5.91	52.0±1.56
	500.0	56.0±4.82	59.0±4.90	63.0±5.56	70.0±5.51
T4	1.96	9.0±1.43	9.0±0.45	9.0±1.27	10.0±1.36
	7.9	10.0±2.59	14.0±1.90	17.0±2.61	17.0±2.65
	31.3	33.0±3.70	35.0±3.27	36.0±3.80	39.0±5.02
	125.0	54.0±4.08	58.0±3.96	60.0±5.17	60.0±5.19
	500.0	69.0±4.05	73.0±4.08	75.0±4.15	76.0±4.15
T7	1.96	10.0±1.50	13.0±2.03	14.0±1.56	14.0±1.90
	7.9	29.0±2.56	31.0±2.81	33.0±2.81	33.0±3.15
	31.3	49.0±3.15	49.0±4.51	50.0±4.62	52.0±3.48
	125.0	59.0±5.20	60.0±5.30	62.0±4.12	63.0±5.04
	500.0	73.0±6.17	76.0±5.50	79.0±7.10	80.0±4.27
T12	1.96	10.0±1.52	10.0±1.93	11.0±1.92	11.0±1.05
	7.9	13.0±1.50	15.0±1.55	19.0±2.55	19.0±5.70
	31.3	32.0±3.44	37.0±4.55	40.0±6.71	40.0±5.80
	125.0	54.0±4.98	58.0±5.13	60.0±5.14	61.0±5.21
	500.0	65.0±5.72	69.0±5.49	74.0±5.14	79.0±5.14
Твин-20 (1% p-p)		80.0±9.50	84.0±9.55	84.0±9.92	87.0±8.45

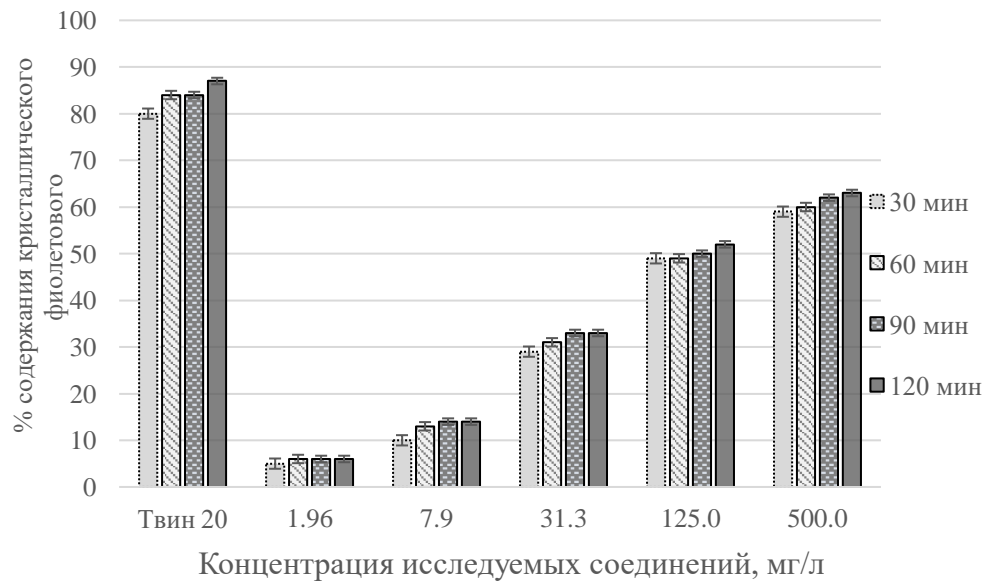
В отсутствии клеток значение оптической плотности пробы, содержащей краситель, принята за 100%. В качестве положительного контроля использовали 1% раствор поверхностно-активного Твина 20. Статистически значимой разницы



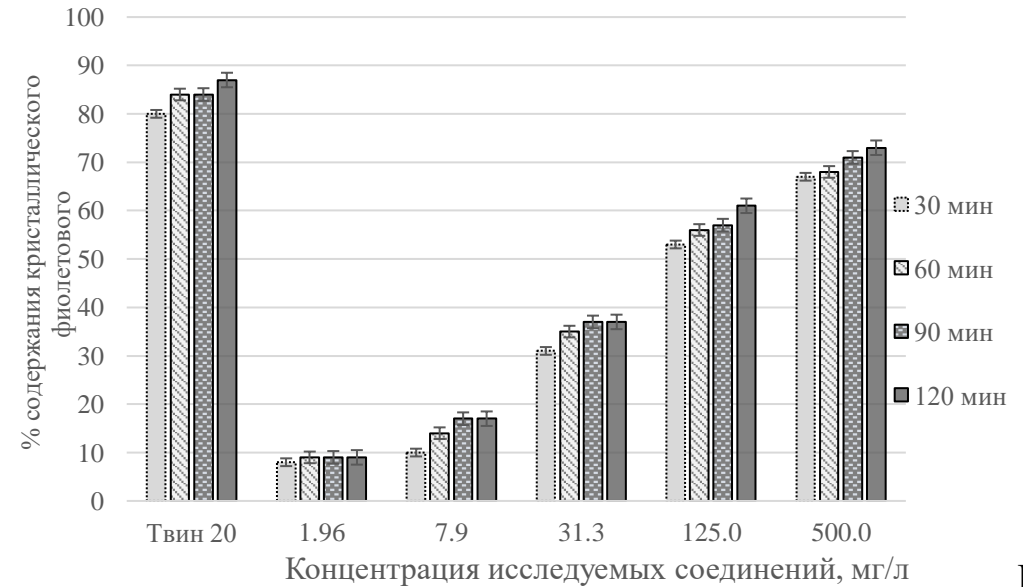
А



Б



В



Г

Рисунок 18 – Поглощение кристаллического фиолетового *S. aureus* ATCC 6538-P, в присутствии соединений с лабораторными шифрами Т1 (А), Т4 (В), Т7 (Б), Т12 (Г). Показаны средние значения \pm стандартное отклонение для трёх повторов.

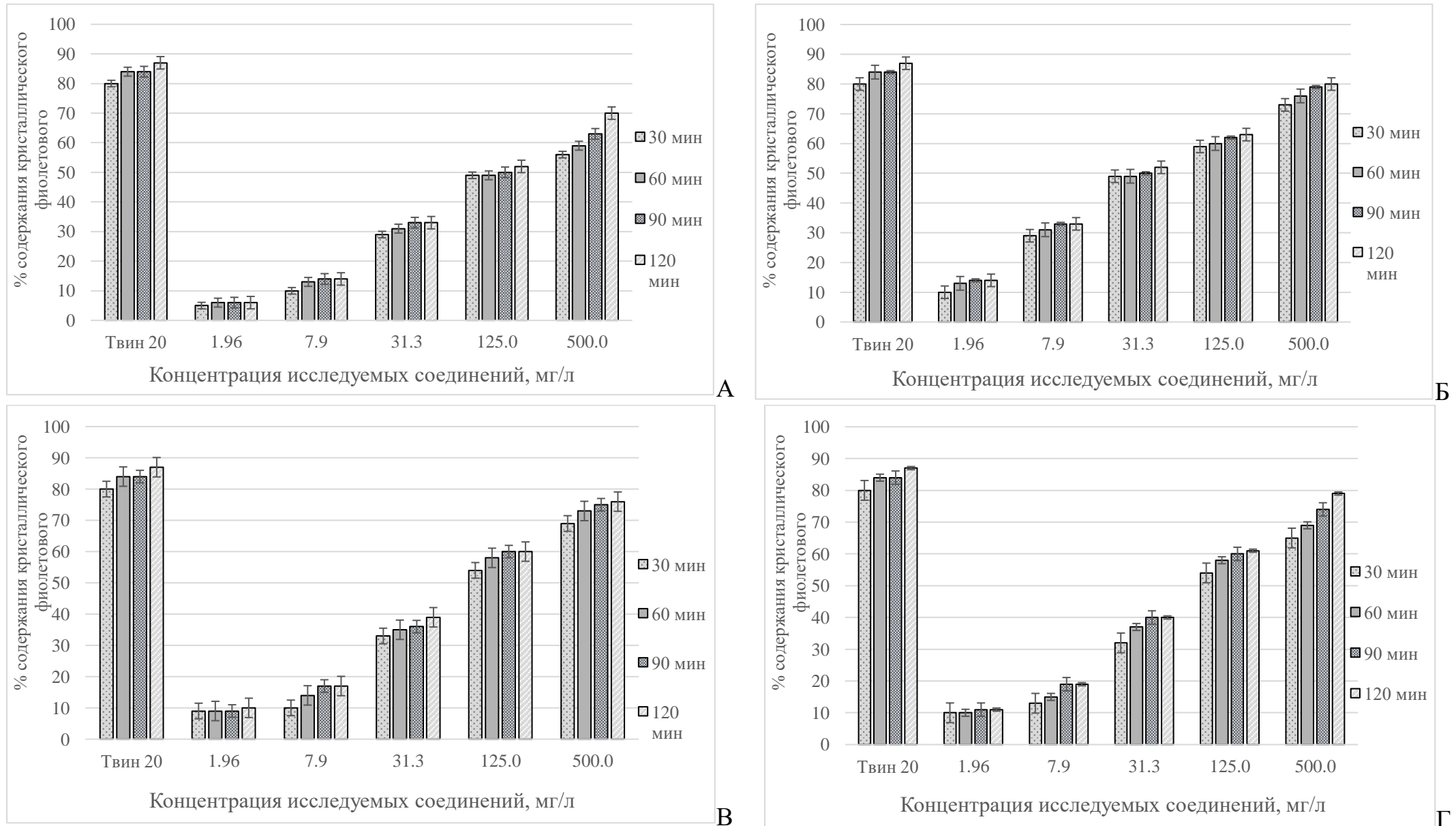


Рисунок 19 – Поглощение кристаллического фиолетового *E.coli* 25922 ATCC, в присутствии соединений с лабораторными шифрами Т1 (А), Т4 (В), Т7 (Б), Т12 (Г). Показаны средние значения \pm стандартное отклонение для трёх повторов.

($p \leq 0.05$) у исследуемого соединения с лабораторным шифром **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 (Рисунок 18, 19). Исследуемые соединения **T1**, **T4**, **T7**, **T12** обладают мембраноповреждающим действием в отношении грамположительных *S.aureus* ATCC 6538-P и грамотрицательных *E.coli* ATCC 25922.

3.5 Оценка морфоструктурных повреждений бактериальных клеток под воздействием исследуемых соединений

В данном разделе представлены результаты из материалов статьи автора диссертации [Масейкина А.А. и др., 2023]. Выполнен анализ морфологических изменений микробных клеток под воздействием хлорсодержащих производных 5-, 6-, 7-аминоиндолов. Контрольные клетки, использованные в работе, обладали типичной и нормальной морфологией (Рисунок 20-31, А-В). Статистический анализ морфометрии поверхности клеток в контрольных и опытных образцах не показал значимых изменений в размерах под воздействием соединений с лабораторными шифрами **T1**, **T4**, **T7** и **T12** (Таблица 9).

Таблица 9 – Размеры микробных клеток под воздействием тестируемых соединений в концентрации 500.0 мг/л

Шифр исследуемого соединения	T1		T4		T7		T12	
	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

Однако, важно отметить, что обработка хлорзамещенными производными 5-, 6-, 7-аминоиндолов приводила к явным морфологическим изменениям у *P.aeruginosa*, *S.aureus* и *E.coli*, в отличие от контрольных необработанных клеток. Эти изменения указывают на возможное ухудшение состояния клеточной стенки под воздействием данных соединений.

В сравнении с контрольными необработанными клетками *P.aeruginosa*, *S.aureus* и *E.coli*, обработка хлорзамещенными производными 5-, 6-, 7-аминоиндолов вызывала заметные морфологические изменения, указывающие на ухудшение состояния клеточной стенки.

В колониях *P.aeruginosa* под воздействием **T7** и **T12** наблюдались филаментные клетки (рис. 26Г, 29Г), что может быть связано с возникновением стресса в результате воздействия исследуемых соединений. Такие филаменты образуются в условиях стресса из-за дефектов в клеточном делении, особенно при отделении дочерних клеток [Jones T.H. et al., 2013; Yamaki S. et al., 2021]. Существуют данные, указывающие на то, что подавление синтеза ДНК в бактериях приводит к изменению их морфологии: клетки становятся длиннее, но деление не происходит [Subbalakshmi C. et al., 1997; Rosenberger C.M. et al., 2007]. Обработка **T1**, **T7** и **T12** вызывала деградацию клеточной стенки *P.aeruginosa* (рис. 20Г–Е, 26Г–Е, 29Г–Е), в то время как обработка **T4** приводила к образованию пор на поверхности клетки (рис. 23-Е).

Исследование с применением СЭМ показало заметные морфологические изменения клеточных стенок *S.aureus* после воздействия **T1**, **T4**, **T7** и **T12**, что привело к деформации клеток (рис. 21Г–Е, 24Г–Е, 27Г–Е, 30Г–Е). Эти изменения могут быть связаны с абберациями в липидном составе мембраны, изменением ее текучести и/или нарушением ее целостности, что приводит к лизису клеточной стенки и потере внутриклеточного материала [Андреевская С.Г. и др., 2020; Vajrai V.K. et al., 2017; Cui H. et al., 2015; Greenwood D. et al., 1972].

Обработка клеток *E.coli* **T1**, **T4**, **T7** и **T12** при концентрации 500 мг/л вызывала лизис клеток, хотя некоторые клетки оставались нетронутыми (рис. 22Г–Е, 25Г–Е, 28Г–Е, 31Г–Е). Появление клеточных обломков вокруг целых клеток

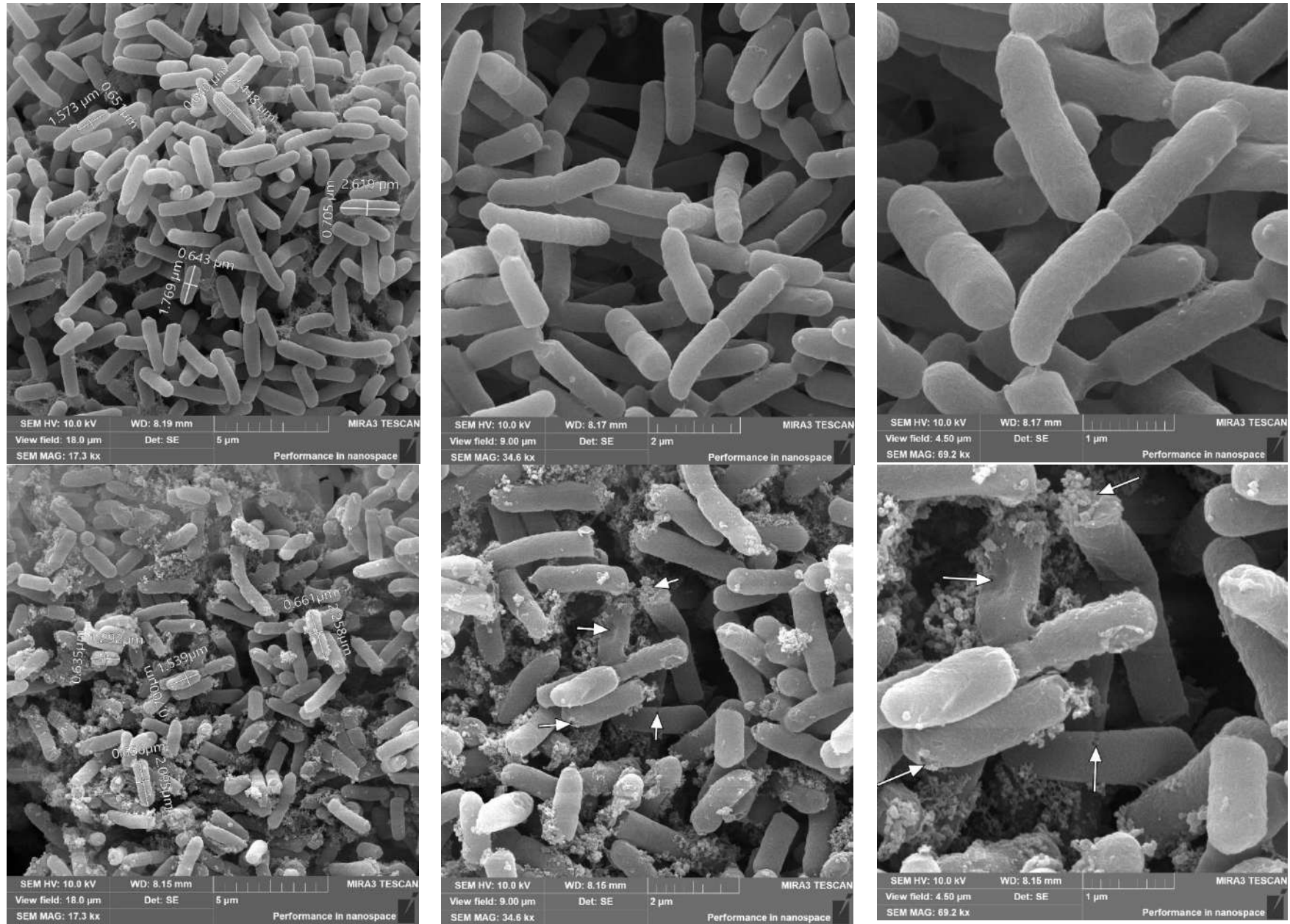


Рисунок 20 – Морфоструктурные изменения *P. aeruginosa* под воздействием 2-хлор-N-(2,3-диметил-1H-индол-7-ил)ацетамида (Т-1). А, Б, В – интактные клетки *P. aeruginosa* без обработки исследуемого соединения.

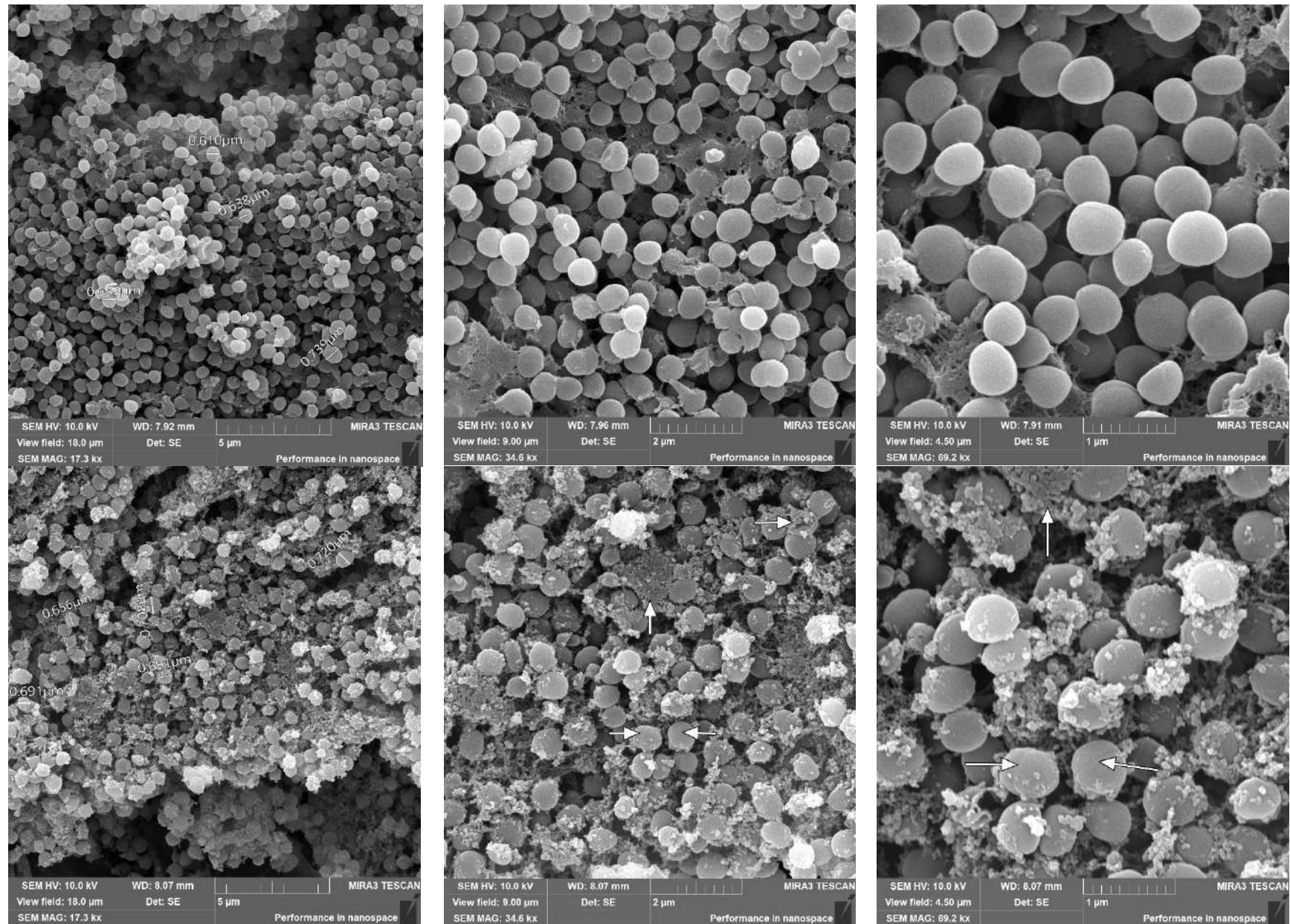


Рисунок 21 – Морфоструктурные изменения *S. aureus* под воздействием 2-хлор-N-(2,3-диметил-1H-индол-7-ил)ацетамида (Т-1). А, Б, В – интактные клетки *S. aureus* без обработки исследуемого соединения.

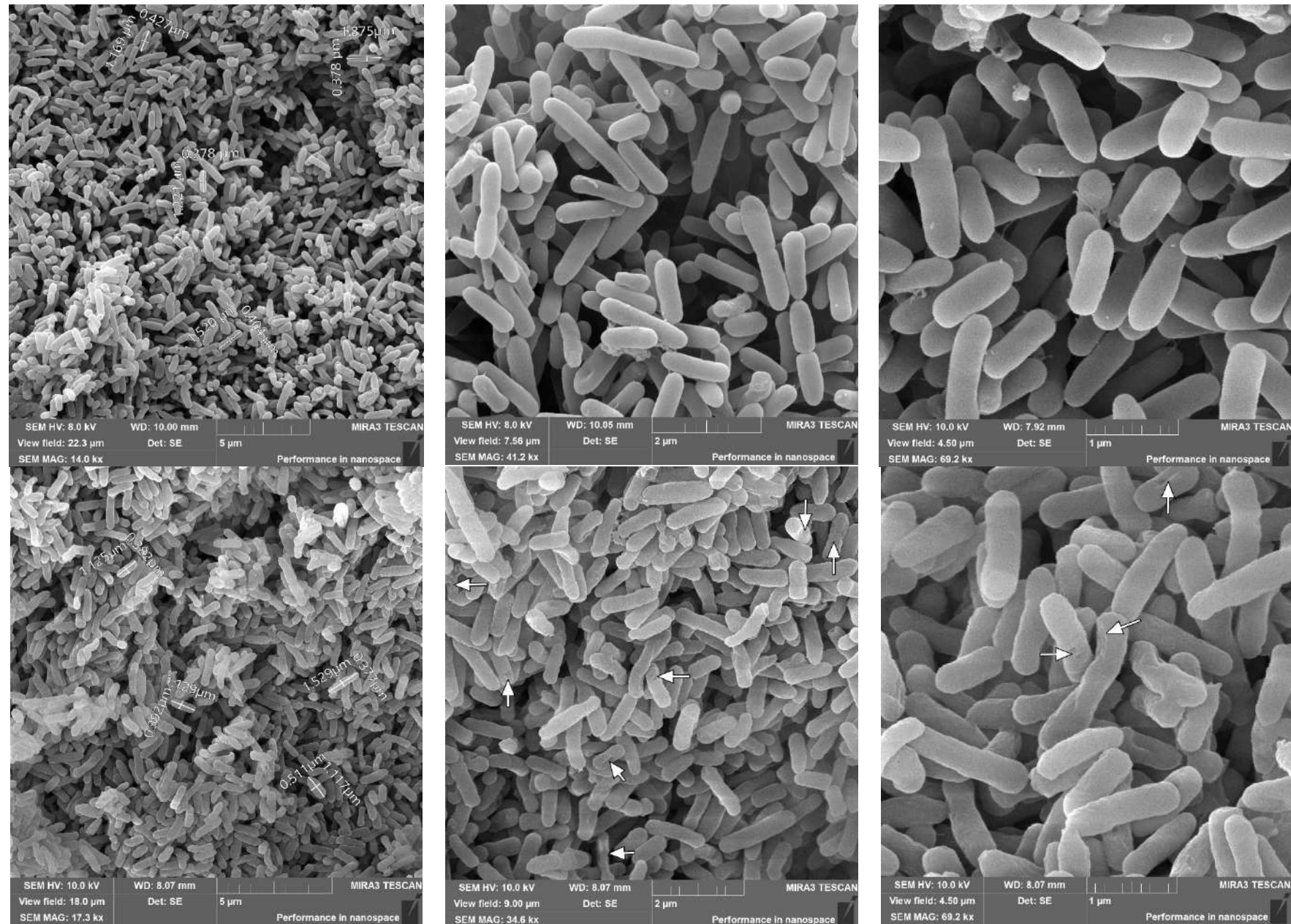


Рисунок 22 – Морфоструктурные изменения *E. coli* под воздействием 2-хлор-N-(2,3-диметил-1H-индол-7-ил)ацетамида (Т-1). А, Б, В – интактные клетки *E. coli* без обработки исследуемого соединения.

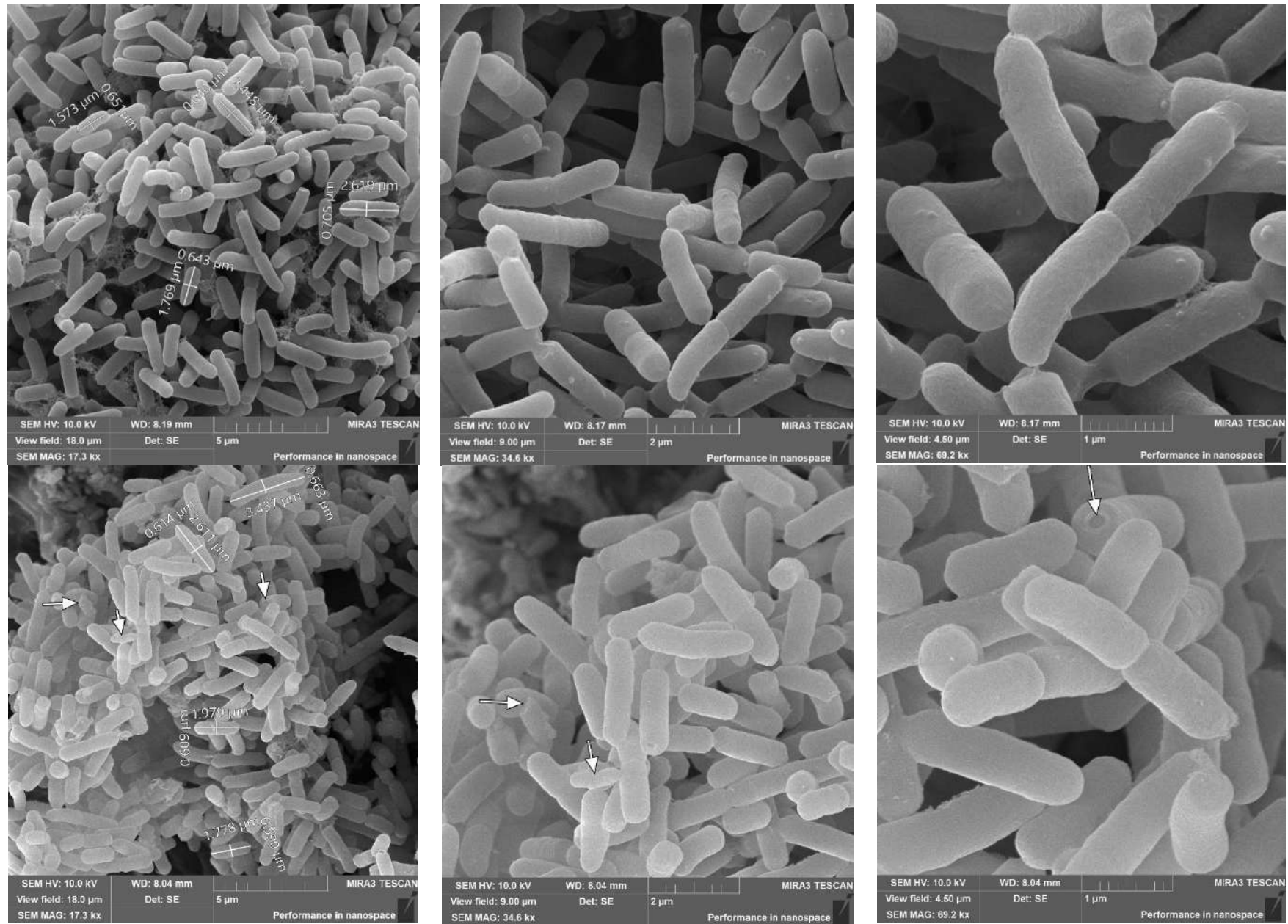


Рисунок 23 – Морфоструктурные изменения *P. aeruginosa* под воздействием 2-хлор-N-(5-метокси-2,3-диметил-1H-индол-6-ил)ацетамида (Т-4). А, Б, В – интактные клетки *P. aeruginosa* без обработки исследуемого соединения.

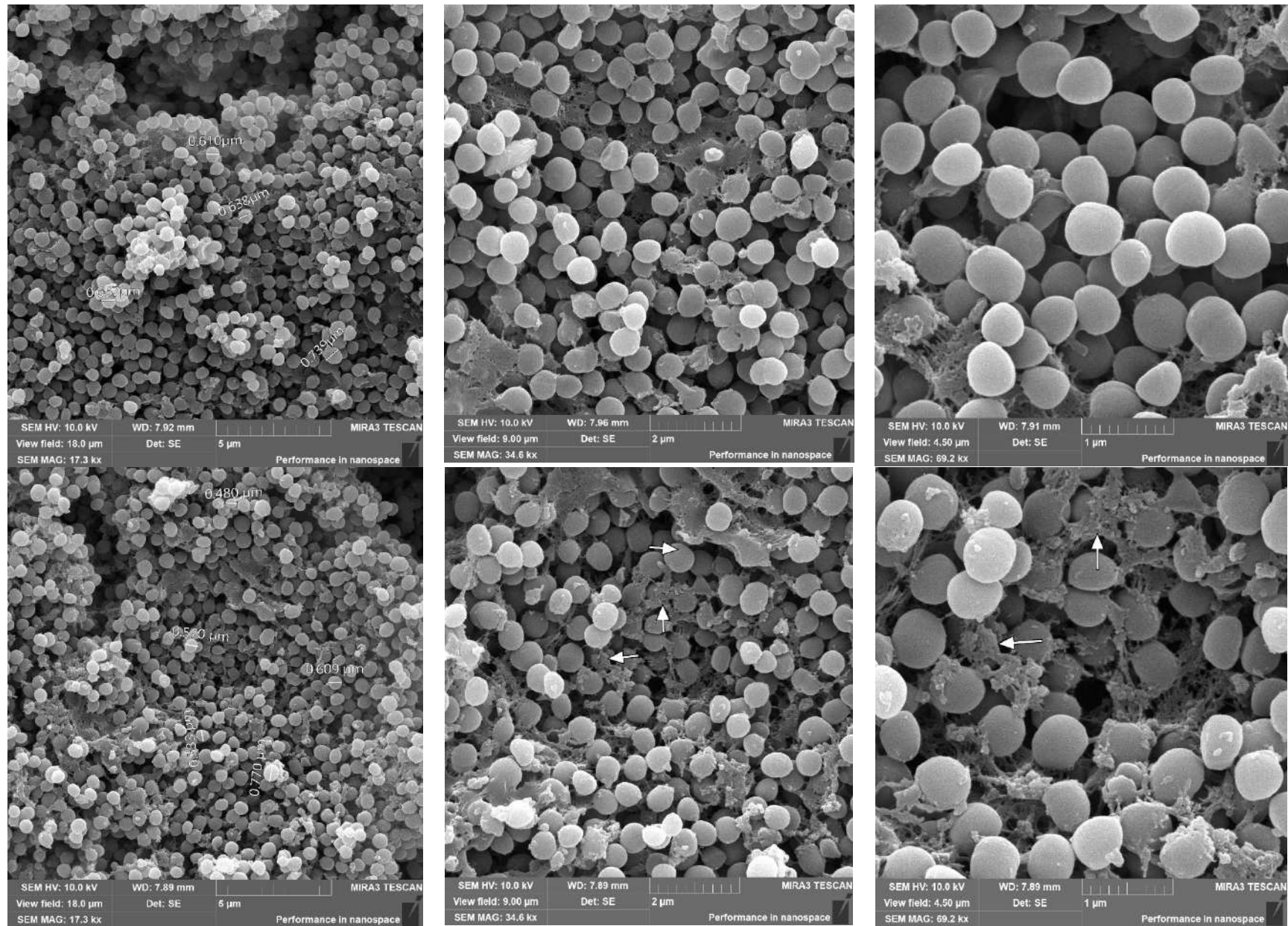


Рисунок 24 – Морфоструктурные изменения *S. aureus* под воздействием 2-хлор-N-(5-метокси-2,3-диметил-1H-индол-6-ил)ацетамида (Т-4). А, Б, В – интактные клетки *S. aureus* без обработки исследуемого соединения.

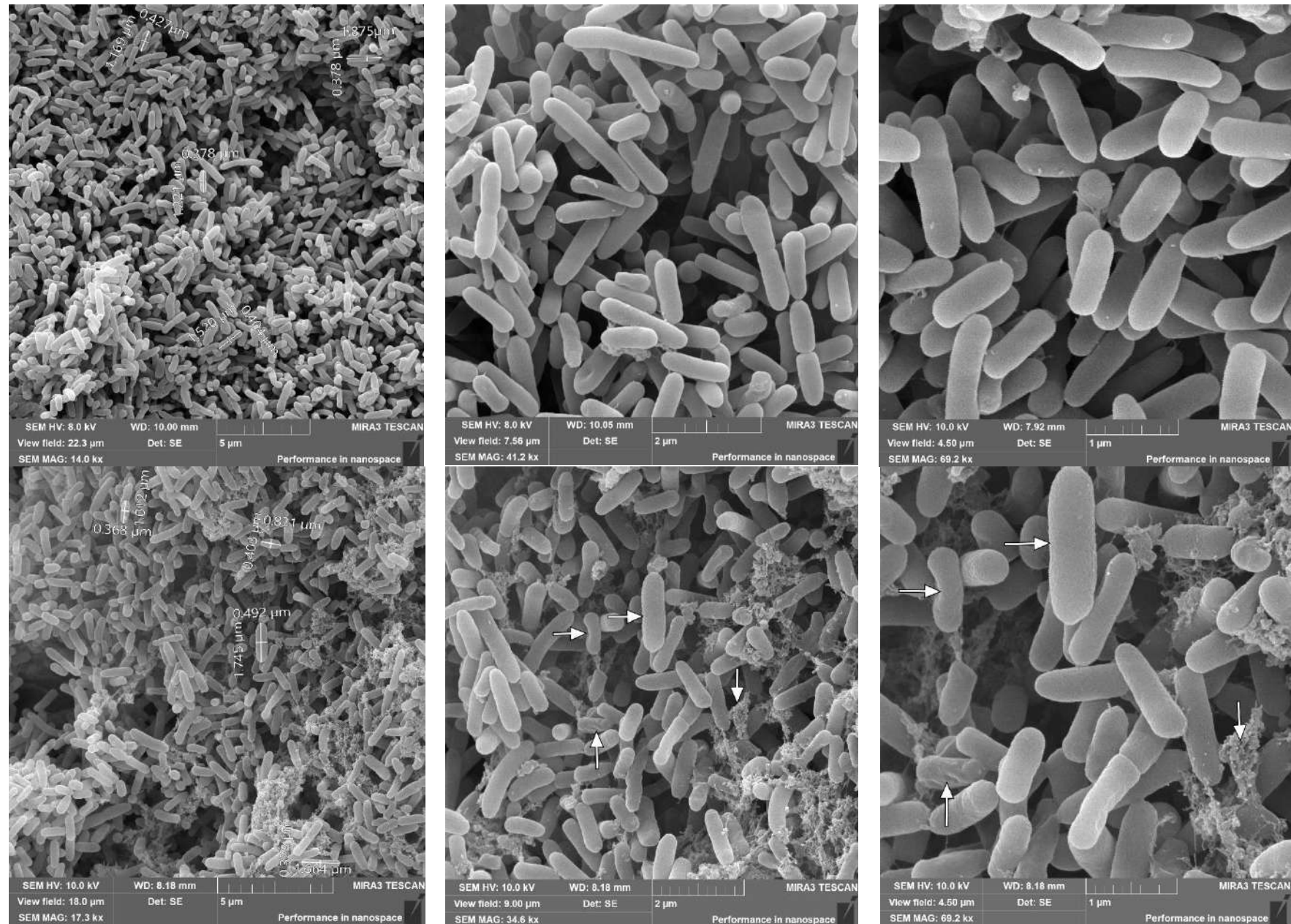


Рисунок 25 – Морфоструктурные изменения *E. coli* под воздействием 2-хлор-N-(5-метокси-2,3-диметил-1H-индол-6-ил)ацетамида (Т-4). А, Б, В – интактные клетки *E. coli* без обработки исследуемого соединения.

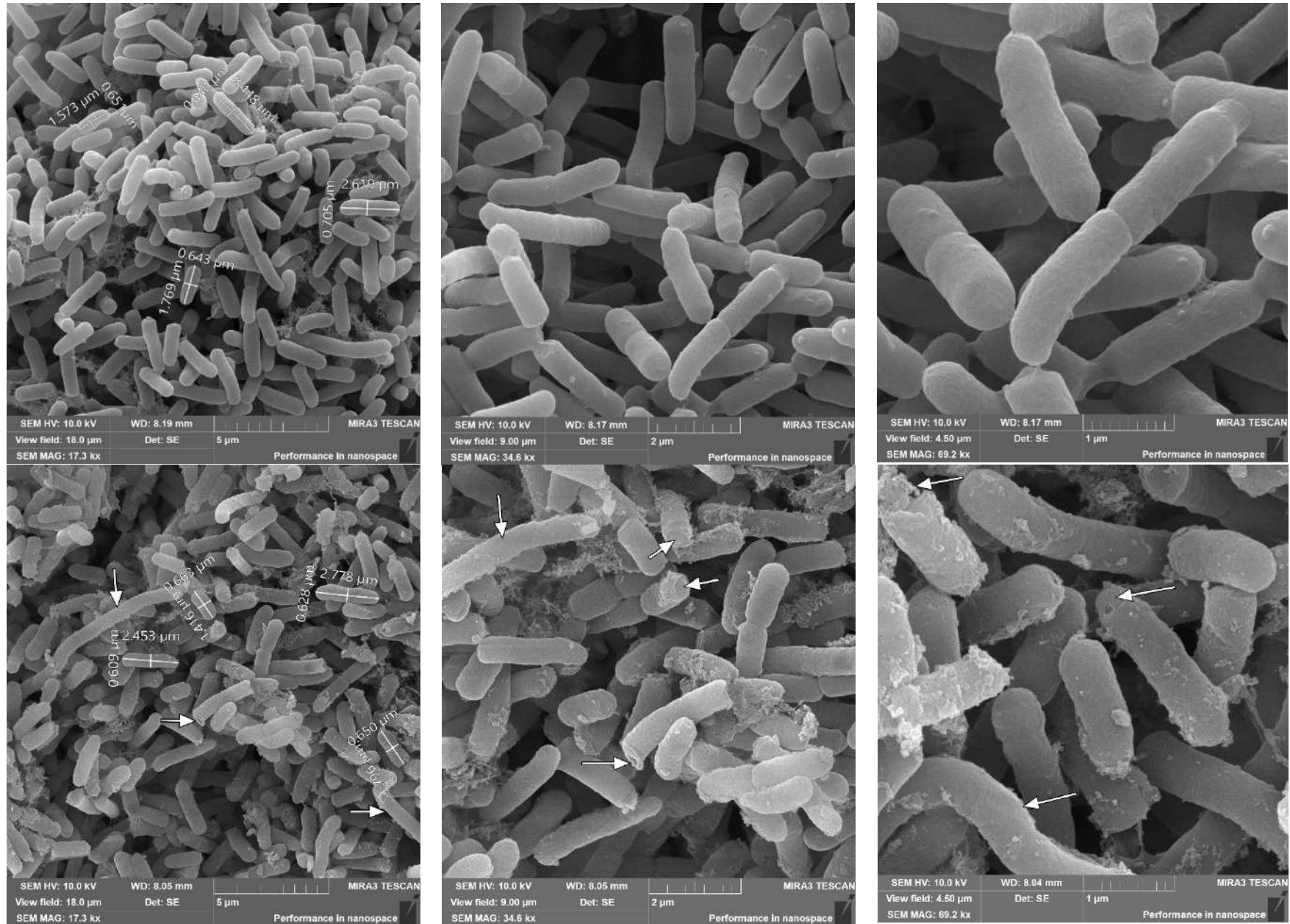


Рисунок 26 – Морфоструктурные изменения *P. aeruginosa* под воздействием 2-хлор-N-(1,2,3-триметил-1H-индол-5-ил)ацетамида (Т-7). А, Б, В – интактные клетки *P. aeruginosa* без обработки исследуемого соединения.

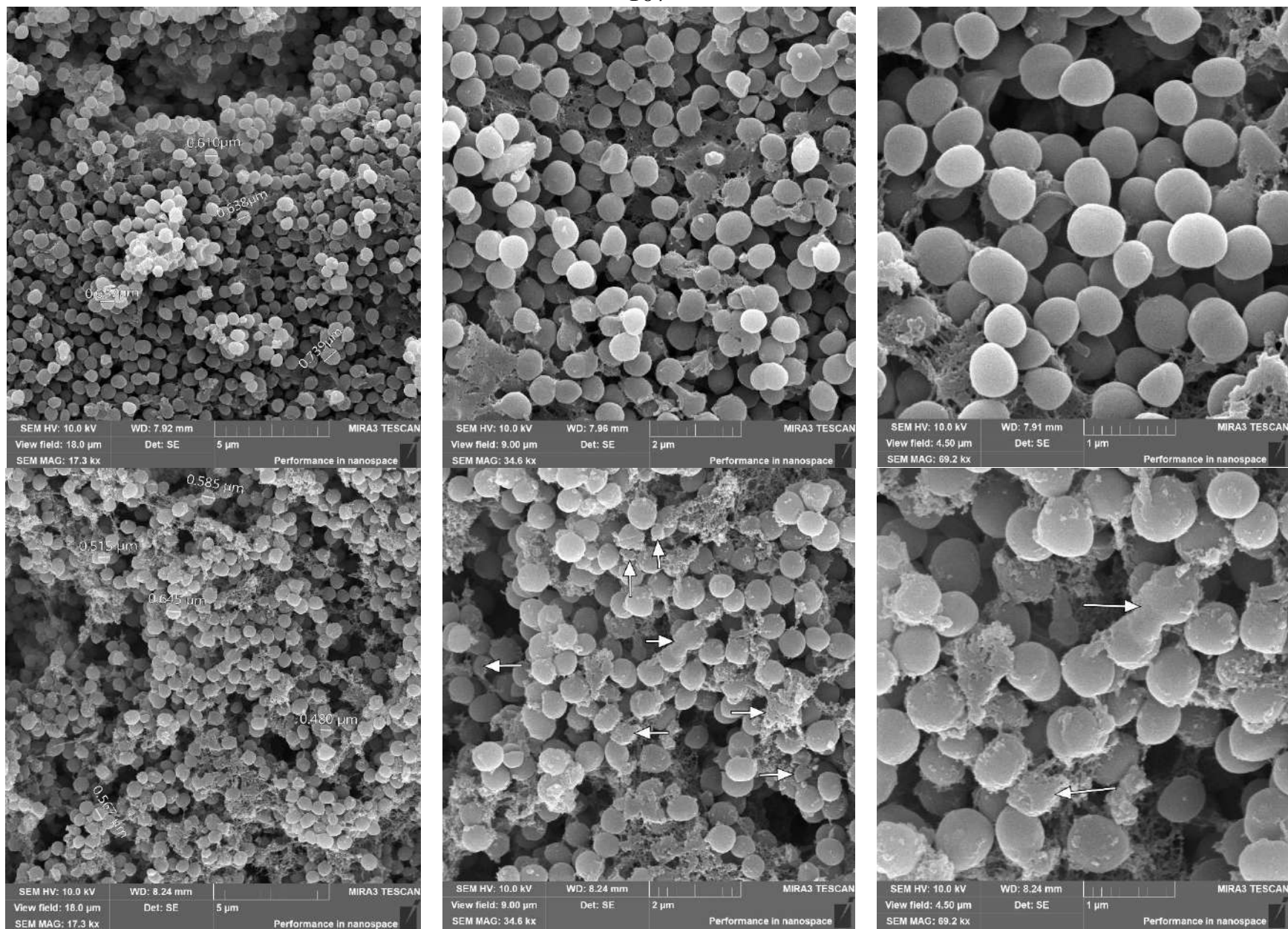


Рисунок 27 – Морфоструктурные изменения *S. aureus* под воздействием 2-хлор-N-(1,2,3-триметил-1H-индол-5-ил)ацетамида (Т-7). А, Б, В – интактные клетки *S. aureus* без обработки исследуемого соединения.

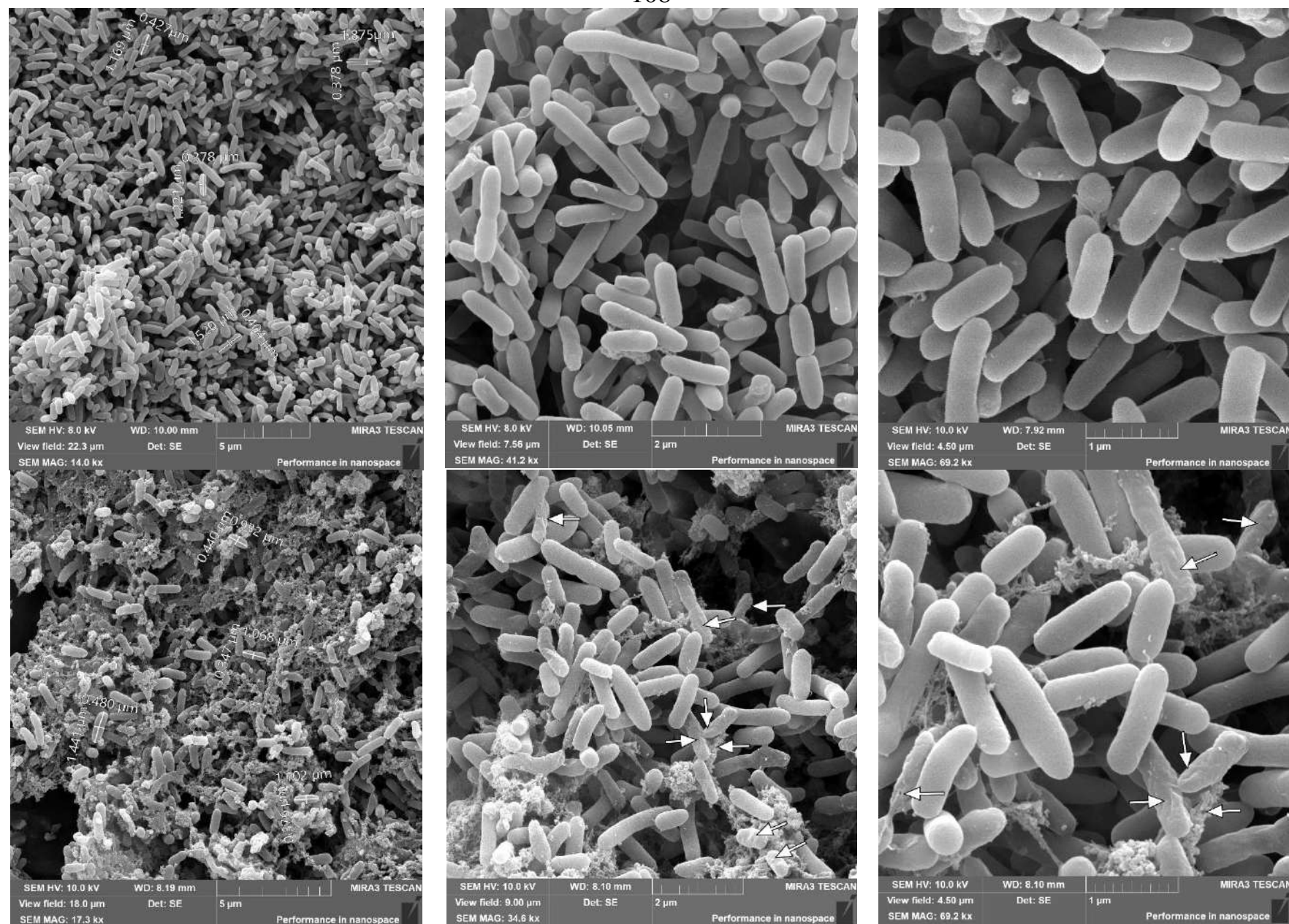


Рисунок 28 – Морфоструктурные изменения *E. coli* под воздействием 2-хлор-N-(1,2,3-триметил-1H-индол-5-ил)ацетамида (Т-7). А, Б, В – интактные клетки *E. coli* без обработки исследуемого соединения.

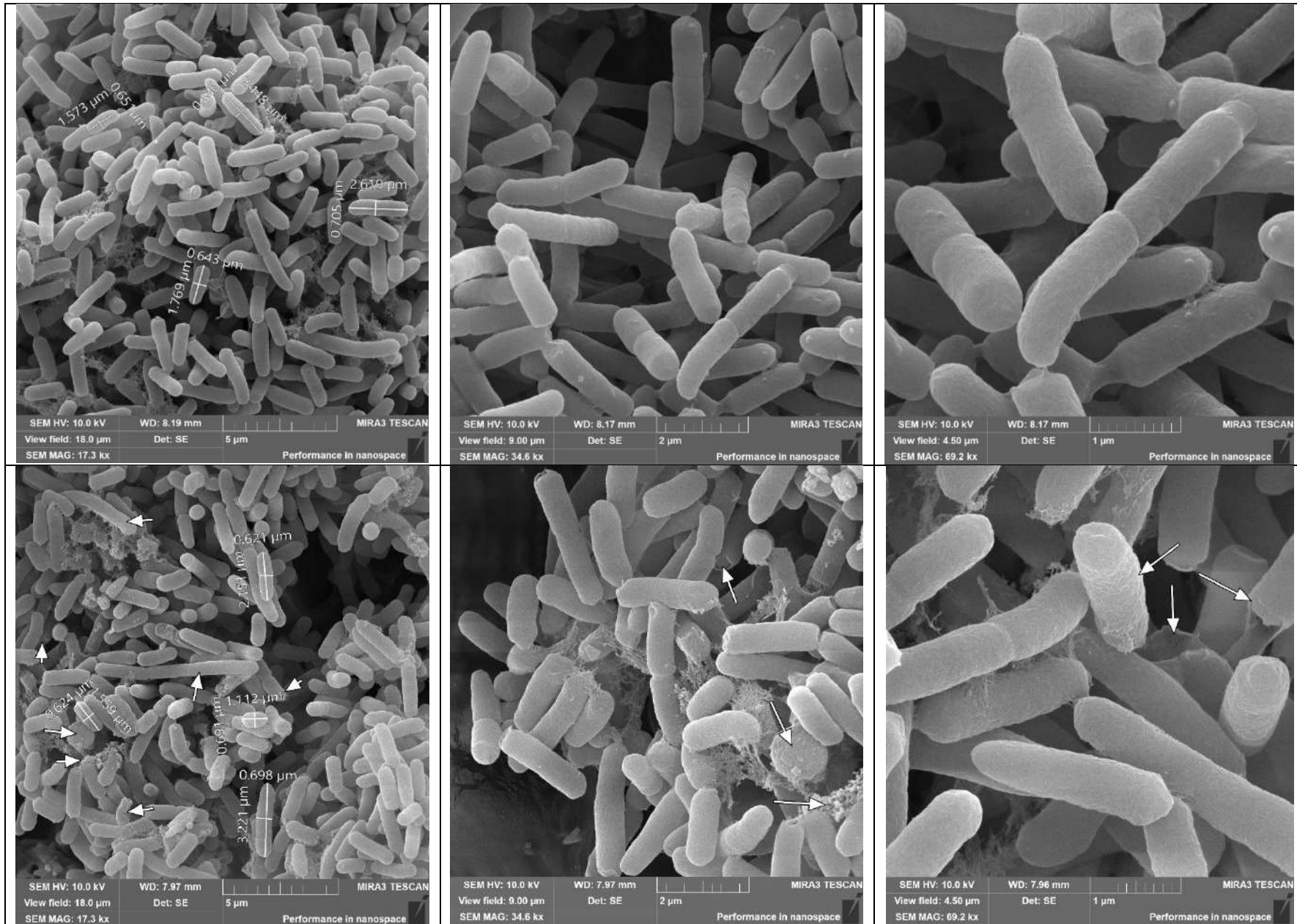


Рисунок 29 – Морфоструктурные изменения *P. aeruginosa* под воздействием монохлорацетат-2,3-диметил-1H-индол-7-аммония (Т-12). А, Б, В – интактные клетки *P. aeruginosa* без обработки исследуемого соединения.

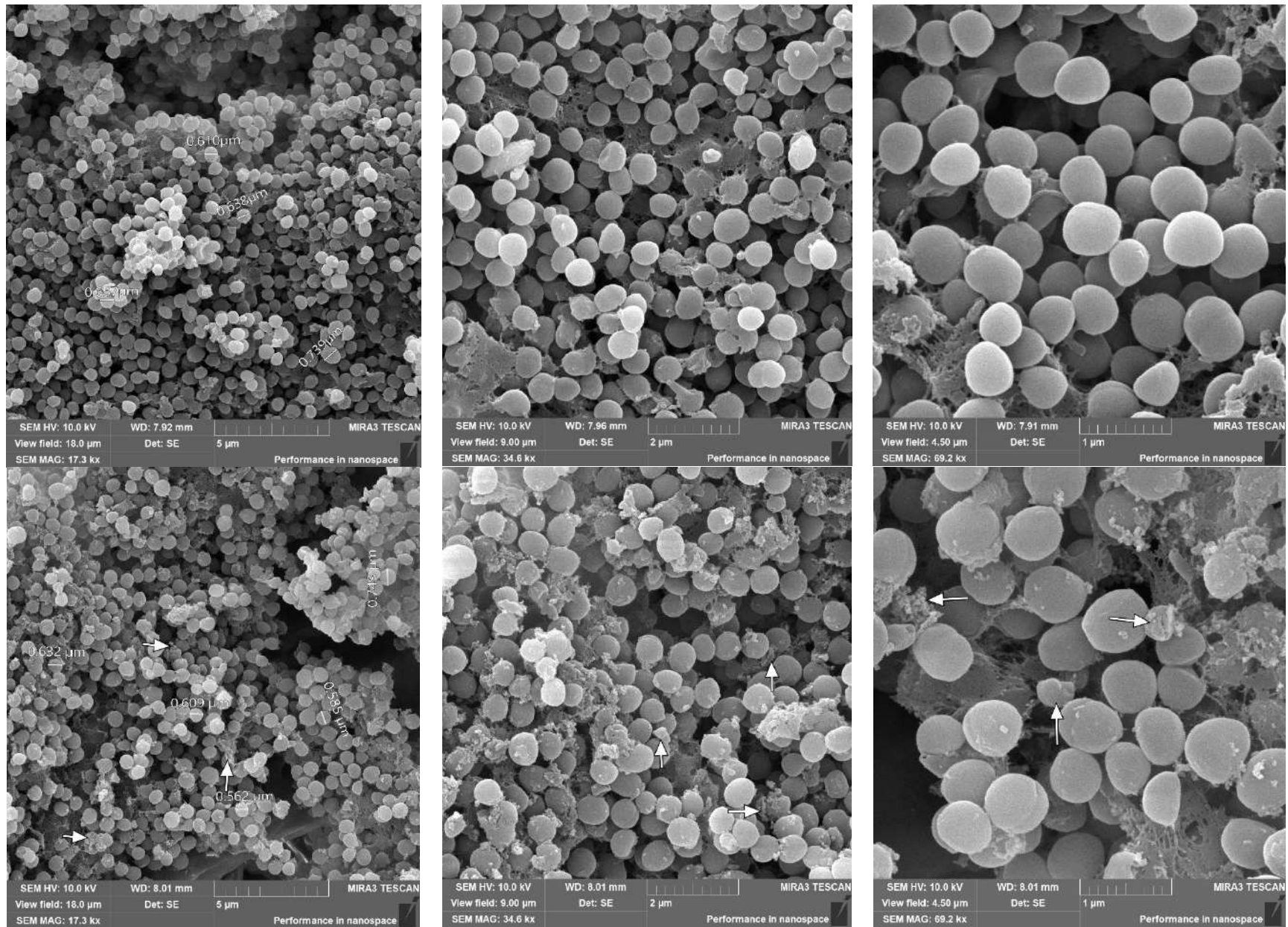


Рисунок 30 – Морфоструктурные изменения *S. aureus* под воздействием монохлорацетат-2,3-диметил-1H-индол-7-аммония (Т-12). А, Б, В – интактные клетки *S. aureus* без обработки исследуемого соединения.

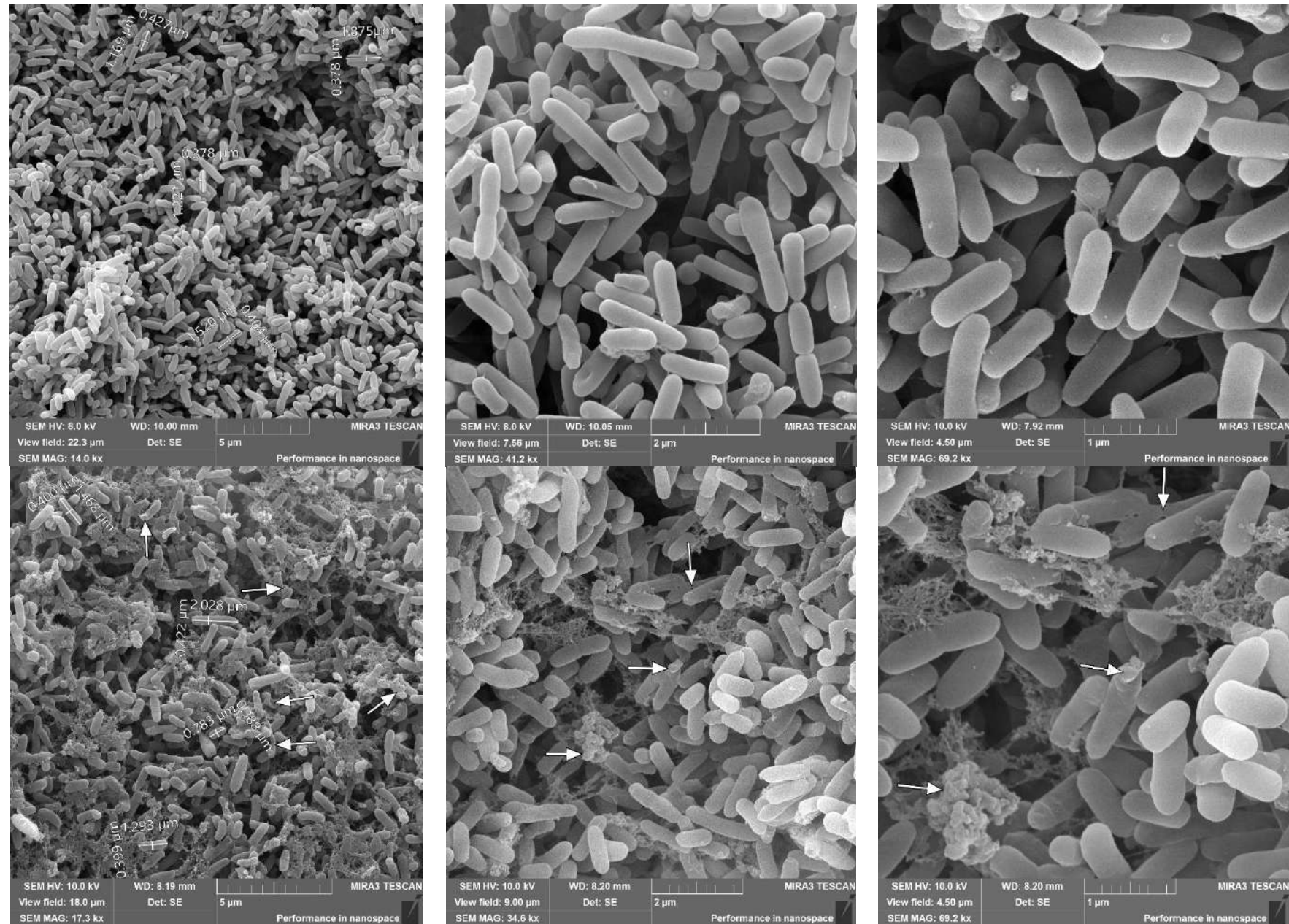


Рисунок 31 – Морфоструктурные изменения *E. coli* под воздействием монохлорацетат-2,3-диметил-1Н-индол-7-аммония (Т-12). А, Б, В – intactные клетки *E. coli* без обработки исследуемого соединения.

E.coli указывает на повреждение мембраны, которое, вероятно, приводит к изменению осмотического давления.

Исследования с использованием СЭМ подтвердили, что хлорзамещенные производные 5-, 6-, 7-аминоиндолов обладают антимикробной активностью против клеток *E.coli*, *S.aureus* и *P.aeruginosa*.

3.6 Оценка типа противомикробного действия исследуемых соединений

При выявлении типа противомикробного действия исследуемые соединения и препараты сравнения культивировали в течение 110 ч, что привело к торможению роста и размножения тестерного штамма *S.aureus* ATCC 6538-Р (Рисунок 32).

Препарат сравнения азитромицин тормозил рост и размножение тестерного штамма *S.aureus* на протяжении 3-х суток (Рисунок 33). Видимый рост микроорганизмов в проходящем свете стал проявляться на 4 день культивирования. Задержка роста и размножения микроорганизмов свидетельствует о способности хлорсодержащих соединений, полученных на основе 5-, 6- и 7-замещенных аминоиндолов оказывать в МПК бактерицидное действие.



Рисунок 32 – Значения оптической плотности питательной среды со *S.aureus* ATCC 6538-Р после экспозиций с исследуемыми веществами и культивировании в течение 24 ч.

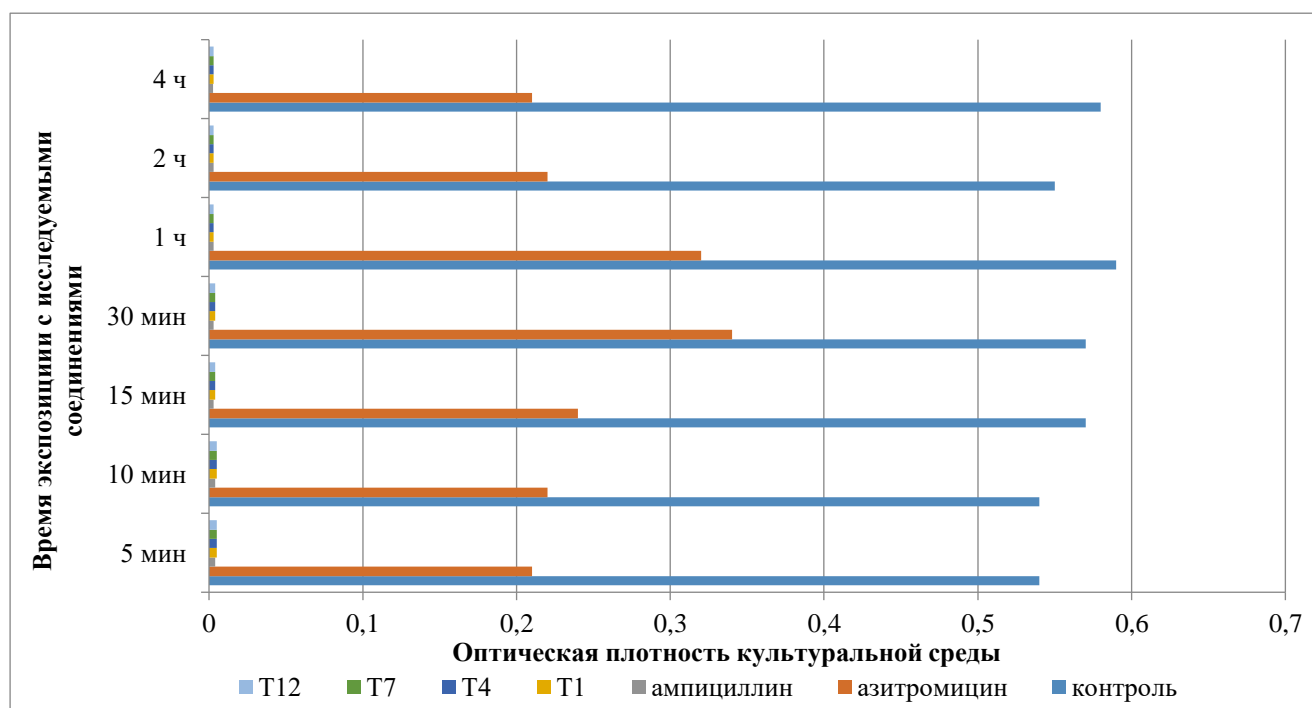


Рисунок 33 – Значения оптической плотности питательной среды со *S. aureus* ATCC 6538-P после экспозиций с исследуемыми веществами и культивировании в течение 110 ч.

Результаты оценки типа противомикробного действия классическим методом представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Значения оптической плотности культуральной среды со *S. aureus* ATCC 6538-P после экспозиций с исследуемыми соединениями Т1, Т4, Т7, Т12

Время исследования	Образцы	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	1 час	2 часа	4 часа
1-е сутки	Азитромицин	0.010	0.010	0.010	0.010	0.030	0.030	0.020
	Ампициллин	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003	0.0029	0.0028
	Т1	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
	Т4	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
	Т7	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
	Т12	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
Контроль		0.220	0.220	0.250	0.260	0.230	0.270	0.250
2-е сутки	Азитромицин	0.090	0.090	0.120	0.150	0.150	0.150	0.110
	Ампициллин	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003	0.0029	0.0028

Продолжение Таблицы 10

Время исследования	Образцы	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	1 час	2 часа	4 часа
	T4	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
	T7	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
	T12	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
3-е сутки	Азитромисин	0.130	0.130	0.170	0.200	0.200	0.190	0.180
	Ампициллин	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003	0.0029	0.0028
	T1	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
	T4	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
	T7	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
	T12	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
4-е сутки	Азитромисин	0.240	0.250	0.270	0.330	0.340	0.250	0.230
	Ампициллин	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003	0.0029	0.0028
	T1	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
	T4	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
	T7	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
	T12	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
5-е сутки	Азитромисин	0.210	0.220	0.240	0.340	0.320	0.220	0.210
	Ампициллин	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003	0.0029	0.0028
	T1	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
	T4	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
	T7	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
	T12	0.005	0.005	0.004	0.004	0.003	0.003	0.003
Контроль		0.540	0.540	0.570	0.570	0.590	0.550	0.580

Результаты оценки типа противомикробного действия с помощью метода, разработанного в ходе исследования, представлены в таблице 11.

Значение коэффициента оптической плотности исследуемых соединений оказалось менее 1, таким образом, соединения, синтезированные на основе замещенных 5-, 6-, 7-аминоиндолов, обладают бактерицидным типом антимикробного действия в отношении тестерных микроорганизмов.

Таблица 11 – Тип противомикробного действия исследуемых соединений

Исследуемое соединение, лабораторный шифр	Коэффициент оптической плотности культуральной среды в ходе культивирования микроорганизмов с противомикробными соединениями в жидкой питательной среде (K _D)		
	<i>S.aureus</i> 6538-P ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC
Ампициллин	0.293	-	0.321
Цефазолин	0.600	-	0.566
Азитромидин	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

Таким образом, благодаря способу определения типа противомикробного действия подтверждено бактерицидное действие исследуемых соединений.

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

При оценке токсичности четырёх соединений в концентрациях 100.0, 500.0 и 1000.0 мкг/чашку оказалось, что в тестируемом диапазоне концентраций соединения не вызывают существенного угнетения роста тестерного штамма *S.typhimurium* TA100. Однако, следует отметить, что выживаемость тестерных бактерий при действии соединений **T7** и **T12** в наивысшей из исследованных концентраций 1000 мкг/чашка составила 57.59% и 53.31% (Таблица 12). Тем не

менее, 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 12 – Влияние соединений **T1**, **T4**, **T7** и **T12** на выживаемость клеток *S.typhimurium* TA100

Образцы	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.

Результаты оценки мутагенного потенциала исследуемых соединений в тесте Эймса представлены в таблице 13. Соединения с лабораторными шифрами **T4** и **T7**, **T12** не вызывали 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 **T1** демонстрировало дозозависимую мутагенную активность как на штамме TA98, так и на штамме TA100, в концентрации 1000.0 мкг/чашку, вызывая превышение числа индуцированных генных мутаций над спонтанным фоном мутирования в 2.46 и в 2.05 раз, соответственно.

Определено отсутствие мутагенных свойств трёх из четырёх потенциальных противомикробных соединений при воздействии на клетки прокариот в условиях *in vitro*. Результаты оценки мутагенного потенциала исследуемых соединений в тесте Эймса представлены на рисунке 34, 35.

Соединения с лабораторными шифрами **T4** и **T7**, **T12** не проявили

мутагенную активность в тесте Эймса. Соединение **T1** демонстрировало дозозависимую мутагенную активность на обоих тестерных штаммах.

Таблица 13 – Мутагенный потенциал соединений **T1**, **T4**, **T7** и **T12** в тесте Эймса на штаммах *S.typhimurium* TA98 и TA100

Образцы	Концентрация мкг/чашку	TA98		TA100	
		Количество His+ ревертантов/ чашку	Превышение над спонтанным фоном мутирования	Количество His+ ревертантов/ чашку	Превышение над спонтанным фоном мутирования
T1	100.0	50.33±2.52	0.97	111.33±9.45	1.06
	500.0	91.67±3.21	1.76	175.0±7.55	1.67
	1000.0	128.0±2.65	2.46*	215.33±5.51	2.05*
T4	100.0	53.67±4.51	1.04	109.33±10.26	1.04
	500.0	56.67±2.51	1.09	152.0±7.21	1.45
	1000.0	60.66±2.52	1.17	161.33±2.08	1.54
T7	100.0	55.0±5.29	1.06	155.67±4.04	1.48
	500.0	61.67±3.21	1.19	160.67±2.52	1.53
	1000.0	81.33±3.06	1.56	168.66±3.06	1.61
T12	100.0	61.33±7.02	1.18	107.67±2.52	1.03
	500.0	64.0±6.08	1.23	112.67±8.39	1.07
	1000.0	92.33±5.03	1.78	116.66±2.52	1.11
Позитивный контроль		398.0±4.58	7.65		
Позитивный контроль				803.66±6.51	7.91
Негативный контроль		52.0±3.61		105.0±2.65	

Примечание: * – значимое превышение числа индуцированных генных мутаций над спонтанным фоном мутирования.

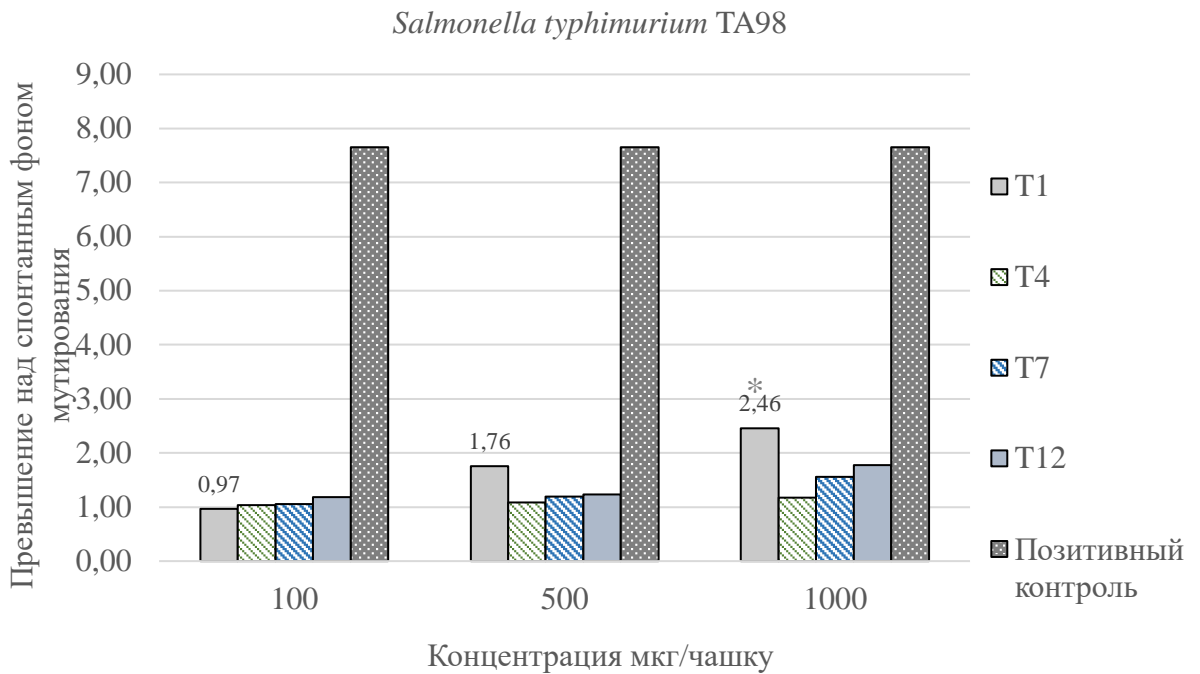


Рисунок 34. Мутагенный потенциал соединений с лабораторными шифрами **T1**, **T4**, **T7** и **T12** в тесте Эймса на штаммах *S.typhimurium* TA98.

Примечание: * – значимое превышение числа индуцированных генных мутаций над спонтанным фоном мутирования.

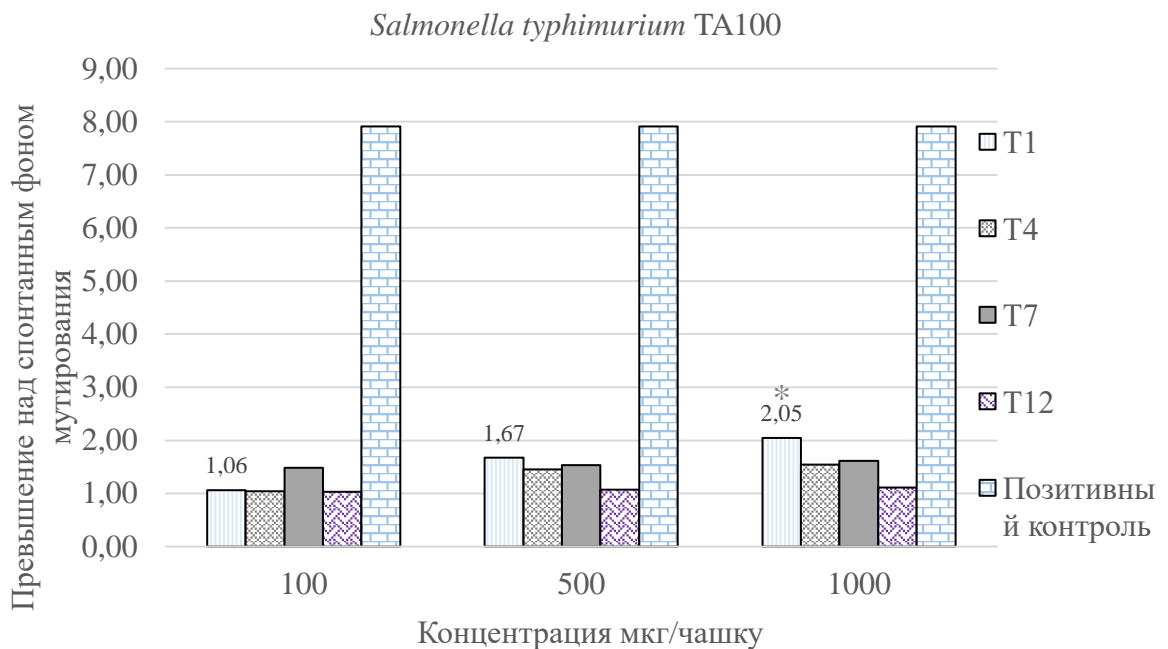


Рисунок 35. Мутагенный потенциал соединений с лабораторными шифрами **T1**, **T4**, **T7** и **T12** в тесте Эймса на штаммах *S.typhimurium* TA100.

Примечание: * – значимое превышение числа индуцированных генных мутаций над спонтанным фоном мутирования.

Исследование соединений в Res-тесте позволило установить, что вещества **T4** и **T7** характеризуются незначительным ДНК-повреждающим эффектом (не более 50%) (Таблица 14).

Таблица 14 – ДНК-повреждающий эффект соединений **T1**, **T4**, **T7** и **T12** в Res-тесте

Образцы	Концентрация, мкг/диск	Диаметр зоны ингибирования роста тестерных штаммов, мм		ДНК- повреждающий эффект, %
		Wp2	гесА	
T1	100.0	21.3±1.52	22.7±2.31	25.0
	500.0	21.4±1.53	24.0±2.00	62.0*
	1000.0	22.7±0.58	25.7±1.53	66.6*
T4	100.0	20.6±0.58	22.0±1.0	25.0
	500.0	21.7±1.15	23.7±1.53	50.0
	1000.0	22.0±1.0	24.33±0.58	57.1
T7	100.0	20.6±1.15	22.0±1.00	24.0
	500.0	20.7±0.58	22.3±1.15	40.0
	1000.0	21.7±0.57	23.6±0.58	50.0
T12	100.0	20.3±0.57	22.0±2.0	40.0
	500.0	21.7±0.58	24.7±1.15	66.7*
	1000.0	22.3±2.08	26.0±1.0	72.7*
Негативный контроль (ДМСО)		20.6±0.58	21.7±0.58	25.0
Позитивный контроль (нитрофурал)	500.0	24.3±1.53	32.7±2.08	88.0

Примечание: * - отличие от контроля (негативный контроль) статистически значимо при $p \leq 0,05$.

Соединение **T1** в концентрациях 500.0 мкг/диск и 1000 мкг/диск вызывало повреждения ДНК, в особенности у мутантного штамма гесА (ДНК-повреждающая активность равнялась 62.0% и 66.6%, соответственно). Для соединения **T12** в

исследованном диапазоне концентраций показан дозозависимый ДНК-повреждающий эффект от 40.0% до 72.7% (Рисунок 36).

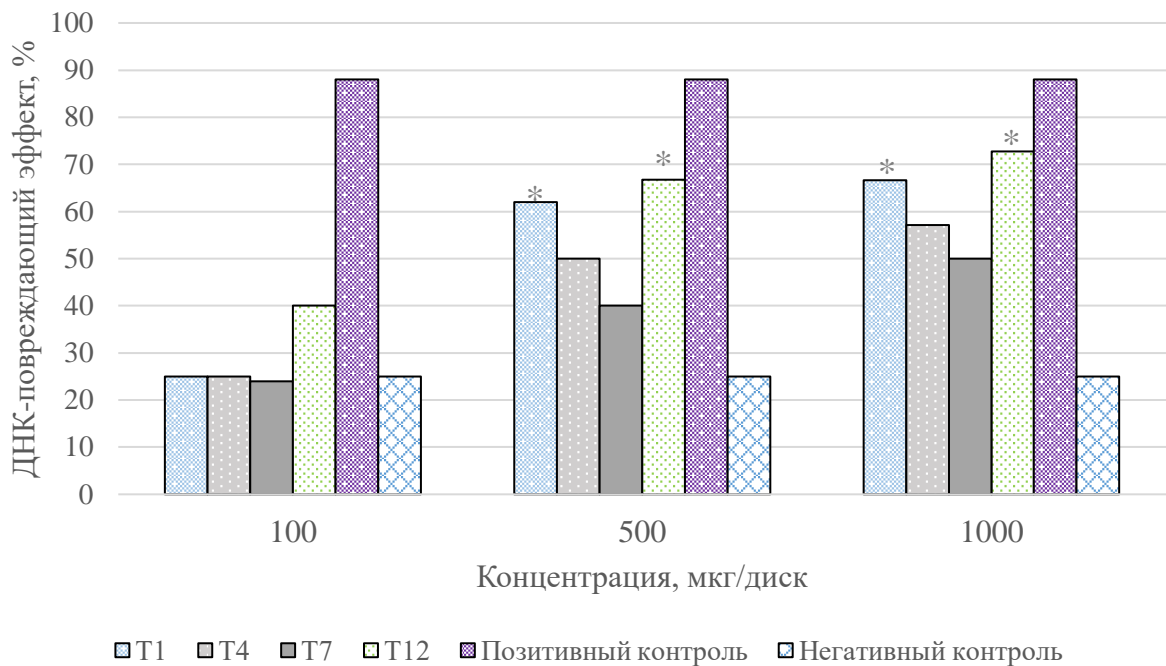


Рисунок 36. ДНК-повреждающий эффект соединений **T1**, **T4**, **T7** и **T12** в Res-тесте. Примечание: * - отличие от контроля (негативный контроль) статистически значимо при $p \leq 0,05$.

Таким образом, два из четырех исследованных соединений – **T4** и **T7** не обладают ДНК-повреждающим эффектом и мутагенным потенциалом. Соединение с лабораторным шифром **T1** демонстрирует ДНК-повреждающий эффект и 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. Соединение **T12** обладает выраженным ДНК-повреждающим потенциалом, в то же время в тесте Эймса наблюдается слабый мутагенный эффект только на штамме TA98.

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 противомикробная активность. Наиболее часто встречающаяся противомикробная активность тестируемых соединений связана с ингибированием псевдолизина и системы омптинов. Показано, что новая группа соединений из двенадцати монохлорацетатов замещенных 5-,6-,7-аминокислот обладает противомикробным 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 опытные штаммы (n=156) *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *E.coli*, *P.aeruginosa* в различных 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 at al., 2018]. МПК 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 (Т1), 2-хлор-N-(5-метокси-2,3-диметил-1H-индол-6-ил)ацетамид (Т4), 2-хлор-N-(1,2,3-триметил-2,3-1H-индол-5-ил)ацетамид (Т7), монохлорацетат 2,3-диметил-1H-индол-7-аммония (Т12). Получены данные о высокой активности отобранных хлорсодержащих

производных замещенных 5-,6-,7-аминоиндолов, превышающей активность препаратов сравнения бензалкония хлорида, диоксидина, хлоргексидина и нитрофурантоина. Проведен анализ воздействия исследуемых химических соединений на способность бактериальной клеточной стенки поглощать кристаллический фиолетовый. Результаты подтвердили, что изменения проницаемости клеточной стенки *S.aureus* ATCC 6538-P и *E.coli* ATCC 25922 происходят в зависимости от дозы, применяемых соединений с лабораторными шифрами **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 с лабораторными шифрами **T1**, **T4**, **T7** и **T12**. Установлен бактерицидный тип противомикробного действия испытуемых соединений с использованием классической методики определения и на основе вычисления коэффициента оптической плотности питательной среды в ходе культивирования микроорганизмов с противомикробными соединениями в жидкой питательной среде, с применением способа определения типа противомикробного действия, разработанного в ходе экспериментального исследования. В результате исследования безопасности тестируемых соединений *in vitro*, установлено отсутствие мутагенных свойств соединений с лабораторными шифрами **T4**, **T7**, **T12** и дозозависимый ДНК-повреждающий эффект соединений с лабораторными шифрами **T1** и **T12**.

Установлено, что механизм действия исследуемых соединений с лабораторными шифрами **T1**, **T4**, **T7**, **T12** включает воздействие на проницаемость клеточной стенки как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов, и, соединений с лабораторными шифрами **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=19), *S.pneumoniae* (n=20), *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 СОКРАЩЕНИЙ

- T1 – 2-хлор-*N*-(2,3-диметил-1*H*-индол-7-ил)ацетамид
- T2 – 2-хлор-*N*-(1,2,3-триметил-1*H*-индол-7-ил)ацетамид
- T4 – 2-хлор-*N*-(5-метокси-2,3-диметил-1*H*-индол-6-ил)ацетамид
- T5 – 2-хлор-*N*-(5-метокси-1,2,3-триметил-1*H*-индол-6-ил)ацетамид
- T6 – 2-хлор-*N*-(2,3-диметил-1*H*-индол-5-ил)ацетамид
- T7 – 2-хлор-*N*-(1,2,3-триметил-1*H*-индол-5-ил)ацетамид
- T12 – монохлорацетат-2,3-диметил-1*H*-индол-7-аммония
- T13 – монохлорацетат 1,2,3-триметил-1*H*-индол-7-аммония
- T8 – монохлорацетат 2,3-диметил-5-метокси-1*H*-индол-6-аммония
- T9 – монохлорацетат 5-метокси-1,2,3-триметил-1*H*-индол-6-аммония
- T10 – монохлорацетат 2,3-диметил-1*H*-индол-5-аммония
- T11 – монохлорацетат 1,2,3-триметил-1*H*-индол-5-аммония
- CV – краситель кристаллический фиолетовый
- GAIN – generating antibiotic incentives pow
- MSSA – метициллин-чувствительный золотистый стафилококк
- OmpT – outer membrane protein (белок наружной мембраны)
- PASS – Prediction of Activity Spectra for Substances (Прогнозирование спектров активности веществ)
- SopA – stability of plasmid (плазмидный разделительный белок A)
- 5-НТР – 5-гидрокситриптофан
- 5-НТ – 5-гидрокситриптамин
- АТСС – Американская коллекция типовых культур
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИК – инфракрасная спектроскопия
- КОЕ – колониеобразующая единица
- ЛСД – *N*, *N*-диэтиламид лизергиновой кислоты
- МПК – минимальная подавляющая концентрация
- МХБ – Мюллер-Хинтон бульон
- НДФК – нуклеозиддифосфаткиназа
- СЭМ – сканирующий электронный микроскоп
- УФ – ультрафиолетовая электронная спектроскопия
- ФЭК – фотозлектроколоримерт
- ЯМР – спектроскопия ядерного магнитного резонанса

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Rohr, J. R. Emerging human infectious diseases and the links to global food production / J. R. Rohr // Nature sustainability. – 2019. – Vol. 6. – P. 445-456.
2. Yin, K. Real-time colorimetric quantitative molecular detection of infectious diseases on smartphone-based diagnostic platform / K. Yin // Scientific reports. – 2020. – Vol. 1. – С. 1-9.
3. Страчунский, Л. Р. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии : учебник / Л. Р. Страчунский, Ю. Б. Белоусова, Р. Н. Козлова. – Смоленск : Изд-во НИИАХ СГМА, 2002. – 464 с.
4. Клинические рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, версия 2021-01 [Электронный ресурс] // МАКМАХ, 2021. – Режим доступа: <https://clck.ru/35jUg5>
5. Онищенко, Г. Г. О двухуровневой структуре потенциальной эпидемической опасности массовых мероприятий с международным участием / Г. Г. Онищенко // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – Вып. 1. – С. 5-9.
6. Кедрова, О. В. Информация об эпидемиологической ситуации по опасным инфекционным болезням, требующим проведения мероприятий по санитарной охране территории, в мире, странах СНГ и Российской Федерации / О. В. Кедрова // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2015. – Вып. 3. – С. 13-17.
7. Попова, А. Ю. Комплекс мероприятий в рамках санитарной охраны территории Российской Федерации по недопущению завоза и распространения болезни, вызванной вирусом Эбола / А. Ю. Попова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – Вып. 3. – С. 49-54.
8. Brun-Buisson, C. Prudent antibiotic use in response to the antimicrobial resistance challenges / C. Brun-Buisson // La revue du praticien. – 2017. – Vol. 2. – P. 217-222.

9. Marston, H. D. Antimicrobial resistance / H. D. Marston // *Jama.* – 2016. – Vol. 11. – P. 1193-1204.
10. Ayukekbong, J. A. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies / J. A. Ayukekbond, M. Ntemgwa, A. N. Atabe // *Antimicrobial resistance & infection control.* – 2017. – No. 1. – P. 47.
11. Заман, Р. Б. Обзор устойчивости к антибиотикам: звонят тревожные колокола / Р. Б. Заман // *Cureus.* – 2017. – No. 6. – С. 105-108.
12. Десувер, Л. Антибактериальная и β -лактамазоингибирующая активность моноциклических β -лактамов / Л. Десувер // *Обзоры лекарственных исследований.* – 2018. – No. 2. – P. 426-503.
13. Messaoudi, A. Epidemiology of resistance and phenotypic characterization of carbapenem resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* isolates at Sahloul University Hospital-Sousse, Tunisia / A. Messaoudi // *African health sciences.* – 2019. – No. 2. – P. 2008-2020.
14. Synthesis of functionally pyrrolo[3,2-h]quinjlines from 2,3-dimetil- and 1,2,3-trimetil-7-aminoindoles / S. A. Yamashkin [et al.] // *Chemistry of heterocyclic compounds.* – 2003. – No. 8. – P. 1048-1056.
15. Yamashkin, S. A. Synthesis of pyrroloquinolines from substituted 6-aminoindoles and oxalacetic ester / S. A. Yamashkin, N. V. Zhukova, I. S. Stepanenko // *Chemistry of heterocyclic compounds.* – 2008. – No. 7. – P. 793-801.
16. Strelkauskas, A. Microbiology textbook for pre-nursing and allied health students – «Microbiology – a clinical approach» / A. Strelkauskas, J. Strelkauskas, D. M. Strelkauskas. – New York : Garland science, 2016. – 722 p.
17. Baker, J. J. Antibacterial drug discovery and structure-based design / J. J. Baker // *Drug discovery today.* – 2006. – No. 11. – P. 391-404.
18. Lee, B. Y. Antimicrobial peptide daptomycin and its inhibition by pulmonary surfactant: biophysical studies using model membrane systems : dis. ... doc. of phil. / B. Y. Lee. – Waterloo : University of Waterloo, 2017. – 252 p .
19. Kamol, Y. Mechanism of action underlying the antibacterial activity of lupinifolin, a flavonoid extracted from the stem of *Derris Reticulata* Craib., against

Staphylococcus aureus [Electronic resource] // Semantic scholar : information portal. – Access mode: <https://rb.gy/md5n2x>.

20. Patrick, G. L. An introduction to medicinal chemistry / G. L. Patrick. – Oxford : Oxford university press, 2009. – P. 421-450.

21. Patrick, G. L. An introduction to medicinal chemistry / G. L. Patrick. – Oxford : Oxford university press, 2013. – 789 p.

22. Recent advances on antimicrobial wound dressing: a review / D. Simões [et al.] // European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. – 2018. – Is. 127. – P. 130-141.

23. Madigan, M. T. Brock biology of microorganisms / M. T. Madigan, J. M. Martinko. – New York : Prentice Hall, 2009. – P. 780-802.

24. Prescott, L. M. Microbiology / L. M. Prescott, J. P. Harley, D. A. Klein . – San Diego : Academic press, 2008. – P. 835-858.

25. Inana, M. E. Microbiological quality and antibiotic susceptibility profile of microorganisms associated with stored vegetables in port Harcourt / M. E. Inana, D. N. Ogbonna, S. I. Douglas // Microbiology research journal international. – 2019. – P. 1-10.

26. Projan, S. J. [Genome] Size matters / S. J. Projan // Antimicrob. Agents chemother. – 2007. – Vol. 51 [4]. – P. 1133-1134.

27. Brown, E. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era / E. D. Brown, G. D. Wright // Nature. – 2016. – Is. 529. – Vol. 7586. – P. 336-343.

28. Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. Influenzae / A. Fleming // British journal of experimental pathology. – 1929. – Is. 10. – Vol. 3. – P. 226.

29. Yoneyama, H. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development / H. Yoneyama, R. Katsumata // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2006. – Is. 70. – No. 5. – P. 1060-1075.

30. Chung, P. Y. Current technology in the discovery and development of novel antibacterials / P. Y. Chung // Current drug targets. – 2018. – Is. 19. – № 7. – P. 832-840.

31. Lakhundi, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology / S. Lakhundi, K. Zhang // *Clinical microbiology reviews*. – 2018. – Is. 31. – No. 4. – P. 38-49.
32. Medina, E. Tackling threats and future problems of multidrug-resistant bacteria / E. Medina, D. H. Pieper // *How to overcome the antibiotic crisis*. – Springer, Cham, 2016. – P. 3-33.
33. Otto, M. Next-generation sequencing to monitor the spread of antimicrobial resistance / M. Otto // *Genome medicine*. – 2017. – Is. 9. – No. 1. – P. 68.
34. Khan, A. Mechanisms of antimicrobial resistance among hospital-associated pathogens / A. Khan, W.R. Miller, C.A. Arias // *Expert review of anti-infective therapy*. – 2018. – Is. 16. – No. 4. – P. 269-287.
35. Сычёв, Д. А. Антибиотики и химиотерапия: как все начиналось / Д. А. Сычёв, К. В. Герасимова // *Качественная клиническая практика*. – 2018. – № 3. – С. 41-44.
36. Sillankorva, S. Antibiotic alternatives and combinational therapies for bacterial infections / S. Sillankorva, M. O. Pereira, M. Henriques // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – Is. 9. – P. 3359.
37. Advance class of antibiotics of the twenty-first century // *Antibiotic resistant bacteria : a challenge to modern medicine* / S. Sagar [et al.] . – Springer, Singapore, 2019. – P. 31-44.
38. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment / A. Brauner [et al.] // *Nature reviews microbiology*. – 2016. – Vol. 14 [5]. -P. 320.
39. Dhakal, D. Engineering actinomycetes for biosynthesis of macrolactone polyketides / D. Dhakal, J. K. Sohng, R. P. Pandey // *Microbial cell factories*. – 2019. – Is. 18. – No. 1. – P. 137.
40. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистома, её объём, разнообразие и развитие / К. А. Виноградова [и др.] // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2013. – № 5-6. – С. 38-48.

41. Егоров, А. М. Бактериальные ферменты и резистентность к антибиотикам / А. М. Егоров, М. М. Уляшова, М. Ю. Рубцова // *Acta Naturae* [русскоязычная версия]. – 2018. – Т. 10, № 4 [39]. – С. 33-48.
42. Фторхинолоны. Синтез и применение / О. Н. Чупахин [и др.]. – Москва : Физматлит, 2018. – 320 с.
43. Davies, J. Origins and evolution of antibiotic resistance / J. Davies, D. Davies // *Microbiology and molecular biology reviews*. – 2010. – Is. 74. – No. 3. – P. 417-433.
44. Overbye, K. M. Antibiotics: where did we go wrong? / K. M. Overbye, J. F. Barrett // *Drug discovery today*. – 2005. – Is. 10. – No. 1. – P. 45-52.
45. Dodds, D. R. Antibiotic resistance: a current epilogue / D. R. Dodds // *Biochemical pharmacology*. – 2017. – Is. 134. – P. 139-146.
46. Högberg, L. D. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances / L. D. Högberg, A. Heddini, O. Cars // *Trends in pharmacological sciences*. – 2010. – Is. 31. – No. 11. – P. 509-515.
47. Antimicrobial resistance following mass azithromycin distribution for trachoma: a systematic review / K. S. O'Brien [et al.] // *The lancet infectious diseases*. – 2019. – Is. 19. – No. 1. – P. 14-25.
48. Bengtsson-Palme, J. Antibiotic resistance genes in the environment: prioritizing risks / J. Bengtsson-Palme, D. G. J. Larsson // *nature reviews microbiology*. – 2015. – Is. 13. – No. 6. – P. 396.
49. Bonev, B. Bacterial resistance to antibiotics: from molecules to man / B. Bonev, N. Brown. – Pondicherry : Wiley-Blackwell, 2019. – 288 p.
50. Hughes, D. Evolutionary trajectories to antibiotic resistance / D. Hughes, D. I. Andersson // *Annual review of microbiology*. – 2017. – Is. 71. – P. 579-596.
51. Antimicrobial agents / M. E. L. Fane [et al.] // *Sepsis*. – 2017. – Is. 16. – P. 17.
52. Clatworthy, A.E. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy / A.E. Clatworthy, E. Pierson, D.T. Hung // *Nature Chemical Biology*. – 2007. – No. 3. – P. 541-548.

53. Patent № 15570272 United States. A61K35/741 Probiotics. Antimicrobial therapy : № US20180289751A1 : Application filed by University of California 05.05.2016 : Publication of 11.10.2018 / T. Nakatsuji, R. L. Gallo. – 83 p .
54. «One-size-fits-all»? Optimizing treatment duration for bacterial infections / P. Geli [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 11. – P. e29838.
55. Read, A. F. Does high-dose antimicrobial chemotherapy prevent the evolution of resistance? / A. F. Read // PLoS computational biology. – 2016. – Is. 12. – No. 1. – P. e1004689.
56. Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance / D. G. J. Larsson [et al.] // Environment international. – 2018. – Is. 117. – P. 132-138.
57. Drug interactions and the evolution of antibiotic resistance / P. J. Yeh [et al.] // Nature reviews microbiology. – 2009. – Vol. 7. – P. 460-466.
58. Progress in the fight against multidrug-resistant bacteria? A review of US Food and Drug Administration-approved antibiotics, 2010-2015 / D. Deak [et al.] // Annals of internal medicine. – 2016. – Is. 165. – No. 5. – P. 363-372.
59. Population biological principles of drug-resistance evolution in infectious diseases / P. A. Wiesch [et al.] // The lancet infectious diseases. – 2011. – Is. 11. – No. 3. – P. 236-247.
60. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance / A. H. Holmes [et al.] // The lancet. – 2016. – Vol. 387 [10014]. – P. 176-187.
61. Piddock, L. J. V. Understanding drug resistance will improve the treatment of bacterial infections / L. J. V. Piddock [et al.] // Nature reviews microbiology. – 2017. – Is. 15. – No. 11. – P. 639.
62. Leale, A. M. The emergence, maintenance, and demise of diversity in a spatially variable antibiotic regime / A. M. Leale, R. Kassen // Evolution Letters. – 2018. – Is. 2. – No. 2. – P. 134-143.
63. The evolution of antibiotic resistance in a structured host population / F. Blanquart [et al.] // Journal of The Royal Society Interface. – 2018. – Is. 15. – No. 143. – P. 1-11.

64. The evolving threat of antimicrobial resistance. Options for action / World Health Organization [WHO]. – Geneva : Switzerland, 2012. – 119 p.

65. Frequency and antibiogram of urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from urine samples of apparently healthy school children / E. C. Okonkwo [et al.] // Sci fed journal of applied microbiology. – 2018. – Is. 1. – No. 1.

66. Comparative genome analysis of 15 clinical *Shigella flexneri* strains regarding virulence and antibiotic resistance / L. Wang [et al.] // AIMS microbiology. – 2019. – Is. 5. – No. 3. – P. 205.

67. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies / Pang Z. [et al.] // Biotechnology advances. – 2019. – Is. 1. – Vol. 37. – P. 177-192.

68. Garneau-Tsodikova, S. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives / S. Garneau-Tsodikova, K. J. Labby // Med chem comm. – 2016. – Is. 7. – No. 1. – P. 11-27.

69. Lincosamides, streptogramins, phenicols, and pleuromutilins: mode of action and mechanisms of resistance / S. Schwarz [et al.] // Cold spring harbor perspectives in medicine. – 2016. – Is. 6. – No.11. – P. 1-30.

70. Elbourne, A. Nano-structured antimicrobial surfaces: From nature to synthetic analogues / A. Elbourne, R. J. Crawford, E. P. Ivanova // Journal of colloid and interface science. – 2017. – Is. 508. – P. 603-616.

71. WHO. WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance [Electronic resource] // World health organization, 2001. – Access mode: https://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_English.pdf .

72. WHO. The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action. [Electronic resource] / World Health Organization, 2012. – Access mode: <https://clck.ru/35jaBg>

73. Lässig, M. Predicting evolution / M. Lässig, V. Mustonen, A. M. Walczak // Nature ecology & evolution. – 2017. – Is. 1. – No. 3. – P. 1-9.

74. Antibiotic resistance increases with local temperature / D. R. MacFadden [et al.] // Nature climate change. – 2018. – Is. 8. – No. 6. – P. 510-514.

75. The distribution of antibiotic use and its association with antibiotic resistance / S. W. Olesen [et al.] // *Elife*. – 2018. – Is. 18 [7]. – P. e39435.

76. Implementing an antibiotic stewardship program: guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America / T. F. Barlam [et al.] // *Clinical infectious diseases*. – 2016. – Is. 62. – No. 10. – P. e51-e77.

77. How effective and cost-effective are behaviour change interventions in improving the prescription and use of antibiotics in low-income and middle-income countries? A protocol for a systematic review / N. Batura [et al.] // *BMJ open*. – 2018. – Is. 8. – No. 5. – P. e021517.

78. Antimicrobial resistance : an international public health problem / J. D. Lutgring [et al.] // *Antimicrobial drug resistance*. – 2017. – P. 1519-1528.

79. The drivers of antibiotic use and misuse : the development and investigation of a theory driven community measure / M. K. Byrne [et al.] // *BMC public health*. – 2019. – Is. 19. – No. 1. – P. 1425-1436.

80. Discharge of swine wastes risks water quality and food safety : antibiotics and antibiotic resistance genes from swine sources to the receiving environments / L. Y. He [et al.] // *Environment international*. – 2016. – Is. 92. – P. 210-219.

81. Walsh, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance / C. Walsh // *Nature*. – 2000. – Vol. 406. – P. 775-781.

82. Contrasting evolution of virulence and replication rate in an emerging bacterial pathogen / L. Tardy [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2019. – Is. 116. – No. 34. – P. 16927-16932.

83. Dye, C. The global tuberculosis epidemic: scale, dynamics, and prospects for control / C. Dye, P. Glaziou // *Tuberculosis*. – Boca Raton : CRC Press, 2016. – P. 17-38.

84. WHO. Guidelines for the treatment of malaria [Electronic resource] // World Health Organization, 2010. – Access mode: <https://clck.ru/35jaGe> [date of request: 22.07.2020].

85. Bacterial persistence promotes the evolution of antibiotic resistance by increasing survival and mutation rates / E. M. Windels [et al.] // The ISME journal. – 2019. – Vol. 13 [5]. – P. 1239-1251.

86. Lyons, M. A. Modeling and simulation of Pretomanid pharmacokinetics in pulmonary tuberculosis patients / M. A. Lyons // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2018. – Is. 62. – No. 7. – P. e02359-17.

87. Baym, M. Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance / M. Baym, L. K. Stone, R. Kishony // Science. – 2016. – Is. 351. – No. 6268. – P. aad3292.

88. Kennedy, D. A. Why does drug resistance readily evolve but vaccine resistance does not? / D. A. Kennedy, A. F. Read // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2017. – Is. 284. – No. 1851. – P. 20162562.

89. NLLSS: predicting synergistic drug combinations based on semi-supervised learning / X. Chen [et al.] // PLoS computational biology. – 2016. – Is. 12. – No.7. – P. e1004975.

90. Alternative evolutionary paths to bacterial antibiotic resistance cause distinct collateral effects / C. Barbosa [et al.] // Molecular biology and evolution. – 2017. – Is. 34. – No. 9. – P. 2229-2244.

91. Kumar, A. Bacterial resistance against antibiotics / A. Kumar, N. Chordia // Drug resistance in bacteria, fungi, malaria, and cancer. – Springer, Cham, 2017. – P. 171-192.

92. Rice, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE / L. B. Rice // The Journal of Infectious Diseases. – 2008. – Is. 8. – C.1079-1081.

93. Santajit, S. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens / S. Santajit, N. Indrawattana // BioMed research international. – 2016. – Is. 2. – P. 1-8.

94. Яковлев, Р. В. Новая концепция рационального применения антибиотиков в амбулаторной практике / Р. В. Яковлев. // Антибиотики и химиотерапия. – 2019. – Т. 64. – № 3-4.

95. Baltz, R. H. Natural product drug discovery in the genomic era: realities, conjectures, misconceptions, and opportunities / R. H. Baltz // *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. – 2019. – Is. 46. – No. 3-4. – P. 281-299.

96. Wei, T. Responsive and synergistic antibacterial coatings: fighting against bacteria in a smart and effective way / T. Wei, Q. Yu, H. Chen // *Advanced healthcare materials*. – 2019. – Is. 8. – No. 3. – P. 1801381.

97. Yoneyama, H. Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development / H. Yoneyama, R. Katsumata // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2006. – Is. 70. – No. 5. – P. 1060-1075.

98. Rosamond, J. Harnessing the power of the genome in the search for new antibiotics / J. Rosamond, A. Allsop // *Science*. – 2000. – Is. 287. – No. 5460. – P. 1973-1976.

99. Fields, F. R. Using bacterial genomes and essential genes for the development of new antibiotics / F. R. Fields, S. W. Lee, M. J. McConnell // *Biochemical pharmacology*. – 2017. – Is. 134. – P. 74-86.

100. Wright, G. D. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria / G. D. Wright, A. D. Sutherland // *Trends in molecular medicine*. – 2007. – Is. 13. – No. 6. – P. 260-267.

101. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials / G. V. Vimbela [et al.] // *International journal of nanomedicine*. – 2017. – Is. 12. – P. 3941.

102. Genilloud, O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics / O. Genilloud // *Natural product reports*. – 2017. – Is. 34. – No. 10. – P. 1203-1232.

103. Antibiotic-producing symbionts dynamically transition between plant pathogenicity and insect-defensive mutualism / L. V. Flórez [et al.] // *Nature communications*. – 2017. – Is. 8. – P. 15172.

104. Phylogenetic analyses of antibiotic-producing *Streptomyces* sp. isolates obtained from the stingless-bee *Tetragonisca angustula* [Apidae: Meliponini] / J. C. Cambroner-Heinrichs [et al.] // *Microbiology*. – 2019. – Is. 165. – No. 3. – P. 292-301.

105. Antibiotic drug discovery / W. Wohlleben [et al.] // *Microbial biotechnology*. – 2016. – Is. 9. – No. 5. – P. 541-548.

106. Yuan, Z. Deformylase as a novel antibacterial target / Z. Yuan, J. Trias, R. J. White // *Drug Discovery Today*. – 2001. – Is. 6. – No. 18. – P. 954-961.

107. A unique peptide deformylase platform to rationally design and challenge novel active compounds / S. Fieulaine [et al.] // *Scientific reports*. – 2016. – Is. 6. – P. 35429.

108. 1, 4-Disubstituted imidazoles are potential antibacterial agents functioning as inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase [FabI] / D. A. Heerding [et al.] // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2001. – Is. 11. – No. 16. – P. 2061-2065.

109. Design, Synthesis, SAR and molecular modeling studies of novel imidazo [2, 1-b][1, 3, 4] Thiadiazole Derivatives as Highly Potent Antimicrobial Agents / H. Tahtaci [et al.] // *Molecular informatics*. – 2018. – Is. 37. – No. 3. – P. 1700083.

110. Idowu, T. Ubiquitous nature of fluoroquinolones: the oscillation between antibacterial and anticancer activities / T. Idowu, F. Schweizer // *Antibiotics*. – 2017. – Is. 6. – No. 4. – P. 26.

111. Ali, J. Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments / J. Ali, Q. A. Rafiq, E. Ratcliffe // *Future science OA*. – 2018. – Is. 4. – No. 4. – P. FSO290.

112. Structural insights into inhibition of lipid I production in bacterial cell wall synthesis / B. C. Chung [et al.] // *Nature*. – 2016. – Is. 533. – No. 7604. – P. 557.

113. Mycobacterium tuberculosis-secreted tyrosine phosphatases as targets against tuberculosis: exploring natural sources in searching for new drugs / A. Mascarello [et al.] // *Current pharmaceutical design*. – 2016. – Is. 22. – No. 12. – P. 1561-1569.

114. Kupferschmidt, K. Resistance fighters / K. Kupferschmidt // *Science*. – 2016. – Is. 6287. – Vol. 352. – P. 758-761.

115. Progress in the fight against multidrug-resistant bacteria? A review of US Food and Drug Administration-approved antibiotics, 2010-2015 / D. Deak [et al.] // *Annals of internal medicine*. – 2016. – Is. 165. – No. 5. – P. 363-372.

116. The population genetics of drug resistance evolution in natural populations of viral, bacterial and eukaryotic pathogens / B. A. Wilson [et al.] // *Molecular ecology*. – 2016. – Is. 25. – No. 1. – P. 42-66.

117. Day, T. Does high-dose antimicrobial chemotherapy prevent the evolution of resistance? / T. Day, A. F. Read // *PLoS computational biology*. – 2016. – Is. 12. – No. 1. – P. e1004689.

118. Iredell, J. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications / J. Iredell, J. Brown, K. Tagg // *British Medical Journal*. – 2016. – Is. 352. – P. h6420.

119. Strategies to enhance rational use of antibiotics in hospital: a guideline by the German society for infectious diseases / F. Allerberger [et al.] // *Infection*. – 2016. – Is. 44. – No. 3. – P. 395-439.

120. Тринеева, О. В. Методы качественного и количественного определения терпено-индольных алкалоидов растения рода *Catharanthus* (обзор) / О. В. Тринеева, А. И. Сливкин, А. Д. Халахакун // *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. – 2019. – №. 4. – С. 109-120.

121. Ямашкин, С. А. Синтез соединений с потенциальным противомикробным действием на основе замещенных 1*H*-индол-5-иламинов / С. А. Ямашкин, И. С. Степаненко, А. И. Бурова, А. И. Котькин. – Екатеринбург: *Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии*, 2020. – С. 467-468.

122. Степаненко, И. С. Синтез и биологическая активность *N*-(индолил) трифторацетамидов на основе замещенных 6-аминоиндолов / И. С. Степаненко, С. А. Ямашкин, М. А. Юровская. – Текст : непосредственный // *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*. – 2021. – Т. 62. – №. 1. – С. 37-43.

123. Варганян, Р. Р. Синтез основных лекарственных средств / Р. Р. Варганян. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2004. – 234 с.

124. Найда, А. В. Серотонин и триптофан как нейромолекулярные биомаркеры тревожных расстройств в зависимости от гендерной принадлежности

/ А. В. Найда, А. Н. Санников // Нейроэндокринная патология. Вопросы репродукции человека. – 2018. – С. 175-191.

125. Ветчинова, Д. В. Биологическая роль триптофана в продуктах питания / Д. В. Ветчинова, Д. А. Фрундина, Э. М. Омарова // Поколение будущего: Взгляд молодых ученых-2018. – 2018. – С. 23-24.

126. Muller, C. P. Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin / C. P. Muller, K. A. Cunningham. – Academic Press, 2020. – 1021 p.

127. Tryptamine : compound summary [Electronic resource] // National Library of Medicine. – Access mode: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tryptamine> .

128. Melatonin, mitochondria, and the skin / A. T. Slominski [et al.] // Cellular and molecular life sciences. – 2017. – Is. 74. – No. 21. – P. 3913-3925.

129. Сафина, Г. Ф. Влияние гетероауксина и янтарной кислоты на всхожесть семян пшеницы после их длительного хранения / Г. Ф. Сафина, Г. И. Филипенко // Международный научно-исследовательский журнал. – 2018. – № 11 (77). – Часть 1. – С. 143-147.

130. Lucas, S. The pharmacology of indomethacin / S. Lucas // Headache: The Journal of Head and Face Pain. – 2016. – Is. 56. – No. 2. – P. 436-446.

131. Pindolol : compound summary [Electronic resource] // National Library of Medicine. – Access mode: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pindolol>

132. Shemer, A. V. Dose-related effects of prenatal 5-methoxytryptamine (5-MT) on development of serotonin terminal density and behavior / A. V. Shemer, E. C. Azmitia, P. M. Whitaker-Azmitia // Developmental brain research. – 1991. – V. 59. – Is. 1. – P. 59-63.

133. Psilocin : compound summary [Electronic resource] // National Library of Medicine. – Access mode: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4980> .

134. Химикотоксикологическое исследование пиразидола / А. Р. Майбурова [и др.] // Вестник судебной медицины. – 2018. – Is. 7. – № 2. – P. 23-27.

135. Reserpine attenuates biofilm formation and virulence of *Staphylococcus aureus* / D. Parai [et al.] // Microbial pathogenesis. – 2019. – Is. 138. – P. 103790.

136. World Health Organization model list of essential medicines : 21st list. – Geneva [Electronic resource] // world health organization, 2019. – 60 p. – Access mode: <https://rb.gy/vpspv2>

137. The paradoxical psychological effects of lysergic acid diethylamide [LSD] / R. L. Carhart-Harris [et al.] // Psychological medicine. – 2016. – Is. 46. – No. 7. – P. 1379-1390.

138. Пат. РФ 2721833, МПК C07D 209/40. Способ получения трифторацетатов замещенных б-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.

139. Ямашкин, С. А. Синтез и противомикробная активность хлорацетамидов на основе 7-аминоиндолов / С.А. Ямашкин, Ш. Ташова, А. И. Котыкин, И. С. Степаненко // Актуальные проблемы естественно-технологического образования. – 2019. – С. 159-165.

140. Патент РФ 2675806, МПК C07D 209/40, A61K 31/404, A61P 31/00. Способ получения N-(индолил)трифторацетамидов, обладающих противомикробным действием / Степаненко И. С., Ямашкин С. А. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва». – № 2018121537 : заявл. 20.07.2018 : опубл. 25.12.2018; Бюлл. № 36 – 10 с.

141. Степаненко, И. С. Производные замещенных бензаминоиндолов и пирролохинолонов – новый класс соединений с противомикробной активностью : дис. ... канд. мед. наук : 14.03.06 / Степаненко Ирина Семеновна. – Саранск, 2019. – 429 с.

142. Филимонов, Д. А. Prediction of biological activity spectra for organic compounds / Д. А. Филимонов, В. В. Поройков // Российский химический журнал. – 2006. – Т. 50. – № 2. – С. 66-75.

143. Филимонов, Д. А. Предсказание спектров биологической активности органических соединений с помощью веб-ресурса PASS ONLINE / Д. А. Филимонов // Химия гетероциклических соединений. – 2014. – № 3. – С. 483-499.

144. Thayer, M. M. Three-dimensional structure of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa* at 1.5-Å resolution / M. M. Thayer, K. M. Flaherty, D. B. McKay // Journal of Biological Chemistry. – 1991. – Vol. 266. – No. 5. – P. 2864-2871.

145. Vandeputte-Rutten, L. Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from *Escherichia coli* suggests a novel catalytic site / L. Vandeputte-Rutten, R. A. Kramer, J. Kroon, N. Dekker, M. R. Egmond, P. Gros // The EMBO journal. – 2001. – Vol. 20. – No. 18. – P. 5033-5039.

146. Vijaya, P. Synthesis, characterization, PASS analysis and ADMET properties of oxazolone ring containing hydrazone derivatives / P. Vijaya, G. Sundaraselvan // Materials Today: Proceedings. – 2021. – Vol. 45. – No. 5.

147. Shahzadi, I. Synthesis, Hemolytic Studies, and In Silico Modeling of Novel Acefylline–1, 2, 4-Triazole Hybrids as Potential Anti-cancer Agents against MCF-7 and A549 / I. Shahzadi, A. F. Zahoor, A. Rasul, A. Mansha, S. Ahmad, Z. Raza // ACS Omega. – 2021. – Vol. 6. – Is. 18. – P. 11943–11953.

148. Widely used benzalkonium chloride disinfectants can promote antibiotic resistance / M. Kim [et al.] // Applied and environmental microbiology. – 2018. – Is. 84. – No. 17. – P. e01201-18.

149. Петров, С. Ю. Консерванты в офтальмологических препаратах: от бензалкония хлорида к поликватернию / С. Ю. Петров, Д. М. Сафонова . – Текст : непосредственный // Глаукома. Журнал НИИ ГБ РАМН. – 2013. – № 4. – С. 82-96.

150. Щетинин, Е. В. Экспериментально-лабораторное обоснование выбора антибактериальных средств для лечения периодонтита / Е. В. Щетинин, С. В. Сирак, О. Н. Игнатиади, А. Г. Сирак, М. К. Демурова, Э. А. Дыгов // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2014. – Т. 9. – №. 4 (36). – С. 349-351.

151. Квашнина, Д. В. Оценка применения хлоргексидина как антисептического средства / Д. В. Квашнина, О. В. Ковалишена. – Текст : непосредственный // Медицинский альманах. – 2016. – № 3. – С. 62-66.

152. Падейская, Е. Н. Антибактериальный препарат диоксидин: особенности биологического действия и значение в терапии различных форм гнойной инфекции / Е. Н. Падейская // Инфекции и антимикробная терапия. – 2011. – Т. 3. – № 5. – Р. 105-155.

153. Диоксидин : антимикробная активность и перспективы клинического применения на современном этапе / Д. А. Попов [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2013. – Т. 58. – № 3-4. – ISSN 0235-2990.

154. Астахова, А. В. Клиническая фармакология: национальное руководство / Астахова А. В., Афанасьев В. В., Бабак С. В., Батищева Г. А., Батулин В. А., Белоусов Ю. Б., Явелов И. С. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 976 с.

155. Raz R. Fosfomycin: an old-new antibiotic / R. Raz // Clinical Microbiology and Infection. – 2012. – Vol. 18. – Is. 1. – P. 4-7.

156. Приказ МЗ СССР №535 от 22.04.1985г. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», 1985. – 93 с.

157. Методы хранения микроорганизмов-деструкторов в коллекции ФГУП «ВИАМ» [обзор] / А. А. Кривушина [и др.] // Авиационные материалы и технологии. – 2019. – № 3. – С. 89-94.

158. Veterinary type cultures and their preservation: status and challenges / R. K. Vaid [et al.] // Microbial Resource Conservation. – Springer, Cham, 2018. – P. 239-260.

159. Методические указания МУ 2.1.4.1057-01. Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2001. – 58 с.

160. Санитарные правила СП 1.2.036-95. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности, 1995. – 49 с.

161. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А. Н. Миронова [и др.]. – Часть первая. – М. : Гриф и К, 2012. – 944 с.

162. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам : клинические рекомендации / Р. С. Козлов [и др.]. – Смоленск, 2018. – 206 с.

163. Leclercq, R. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing / R. Leclercq, R. Canton, D. F. Brown, C. G. Giske, P. Heisig, A. P. MacGowan, G. Kahlmeter // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2013. – Vol. 19. – Is. 2. – P. 141-160.

164. Методические указания МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.

165. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-fifth informational supplement. Document M 100–S25. – Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2020. – 293 p .

166. Matuschek, E. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories / E. Matuschek, D. F. J. Brown, G. Kahlmeter // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2014. – Vol. 20. – Is. 4. – P. 255-266.

167. Devi, K. P. Eugenol [an essential oil of clove] acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane / Devi K. P., Nisha S. A., Sakthivel R., Pandian S.K // *Journal of ethnopharmacology*. – 2010. – V. 130. – Is. 1. – P. 107-115.

168. Зелди, М. И. Характеристика новых четвертичных соединений пиридинового ряда как перспективных антибактериальных агентов : дис. ...канд.биол.наук : 03.02.03 / Зелди Марина Ивановна. – Казань, 2019. – 142 с.

169. Масейкина, А.А. Изучение морфоструктурных повреждений бактериальных клеток под воздействием хлорсодержащих производных 5-,6-,7-аминоиндоллов с помощью сканирующего электронного микроскопа / А.А.

Масейкина, И.С. Степаненко, Т.Н. Платкова, А.И. Кирютина, В.С. Малышева // Инфекция и иммунитет. – 2023. – Т. 13. – №2. – С. 243-256.

170. Сазыкин, Ю. О. Антибиотики и оболочка бактериальной клетки. Итоги науки и техники / Ю. О. Сазыкин, П. С. Навашин //ВИНИТИ. Серия Биотехнология. М. – 1991. – Т. 31. – С. 128-149.

171. Greenwood D., O'grady F. Scanning electron microscopy of Staphylococcus aureus exposed to some common anti-staphylococcal agents / Greenwood D., O'grady F //Microbiology. – 1972. – Vol. 70. – No. 2. – P. 263-270.

172. Hartmann, M. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy / Hartmann M., Berditsch M., Hawecker J., Ardakani M.F., Gerthsen D., Ulrich A.S // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2010. – Vol. 54. – No. 8. – P. 3132-3142.

173. Marcellini, L. Fluorescence and electron microscopy methods for exploring antimicrobial peptides mode (s) of action / Marcellini L., Giammatteo M., Aimola P., Mangoni M.L // Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols. – 2010. – С. 249-266.

174. Методы экспериментальной химиотерапии : практическое руководство / под ред. Г. Н. Першина [и др.]. – М : Медицина, 1971. – 541 с.

175. 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. Сладников, 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.

176. Bridges, B.A. Simple bacterial systems for detecting mutagenic agents / B.A. Bridges // Labor. Practice. – 1972. – V. 21. – P. 413-416.

177. Bridges, B. A. Mutagenicity of dichlorvos and methyl methane-sulphonate for Escherichia coli WP2 and some derivatives deficient in DNA repair / B. A. Bridges, R.

P. Mottershead, M. H. L. Green, W. J. H. Gray // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 1973. – Vol. 19. – Is. 3. – С. 295-303.

178. Leifer, Z. An evaluation of tests using DNA repair-deficient bacteria for predicting genotoxicity and carcinogenicity. A report of the U.S. EPA's Gene-TOX Program/ Z. Leifer, T. Kada, M. Mandel, E. Zeiger, R. Stafford, H.S. Rosenkranz // Mutat Res. – 1981. – V.87. – Is. 3. – P. 211-97.

179. Игони́на, Е. В. Лух-биосенсоры: скрининг биологически активных соединений на генотоксичность / Е. В. Игони́на, М. В. Марсова, Р. К. Аби́лев // Экологическая генетика. – 2016. – Т. 14. – № 4. – С. 52-62.

180. Сидоров, Р. Ю. Влияние экспрессии гена *rel* из *Mycobacterium smegmatis* на активность *groS lacZ* слияния в *Escherichia coli* / Р. Ю. Сидоров, А. Г. Ткаченко // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2017. – № 9 [209]. – С. 91-95

181. Felkner, I.C. Modern Trends in Bacterial Transformation and Transfection / I.C. Felkner, A. Portoles, R. Lopez, M. Espinosa // North-Holland. – 1977. – P. 293-298.

182. Nohmi, T. My career development with Ames test: a personal recollection / T. Nohmi // Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2019. – Is. 847. – P. 503095.

183. Ames test – Principle, Test, Interpretation and conclusion [Electronic resource] // BIOTECHFRONT. – Access mode: <https://www.biotechfront.com/2021/01/ames-test-overview.html> .

184. Gronow, M. Chemical carcinogenesis / M. Gronow // Chromosomal Nonhistone Protein : Volume I : Biology. – 2019. – 93 p.

185. Как описывать статистику в медицине / пер. с англ. под ред. В. П. Леонова. – М. : Практическая медицина, 2011. – 480 с.

186. Кузьменков, А.Ю. AMRcloud: новая парадигма в мониторинге устойчивости к антибиотикам. / А.Ю. Кузьменков, А.Г. Виноградова, И.В. Трушин, А.А. Авраменко, М.В. Эдельштейн, А.В. Дехнич, Р.С. Козлов // Клиническая микробиология и противомикробная химиотерапия. – 2019. – Т. 21. – №. 2. – С. 119-124.

187. A textbook of modern toxicology / ed. E. Hodgson. – New York : John Wiley & Sons, 2004. – 582 p.

188. Lalithambika, B. *Pseudomonas aeruginosa* KUN2, extracellular toxins-A potential source for the control of dengue vector / B. Lalithambika, C. Vani // *Journal of vector borne diseases*. – 2016. – Is. 53. – No. 2. – P. 105.

189. Mechanistic insights into elastin degradation by Pseudolysin, the major virulence factor of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* / J. Yang [et al.] // *Scientific Reports* [Nature Publisher Group]. – 2015. – Is. 5. – P. 1-7.

190. Carbone, V. Structural determination of archaeal UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase from *Methanobrevibacter ruminantium* M1 in complex with the bacterial cell wall intermediate UDP-N-acetylmuramic acid / V. Carbone, L. R. Schofield, C. Sang, A. J. Sutherland-Smith, R. S. Ronimus // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2018. – Vol. 86. – Is. 12. – P. 1306-1312.

191. Alav, I. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation / I. Alav, J. M. Sutton, K. M. Rahman // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2018. – Vol. 73. – Is. 8. – P. 1-18.

192. Yowler, B. C. Botulinum neurotoxin A activity is dependent upon the presence of specific gangliosides in neuroblastoma cells expressing synaptotagmin I / B. C. Yowler, R. D. Kensinger, C. L. Schengrund // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – Is. 36. – P. 32815-32819.

193. Akita, H. Artificial thermostable D-amino acid dehydrogenase: creation and application / H. Akita, J. Hayashi, H. Sakuraba, T. Ohshima // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1-11.

194. Lee, A. E. Antibacterial resistance in ophthalmic infections: a multi-centre analysis across UK care settings / A. E. Lee, K. Niruttan, T. M. Rawson, L. S. Moore // *BMC infectious diseases*. – 2019. – Vol. 19. – Is. 1. – P. 1-8.

195. Rhodes A. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016 / A. Rhodes, L. E. Evans, W. Alhazzani, M. M. Levy, M. Antonelli, R. Ferrer, R. P. Dellinger // *Intensive care medicine*. – 2017. – Vol. 43. – Is. 3. – P. 304-377.

196. *Pseudomonas aeruginosa* LasB protease impairs innate immunity in mice and humans by targeting a lung epithelial cystic fibrosis transmembrane regulator-IL-6-antimicrobial-repair pathway / V. Saint-Criq [et al.] // *Thorax*. – 2018. – Is. 73. – No. 1. – P. 49-61.

197. Степаненко, И. С. Изучение противомикробной активности фторзамещенных пирролохинолинов / И. С. Степаненко, А. И. Котыкин, С. А. Ямашкин // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – Т. 6. – № 8. – P. 1406-1410.

198. Степаненко, И. С. Биологическая активность 6-гидрокси-2, 3-диметил-6-трифторметил-6, 7, 8, 9-тетрагидро-1H-пирроло [3, 2-h] хинолин-8-она / И. С. Степаненко, А. И. Котыкин, С. А. Ямашкин // *Наука и образование в XXI веке*. – 2013. – P. 140-141.

199. Изучение цитотоксичности производных аминокиндола и пирролохинолинов *in vitro* / И. С. Степаненко [и др.] // *Успехи современного естествознания*. – 2016. – № 11-2. – С. 271-275.

200. Степаненко, И. С. Пирролохинолины: перспективный класс соединений с противомикробной активностью / И. С. Степаненко, А. И. Котыкин, С. А. Ямашкин // *Проблемы медицинской микологии*. – 2015. – Is. 17. – № 2. – С. 135-136.

201. Ямашкин, С. А. Синтез 3-незамещенных индолов, нитроиндолов, аминокиндолов / С. А. Ямашкин, И. С. Степаненко, А. И. Котыкин // *Научный альманах*. – 2017. – № 9-2. – P. 186-192.

202. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Tenth Edition European Chemical disinfectants and antiseptics – Application of European Standards for chemical disinfectants and antiseptics* / J. B. Patel [et al.] – // Wayne, Pennsylvania : Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

203. A New Group of Compounds Derived from 4-, 5-, 6- and 7-Aminoindoles with Antimicrobial Activity / I. S. Stepanenko [et al.] . // *Research results in pharmacology*. – 2018. – Vol. 4. – Issue 3. – P. 17-26.

204. Jones, T. H. Filament formation by foodborne bacteria under sublethal stress / Jones T. H., Vail K. M., McMullen L. M. // International journal of food microbiology. – 2013. – Vol. 165. – No. 2. – P. 97-110.

205. Yamaki, S. Long filamentous state of *Listeria monocytogenes* induced by sublethal sodium chloride stress poses risk of rapid increase in colony-forming units / Yamaki S., Kawai Y., Yamazaki K. // Food Control. – 2021. – Vol. 124. – P. 107860.

206. Subbalakshmi, C. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin / C. Subbalakshmi, N.Sitaram. // FEMS Microbiology Letters. – 1998. – Vol. 160. – I. – P. 91–96.

207. Rosenberger, C.M. Interplay between antibacterial effectors: a macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular *Salmonella* replication / C.M. Rosenberger, R.L. Gallo, B.B. Finlay. // Proc Natl Acad Sci USA. – 2004. – Vol. 101. – No. 8. – pp. 2422–2427.

208. Андреевская, С. Г. Изменения морфологии *S. aureus* в условиях их культивирования в присутствии антибактериальных препаратов / С.Г. Андреевская, Н.В. Шевлягина, Д.Р. Псеунова // Медицина. – 2020. – Т. 8. – № 2. – С. 31–49.

209. Bajpai V.K., Shukla S., Paek W.K., Lim J., Kumar P., Kumar P., Na M. Efficacy of (+)-Lariciresinol to control bacterial growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 / V.K. Bajpai, S. Shukla, W.K. Paek, J. Lim, P. Kuma, P. Kumar, M. Na. // Front. Microbiol. – 2017. – Vol. 8. –P. 804.

210. Cui, H. Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil / Cui, H. Zhang X., Zhou H., Zhao C., Lin L. // Bot. Stud. – 2015. – Vol. 56. – No. 1. – P. 16.

211. Романов, А. В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон» 2013-2014 / А. В. Романов [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19. – № 1. – С. 57-62.

212. Petchiappan, A. Antibiotic Resistance: Current Perspectives / A. Petchiappan, D. Chatterji // ACS Omega. – 2017. – Vol. 2. – Issue 10. – P. 7400-7409.

213. Эйдельштейн, М. В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон» 2013-2014 / М. В. Эйдельштейн [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19. – № 1. – С. 37-41.

214. Yu, H. Nucleoside diphosphate kinase [Ndk] : a pleiotropic effector manipulating bacterial virulence and adaptive responses / H. Yu, X. Rao, K. Zhang // Microbiological research. – 2017. – Is. 205. – P. 125-134.

215. Moore, J. E. Clinical implications of pseudomonas aeruginosa location in the lungs of patients with cystic fibrosis / J. E. Moore, P. Mastoridis // Journal of clinical pharmacy and therapeutics. – 2017. – Is. 42. – No. 3. – P. 259-267.

216. Compromised host defense on Pseudomonas aeruginosa biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions / A. J. Jesaitis [et al.] // The Journal of Immunology. – 2003. – Is. 171. – No. 8. – P. 4329-4339.

217. Hritonenko, V. Omptin proteins: an expanding family of outer membrane proteases in Gram-negative Enterobacteriaceae / V. Hritonenko, C. Stathopoulos // Molecular membrane biology. – 2007. – Is. 24. – No. 5-6. – P. 395-406.

218. Kukkonen, M. The omptin family of enterobacterial surface proteases/adhesins: from housekeeping in Escherichia coli to systemic spread of Yersinia pestis / M. Kukkonen, T. K. Korhonen // International journal of medical microbiology. – 2004. – Is. 294. – No. 1. – P. 7-14.

219. Patent № 9657323 United States. C12P21/06 Preparation of peptides or proteins produced by the hydrolysis of a peptide bond, e.g. hydrolysate products : № US9657323B2 : Application filed by Daiichi Sankyo Co Ltd 29.09.2004 : Publication of 05.04.2005 / K. Okuno, M. Yabuta. – 53 p.

220. Grodberg, J. ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification / J. Grodberg, J. J. Dunn // Journal of bacteriology. – 1988. – Is. 170. – No. 3. – P. 1245-1253.

221. *Yersinia pestis* Pla protein thwarts T cell defense against plague / S. T. Smiley [et al.] // *Infection and immunity*. – 2019. – Is. 87. – No. 5. – P. e00126-19.

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. Сладников, **A.A. 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 1H-индол-4-,5-,6-,7-иламинов / **A.A. Масейкина**, И.С. Степаненко, С.А. Ямашкин, Е.Д. Сладников // 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 / **A.A. 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. Сладников, Н.В. Жукова, **A.A. 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. Слестников; 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. Слестников // 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. Слестников, 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. Слестников, **А.А. Масейкина** // Совр. пробл. науки и образ.. – 2020. – №6. ВАК, РИНЦ, IF- 0,421. Цит. 1.

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