

*На правах рукописи*

**СТЕПАНЕНКО ИРИНА СЕМЕНОВНА**

**ПРОИЗВОДНЫЕ ЗАМЕЩЕННЫХ БЕНЗАМИНОИНДОЛОВ  
И ПИРРОЛОХИНОЛОНОВ – НОВЫЙ КЛАСС СОЕДИНЕНИЙ  
С ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

**14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология  
(медицинские науки)**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук**

**Москва – 2019**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва» Минобрнауки России

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, доцент

**Блинова Екатерина Валериевна**

**Официальные оппоненты:**

**Шимановский Николай Львович** – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Минздрава России, кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии имени академика РАМН П. В. Сергеева Медико-биологического факультета, заведующий кафедрой;

**Чернуха Марина Юрьевна** – доктор медицинских наук, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, лаборатория молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций, ведущий научный сотрудник;

**Кинзирский Александр Сергеевич** – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, заместитель директора.

**Ведущая организация:** ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д.208.040.13 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, улица Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: [www.sechenov.ru](http://www.sechenov.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 года.

Ученый секретарь диссертационного совета

д.м.н., профессор

**Дроздов Владимир Николаевич**

### **Актуальность темы исследования**

Микроорганизмы миллионы лет благополучно сосуществуют с другими живыми организмами и проявляют наибольшую генетическую и метаболическую активность. Микробы разработали различные механизмы, чтобы выживать в неблагоприятных условиях, создаваемых конкурентными экологическими проблемами [WHO, 2015; Parhizgari N. et al., 2017; Ciunac D. et al., 2017; Yokoуama M. et al., 2018; Козлов Р. С. и др., 2018; Moravej H. et al., 2018]. Жизнедеятельность микроорганизмов зависит от различных факторов окружающей среды. Влияние этих факторов может быть, как благоприятным, так и неблагоприятным. Неблагоприятное воздействие факторов окружающей среды может выражаться в бактерицидном, разрушающем клетки прокариот действия, бактериостатическом – подавляющем рост и размножение микроорганизмов действия, мутагенном – изменяющем наследственные свойства микробной клетки [Косяченко Н. С. и др., 2015; Роганова Н. Б. и др., 2017; Willey J. M. et al., 2018]. Факторы окружающей среды, оказывающие неблагоприятное воздействие на клетки прокариотических микроорганизмов включают биотические и абиотические воздействия. Абиотические факторы – факторы неживой природы имеют различные принципы классификации. Условно антропогенные факторы (по происхождению) – это действие абиотических факторов, усиленных воздействием человека, включают химические – классы различных неорганических и органических соединений, которые обладают способностью подавлять рост и размножение или вызывать гибель прокариот (антисептики, дезинфектанты, консерванты и антибиотики) [Karthikeyan K., 2010; Шандала М. Г., 2015; Давыдов А. В., 2017; Willey J. M. et al., 2018]. Химические абиотические факторы внешней среды широко используются для подавления роста и размножения и уничтожения патогенных микроорганизмов [Yadav N. et al., 2017; Obayiuwana A. et al., 2018; Willey J. M. et al., 2018]. Экологические факторы могут выступать как ограничители, обуславливающие невозможность существования тех или иных микроорганизмов в данных условиях, как модификаторы, определяющие морфофункциональные изменения прокариот и как раздражители, вызывающие приспособительные изменения физиологических функций [Косяченко Н. С. и др., 2015; Парахонский А. П., 2016; Мишина И. Ю. и др., 2017; Роганова Н. Б. и др., 2017; Ciunac D. et al., 2017; Obayiuwana A. et al., 2018].

Проблема приспособительных реакций, определивших в совокупности резистентность к активно используемым химическим факторам окружающей среды, таким как антибиотики, дезинфектанты и другие, становится все более актуальной и тревожной в XXI веке [Кобзев Е. Н. и др., 2015; Зеленая К. В. и др., 2017; Ефимочкина Н. Р. и др., 2017; Канищев В. В., Еремеева Н. И., 2017; Козлов Р. С. и др., 2018]. Поскольку бесконтрольное применение противомикробных средств в пищевой промышленности в качестве консервантов, в

животноводстве и сельском хозяйстве в качестве дезинфектантов и химиотерапевтических средств неизбежно влечет формирование устойчивости микроорганизмов к наиболее часто применяемым антимикробным препаратам. В большинстве регионов мира и России, в том числе, получают распространение антибиотикорезистентные штаммы, как грамположительных (стафилококки, энтерококки), так и грамотрицательных бактерий (энтеробактерии, псевдомонады и др.) [Pop-Vicas A. et al., 2008; Snitkin E. S. et al., 2012; Козлов Р. С. и др., 2015; Эйдельштейн М. В. и др., 2017; Сухорукова М. В. и др., 2017; Natan M., Vanin E., 2017; Романов А. В. и др., 2017]. Ежегодно от инфекционной патологии в мире погибают около двадцати миллионов человек. Ежегодная заболеваемость инфекционными заболеваниями исчисляется сотнями миллионов случаев. Трудности лечения и профилактики инфекционных заболеваний, обусловленные разнообразием биологических форм возбудителей, колоссальной адаптационной способностью микроорганизмов и постоянным возникновением форм с множественной резистентностью, появлением новых видов микроорганизмов, определяют актуальность проблемы создания новых противомикробных препаратов. В то же время, перспективы разработки и внедрения новых антимикробных средств выглядят, прямо сказать, удручающе [Савельев В. С. и др., 2012; Tacconelli E. et al., 2018].

#### **Степень разработанности темы исследования**

При проведении микробиологического мониторинга в течении последних пяти лет был отмечен возросший удельный вес полирезистентных метициллинрезистентных штаммов *S.aureus*, *P.aeruginosa*, множественная лекарственная устойчивость семейства *Enterobacteriaceae* к трем и более препаратам антимикробного действия [Lai C. C. et al., 2014; Козлова Н. С., 2014; Козлов Р. С. и др., 2015; WHO, 2015; Эйдельштейн М. В. и др., 2017; Сухорукова М. В. и др., 2017; Petchiappan A., Chatterji D., 2017; Романов А. В. и др., 2017].

Необходимость поиска новых высокоэффективных и безопасных противомикробных соединений закреплена в Российской Федерации на законодательном уровне по Распоряжению Правительства РФ от 25 сентября 2017 г. № 2045-р «О стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 г.».

Одним из основных современных направлений в разработке противомикробных соединений является синтез аналогов и производных уже исследованных препаратов. В настоящее время имеется более пятнадцати миллионов химических соединений с противомикробной активностью, выделенных из природных источников и полученных химическим синтезом, но лишь десятки удовлетворяют требованиям, предъявляемым по противомикробному действию и биологической безопасности [Ling L. L. et al., 2015; Brown E. D. et al., 2016].

В современных условиях, исследования которые базируется на одном из фундаментальных принципов преодоления резистентности микроорганизмов – поиск новых соединений с антимикробной активностью и, может быть, с иным механизмом действия – несомненно, вызывают интерес [Косинец А. Н. и др., 2014; Распоряжение Правительства РФ от 25 сентября 2017 г. № 2045-р].

В течение последних десятилетий неизменно актуальными остаются работы в области химии индола и его производных. Это обусловлено тем, что индольная структура лежит в основе многих природных и синтетических физиологически активных веществ. Особое место в химии индола занимают аминокислоты триптофана, биогенного амина серотонина и многих других биологически активных соединений. Особый интерес представляют аминокислоты с индольной группой в бензольной части молекулы. Эти соединения, как любые ароматические амины, могут давать различного рода производные с участием аминокислотной группы [Ямашкин С. А. и др., 2006; 2008; Alyamkina E. A. et al., 2017].

В работе проводились исследования по изучению взаимодействия  $\beta$ -диоксо соединений с замещенными аминокислотами с различным положением аминокислотной группы в бензольном кольце. Полученные амиды, енамины представляют интерес сами по себе как биологически активные вещества, а также как исходные соединения для получения трициклических гетеросистем – пирролохинолонов. Эти соединения являются структурными фрагментами некоторых алкалоидов (например, алкалоида «Вомипирина») и коферментов некоторых бактериальных и животных дегидрогеназ (например, «Метоксатина» – кофермента PQQ). Новая группа содержит также соединения, которые оказывают влияние на метаболизм микроскопических грибов [Ямашкин С. А. и др., 2006; 2008; Кадималиев Д. А. и др., 2014; Alyamkina E. A. et al., 2017], что и явилось отправной точкой для настоящего исследования. Производные пирролохинолина уже используются для уничтожения клинически латентных микроорганизмов [Bek Petra Khel'ga et al., 2009].

Исследованная группа химических соединений является новым абиотическим химическим фактором, оказывающим неблагоприятное воздействие на прокариотические микроорганизмы. Полученные соединения проявляют противомикробную активность в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов и со временем способны занять свое место в резерве противомикробных средств.

**Цель работы:** разработка, получение нового класса синтетических лекарственных средств, на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов, способных оказывать противомикробное действие на прокариотические микроорганизмы и научно-практическое обоснование безопасного использования выявленной противомикробной активности

индолиламидами и пирролохинолонами для повышения эффективности противомикробной химиотерапии.

#### **Задачи исследования:**

В соответствии с поставленной целью при выполнении работы решались следующие задачи:

1. Синтезировать серию индолиламидами и пирролохинолонами на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов.
2. Исследовать способность полученных новых соединений замедлять рост, размножение или вызывать гибель прокариотических микроорганизмов.
3. Определить чувствительность тест-штаммов условно-патогенных микроорганизмов и опытных штаммов условно-патогенных и некоторых патогенных микроорганизмов, представителей семейств *Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Xanthomonadaceae* к новой группе соединений.
4. Изучить токсические эффекты новой группы соединений, производных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов при воздействии на клетки прокариот и эукариотические клетки *in vitro*.
5. Исследовать возможность воздействия на генетический материал клеток прокариот синтетических производных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов *in vitro*.
6. Определить острую токсичность потенциальных противомикробных соединений, производных 4-, 6-, 7-аминоиндолов при различных путях введения в условиях *in vivo*.
7. Исследовать чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к потенциальным противомикробным соединениям, производным 4-, 6-, 7-аминоиндолов в условиях экспериментальной инфекции *in vivo*.
8. Установить основные закономерности зависимости противомикробной активности от структуры молекулы и характера заместителей в исследуемых индолиламидах и пирролохинолонами.

#### **Научная новизна исследования**

Предложено и обосновано научное направление по получению и изучению нового поколения противомикробных соединений анилидной группы. При этом реализованы синтетические возможности использования в качестве исходных соединений, замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов, синтезирована серия, содержащая нециклические и циклические индолиламиды и пирролохинолоны, доказана перспективность целенаправленного синтеза биологически активных соединений на основе ароматических аминов индольного ряда. В результате исследования реакций 4-амино-2-фенилиндола с  $\beta$ -кетоксидами (этиловым эфиром ацетоксиной кислоты, этиловым эфиром трифторацетоксиной кислоты) были получены

нециклический амид (соединение с лабораторным шифром 6D), пирролохинолон (соединение с лабораторным шифром 17), дигидропирролохинолон (соединение с лабораторным шифром 5D). Реакции различно замещенных 5-аминоиндолов с 4,4,4-трифторацетоуксусным эфиром в термических условиях шли преимущественно с участием сложноэфирной группы кетоэфира. При этом образовывались соответствующие амиды нециклического строения (соединения с лабораторными шифрами 2D, 3D, 32D, 43D, 64D, 66D, 235D). Образование циклических амидов из 5-аминоиндолов не зафиксировано. Замыкание цикла с одновременной ароматизацией наблюдалось лишь для одного амида в трифторуксусной кислоте с получением пирролохинолона (соединение с лабораторным шифром 39D). Первичная реакция 6-аминоиндолов с 4,4,4-трифторацетоуксусным эфиром в бензоле со следами соляной кислоты приводила к образованию соответствующих амидов, то есть превращение реализовывалось за счет этоксикарбонильной группы кетоэфира. При этом в зависимости от природы заместителя у пиррольного атома азота шло образование нециклических амидов (соединения с лабораторными шифрами 243D, S3), циклического амида (соединение с лабораторным шифром 7D), пирролохинолонов (соединения с лабораторными шифрами ТФПХ, КПХ). При кипячении в бензоле с каталитическими количествами ледяной уксусной кислоты 7-амино-2,3-диметилиндол и трифторацетоуксусный эфир реагировали с образованием циклического амида (соединение с лабораторным шифром HD), в кислотных условиях (кипящая вода - трифторуксусная кислота) циклический амид (HD) с отщеплением воды ароматизировался в трифторметилпирролохинолон (лабораторный шифр 1D), под действием диметилсульфата трифторметилпиррохинолон (лабораторный шифр 1D) метилировался по пиридоновому и пиррольному атомам азота и при этом образовывался дважды метилированный трифторметилпирролохинолон (лабораторный шифр 4D).

Впервые определена способность замещенных амидов и пирролохинолонов на основе 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов оказывать неблагоприятное воздействие на рост тест-штаммов прокариотических микроорганизмов *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Staphylococcus aureus* 43300 ATCC (MRSA), *Escherichia coli* 25922 ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 ATCC, *Streptococcus pyogenes* 1238 ATCC, *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC, *Streptococcus pneumoniae* 49619 ATCC, *Salmonella enteritidis* 5765 ATCC, *Shigella sonnei* S-form, *Pseudomonas aeruginosa* 453, *Escherichia coli* M-17, *Staphylococcus aureus* 906, *Enterococcus faecalis* 19433 ATCC, *Citrobacter freundii* 101/57, *Proteus vulgaris* «Цветков», *Klebsiella pneumoniae* 13883 ATCC, *Bacillus cereus* 96, *Mycobacterium tuberculosis*.

Впервые выявлена противомикробная активность замещенных амидов и пирролохинолонов на основе 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов в результате исследования более 3000 штаммов опытных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов,

представителей семейств *Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, являющихся возбудителями неспецифических и некоторых специфических инфекционных заболеваний человека *in vitro*.

Впервые проведен скрининг противомикробной активности замещенных амидов и пирролохинолонов на основе 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов и отобрана группа амидов, полученных на основе замещенных 4-, 6- и 7-аминоиндолов с наибольшей активностью.

Впервые изучена острая токсичность потенциальных противомикробных соединений при различных путях введения в условиях *in vivo* и определено, что наиболее активные амиды, полученные на основе замещенных 4-, 6- и 7-аминоиндолов являются практически нетоксичным соединениям.

Впервые изучен спектр и тип противомикробного действия соединений с потенциальной противомикробной активностью, производных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов. Синтетические производные 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов продемонстрировали различный спектр противомикробного действия от узкого до широкого, включающего способность подавлять рост и размножение грамположительных и грамотрицательных штаммов микроорганизмов. Впервые доказана способность исследуемых соединений в минимальных подавляющих концентрациях оказывать бактериостатическое действие и устойчивая тенденция к задержке роста и размножения тест-штаммов микроорганизмов в присутствии производных 4-, 6-, 7-аминоиндолов.

Впервые выявлено отсутствие токсического воздействия соединений с потенциальной противомикробной активностью, производных 4-, 6-, 7-аминоиндолов на клетки прокариот и эукариотические клетки *in vitro*.

Впервые выявлена дозозависимая SOS-индуцирующая активность синтетических производных 4-, 6-, 7-аминоиндолов *in vitro*. Выявленная способность определяет один из механизмов биологического действия исследуемых соединений на прокариотическую клетку – воздействие на ДНК.

Впервые подтверждена противомикробная активность замещенных амидов на основе 4-, 6-, 7-аминоиндолов в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов на модели экспериментальной хирургической раневой инфекции *in vivo*. Местное лечение исследуемыми соединениями, приводило к сокращению числа жизнеспособных микроорганизмов в ранах значительно раньше, чем можно было бы ожидать при естественном заживлении необработанных ран, что приводило к элиминации бактерий из инфицированной ткани. Исследуемые соединения эффективно препятствовали распространению

микроорганизмов в подлежащие ткани и генерализации инфекционного процесса и ускоряли заживление зараженных ран.

Впервые установлены закономерности зависимости противомикробной активности от структуры молекулы и характера заместителей в исследованных индолиламидах и пирролохинолонах. Противомикробная активность полученных и изученных производных индола и пирролохинолонов, из анализа результатов проведенных исследований и литературных данных, обусловлена боковой цепью молекул. Выраженная антибактериальная активность характерна для соединений, имеющих трифторметильную группу в амидной части молекулы. Отсутствие в молекуле фторсодержащего заместителя приводит к потере активности препарата против микроорганизмов. Так соединения 17, 6D не обладают в приемлемых концентрациях каким-либо заметным действием против исследуемых штаммов как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов. Наблюдается также тесная зависимость противомикробной активности от тонкой структуры препарата. Из литературных данных известно, что важными классами антимикробных препаратов являются спирты и амиды, т. е. содержание HO- или O=C-NH-функции. Этим требованиям отвечают, полученные и исследованные, циклические амиды HD, 5D, 7D, в молекулах которых имеются как закрепленная гидроксильная, так и амидная группы. Действительно, эти соединения по сравнению с другими показывали наибольшую противомикробную активность. Нециклические амиды, полученные на основе 5-аминоиндолов, либо узконаправлены, либо малоактивны в отношении изученных штаммов микроорганизмов. Активность нециклических амидов зависит от характера замещения в бензольном и пиррольном кольцах индольной системы, а также положения амидной группировки. Наличие или отсутствие метильных групп в индольном фрагменте амидов не вносят существенного изменения противомикробной активности. Метоксильная группа в положении 6 индолил-5-амида резко снижает противомикробную активность.

### **Научно-практическая ценность работы**

Результаты настоящей работы значительно расширяют существующие представления о соединениях обладающих противомикробной активностью, как с точки зрения микробиологии прокариот, так и в аспекте фармакологии лекарственных средств. Представлен экспериментальный фактический материал о закономерностях синтеза новых соединений, на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов. Показана перспективность поиска соединений с высокой противомикробной активностью среди замещенных индолиламидов и пирролохинолонов. В процессе исследования разработан новый способ определения типа противомикробного действия новых соединений с антимикробной активностью. На основе скрининга получена и исследована новая серия синтетических производных 4-, 5-, 6-, 7-

аминоиндолов, обладающих той или иной противомикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Полученные результаты являются основанием для дальнейшего исследования синтетических производных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов с целью клинического применения изученных соединений в качестве противомикробных препаратов.

### **Связь диссертации с основными научными темами университета**

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».

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Синтезированная серия индолиламидов и пирролохинолонов, полученная за счет реализации синтетических возможностей использования в качестве исходных соединений замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов, обладает противомикробной активностью и является новым неблагоприятным абиотическим фактором для прокариотических микроорганизмов.
2. Проведен скрининг противомикробной активности замещенных амидов и пирролохинолонов на основе 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов и изучен спектр и тип противомикробного действия отобранных потенциальных противомикробных соединений с низкой токсичностью в отношении грамположительных и грамотрицательных условно-патогенных и некоторых патогенных микроорганизмов *in vitro*. В процессе проводимого исследования разработан новый способ определения типа противомикробного действия новых соединений с противомикробной активностью.
3. Определено отсутствие токсических эффектов потенциальных противомикробных соединений, производных 4-, 6-, 7-аминоиндолов при воздействии на клетки прокариот и эукариотические клетки в условиях *in vivo* и возможность повреждения генетического материала клеток прокариот синтетическими производными замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов *in vitro*.
4. Исследована эффективность потенциальных противомикробных соединений, производных 4-, 6-, 7-аминоиндолов на модели экспериментальной хирургической раневой инфекции, вызванной грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами в условиях *in vivo*.
5. Установлены закономерности зависимости противомикробной активности от структуры молекулы и характера заместителей в исследуемых индолиламидах и пирролохинолонах.

## **Внедрение результатов в практику**

Результаты представленной работы внедрены в учебный и научно-исследовательский процесс кафедры химии, технологии и методик обучения ФГБОУ ВО «МГПИ им. М. Е. Евсевьева», кафедр иммунологии, микробиологии и вирусологии и фармакологии, клинической фармакологии ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарева». Результаты исследовательской работы включены в программу обучения ординаторов и аспирантов Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарева» и аспирантов ФГБОУ ВО «МГПИ им. М. Е. Евсевьева» в качестве лекционного и дополнительного учебно-методического материала.

Результаты работы стали основой для выпуска ряда документов таких как, «Внебольничная пневмония: практические рекомендации по диагностике и лечению: Методические рекомендации» (Н. М. Селезнева, И. С. Степаненко, И. В. Акулина. – Саранск : Изд-во Мордов. ун-та, 2005. – 51 с.); «Культуральные свойства клинически значимых микроорганизмов (пособие для врачей)» (И. С. Степаненко, Г. Н. Холодок, И. П. Кольцов. – Хабаровск, 2007. – 76 с. : ил.); Патент на изобретение «Противомикробное средство» №2556509 приоритет от 11.02.2014 (дата публикации 10.07.2015); «Культуральные свойства клинически значимых микроорганизмов: учебное пособие» (И. С. Степаненко, Г. Н. Холодок, И. П. Кольцов. – 2-е изд., перераб. и доп. – Саранск : Изд-во Мордов. ун-та, 2014. – 76 с. : ил.); в ФГБУ «Федеральный институт промышленной собственности» подана заявка на изобретение («Способ определения типа противомикробного действия соединений, обладающих антимикробной активностью», регистрационный номер: 2018128308) по которой по результатам проведения экспертизы по существу принято положительное решение; Патент на изобретение «Способ получения *N*-(индолил)трифторацетамидов, обладающих противомикробным действием», № 2675806 приоритет от 20.07.2018 (дата публикации 25.12.2018).

## **Степень достоверности и апробация диссертации**

Достоверность полученных в работе результатов подтверждается использованием для синтеза исследуемых соединений коммерчески доступных реагентов известных фирм (Sigma-Aldrich, Acros Organic и др.), спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР  $^1\text{H}$ ), ультрафиолетовой спектроскопии (УФ), инфракрасной спектроскопии (ИК), масс-спектрометрии, тонкослойной хроматографии (ТСХ), элементного анализа для доказательства строения, состава и индивидуальности соединений, полученных при выполнении химического эксперимента, достаточным объемом микробиологического материала, наличием документации к используемым тест-культурам микроорганизмов, использованием для окончательной идентификации и исследования чувствительности к антибиотикам исследуемых опытных штаммов автоматической бактериальной системы «Sensititre» (UK), достаточным объемом

исследований с использованием сертифицированных животных, корректно проведенной обработкой данных с применением современных методов статистического анализа, соблюдением этических требований и проведением исследований в соответствии с международными стандартами.

Апробация диссертации проведена на расширенном заседании кафедр фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии и иммунологии, микробиологии и вирусологии Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва», протокол № 11 от 12 декабря 2018 г.

Материалы диссертации докладывались на Международной молодежной научно-практической конференции (Ярославль, 2013), Международных научно-практических конференциях (Тамбов 2013, 2017), ежегодных Международных конгрессах МАКМАХ/ESCMID по антимикробной терапии (Москва, 2013; 2015), Конгрессе Национальной ассоциации фтизиатров (Санкт-Петербург, 2014), ежегодных Всероссийских конгрессах по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии «Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, 2015; 2016; 2018), ежегодных научных конференциях «Огаревские чтения» ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарева» (Саранск, 2014; 2015; 2017).

#### **Личный вклад автора**

Автор лично выдвинула концепцию о направленном синтезе и изучение физиологического действия новых биологических активных соединений со строго определенной структурой, представляющих фармакологический интерес, как основе для поиска и расширения спектра абиотических факторов окружающей среды, неблагоприятно влияющих на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы и платформе для скрининга новых потенциальных противомикробных препаратов, создающей возможности их дальнейшего изучения и перспективы применения в медицинской практике и обосновала ее. Лично автором осуществлена разработка дизайна исследования. Автор непосредственно участвовала во всех этапах диссертационного исследования. Автор самостоятельно написала рукопись настоящей диссертации и автореферат, принимала основное участие в подготовке научных публикаций.

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертационное исследование соответствует паспорту специальности 14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология, включая следующие области исследования:

- поиск новых биологически активных фармакологических веществ среди природных и впервые синтезированных соединений, продуктов биотехнологии, геной инженерии и других современных технологий на экспериментальных моделях патологических состояний;
- исследование зависимости «структура-активность» в различных классах химических веществ, проведение направленного синтеза и скрининга фармакологических веществ;

- экспериментальное (доклиническое) изучение безопасности фармакологических веществ – токсикологические исследования, включающие изучение токсичности потенциальных лекарственных препаратов и их готовых лекарственных форм в условиях острых и хронических экспериментов на животных, а также оценку возможных специфических видов токсичности и проявление нежелательных побочных эффектов (мутагенность, эмбриотоксичность, тератогенность, влияние на репродуктивную функцию, аллергизирующее действие, иммунотоксичность и канцерогенность).

#### **Публикации по теме диссертации**

По материалам диссертации опубликованы 46 научных работ, из них 19 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций на соискание ученых степеней и 8 – включенных в международные системы цитирования и базы данных SCOPUS и Web of Science. По результатам исследования получено 2 патента на изобретение Российской Федерации.

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа представлена в виде рукописи, имеет следующую структуру: титульный лист, оглавление, введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, 9 глав собственных исследований, заключение, итоги выполнения диссертационной работы, выводы, перспективные направления дальнейшего развития темы диссертационного исследования, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, список литературы. Работа выполнена печатным способом на 429 страницах. Список литературы содержит 535 литературных источников: 174 – отечественных и 361 – зарубежный. Работа оформлена с использованием 109 таблиц, 29 рисунков и 25 схем.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы диссертационного исследования**

Для достижения цели и решения поставленных задач использовались классические и модернизированные методы органического синтеза. Строение, индивидуальность соединений, полученных при выполнении химического эксперимента доказаны с использованием современных методов физико-химического и спектрального анализа, включая УФ-, ЯМР <sup>1</sup>H-спектроскопию, ИК, масс-спектрометрию, ТСХ (тонкослойная хроматография), элементный анализ. Названия енаминам, амидам, пирролохинолонам даны по правилам компьютерной программы ACDLABS IUPAC Name Generator, структурные формулы соединений нарисованы в компьютерной программе ISIS Draw 2,4.

Для прогноза потенциальной фармакологической активности и токсичности (наличие (*Pa*) или отсутствие (*Pi*)) использовалась компьютерная система прогнозирования

биологической активности веществ PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) на основе анализа так называемых обучающих выборок, содержащих десятки тысяч молекул органических веществ различных химических классов, проявляющих множество видов биологической активности [Филимонов Д. А., Поройков В. В., 2006; Varnek A., 2008; Филимонов Д. А. и др., 2014]. В работе мы использовали версию 9.1, зарегистрированную в 2007 году.

Для изучения чувствительности микроорганизмов к полученной серии синтетических соединений, согласно общепризнанным в фармакологии и микробиологии принципам поиска и доклинического исследования противомикробных свойств новых соединений, использовались метод серийных разведений в бульоне (макрометод «пробирочный») и диско-диффузионный метод (ДДМ) [Приказ МЗ СССР №535 от 22.04.1985г.; СП 1.2.036-95; ФЗ от 30.03.99 N 52-ФЗ; СП 1.3.2322-08; МУК 4.2.1890-04; Миронов А. Н. и др., 2012; Козлов Р. С. и др., 2018].

В качестве тест-микроорганизмов для изучения противомикробной активности исследуемых соединений использовали музейные штаммы: *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Staphylococcus aureus* 43300 ATCC (MRSA), *Staphylococcus aureus* 906, *Escherichia coli* 25922 ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 ATCC, *Streptococcus pyogenes* 1238 ATCC, *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC, *Streptococcus pneumoniae* 49619 ATCC, *Salmonella enteritidis* 5765 ATCC, *Shigella sonnei* S-форма, *Pseudomonas aeruginosa* 453, *Escherichia coli* M-17, *Enterococcus faecalis* 19433 ATCC, *Citrobacter freundii* 101/57, *Proteus vulgaris* «Цветков», *Klebsiella pneumoniae* 13883 ATCC, *Bacillus cereus* 96, *Mycobacterium tuberculosis* (музейные штаммы, используемые в работе, получены из коллекции музея живых культур ФГУН «ГИСК им. Л. А. Тарасевича», ЦЭК МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, ФБУН «ГНЦ ПМБ» («ГКПИМ – Оболенск»), Vecton Dickinson France S.A.S.), *Mycobacterium tuberculosis* (клинический штамм, чувствительный к противотуберкулезным препаратам).

В качестве опытных исследовались штаммы микроорганизмов (n=3150) изолированные из материала, взятого от больных с неспецифическими и специфическими заболеваниями органов дыхания и мочевыводящих путей, кишечника с различной чувствительностью к традиционно применяемым антимикробным препаратам.

Источником выделения патогенов служила моча, мокрота, слизь из зева, носа и носоглотки, отделяемое ран, фекалии, секционный материал. Верификацию лабораторных штаммов микроорганизмов проводили бактериологическими методами по классической методике [Приказ МЗ СССР №535 от 22.04.1985г.]. Окончательную идентификацию и определение чувствительности микроорганизмов к традиционным антимикробным препаратам проводили с помощью автоматической бактериальной системы «Sensititre» (UK).

Для определения чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к изучаемым соединениям использовали метод абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена [Федеральный закон от 30.03.99 N 52-ФЗ; СП 1.3.2322-08; СП 1.2.036-95].

Для исследования острой токсичности в работе изучали действие исследуемых соединений, проявляющееся после их однократного применения. Острую токсичность определяли с использованием лабораторных животных (мыши и крысы) при различных путях введения (внутрибрюшинное, внутрижелудочное, накожное). Основные параметры острой токсичности изучаемых соединений среднетелетальные дозы LD<sub>50</sub>, LD<sub>16</sub>, LD<sub>84</sub> вычислялись с помощью метода Литчфилда и Уилкоксона [Миронов А. Н. и др., 2012].

Для выделения наиболее перспективных фармакологических агентов по совокупности и оптимальному сочетанию критериев противомикробной активности и безопасности в работе использовались функциональные возможности метода бинарной логистической регрессии, который позволяет учесть вклад отдельных факторов в формирование общего эффекта кандидата в лекарственное средство [Миронов А. Н. и др., 2012].

Для определения типа противомикробного действия использовали методику проведения опытов при воздействии исследуемых соединений в физиологическом растворе при комнатной температуре и коротких экспозициях [Першин Г. Н. и др., 1975; Миронов А. Н. и др., 2012]. Тип действия исследуемых соединений подтвержден, разработанным в ходе исследования, новым способом определения типа противомикробного действия соединений, обладающих антимикробной активностью [Заявка на изобретение «Способ определения типа противомикробного действия соединений, обладающих антимикробной активностью», регистрационный номер: 2018128308; 2018].

Для оценки SOS-индуцирующей активности исследуемых соединений использован SOS-хромотест [Quillardet P. et al., 1982; Миронов А. Н. и др., 2012]. SOS-хромотест рекомендован для изучения механизма антибактериального действия, основанного на воздействии исследуемых соединений на ДНК. SOS-система прокариот – это защитная система бактерий, которая активируется в ответ на серьезные повреждения ДНК или ингибирование репликации и запускает цепь защитных реакций, в том числе экспрессию многих генов, связанных с репарацией. Физиологические изменения в клетке под действием SOS-системы называют SOS-ответом [Миронов А. Н. и др., 2012]. В качестве тестерного штамма в исследовании использован штамм *Escherichia coli* PQ 37 с генотипом *F- thr leu his-4 pyrD thi galE galK lacΔU169 srl300::Th10 rpoB rpsL uvrA rfa trp::Muc+ sfi A::Mud(Ap, lac)cts*. Благодаря присутствию «сшивки» генов *sfi A::lac Z*, экспрессия гена β-галактозидазы *lacZ* в штамме PQ 37 находится под контролем промотора гена *sfiA*, одного из компонентов SOS-регулона *E.coli*. Показателем SOS-индуцирующей активности исследуемых соединений в SOS-хромотесте

является активностью  $\beta$ -галактозидазы, которая оценивается относительно активности конститутивного фермента микроорганизмов – щелочной фосфатазы, что позволяет контролировать также токсический эффект исследуемых соединений на клетки бактерий. Исследование активности  $\beta$ -галактозидазы и щелочной фосфатазы проводили с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1800 (Japan).

Определение цитотоксичности исследуемых соединений проводили с помощью МТТ-теста [O'Hare S., Atterwill C. K., 1995; Simon P. Langdon, 2004; Миронов А. Н. и др., 2012]. Линия опухолевых клеток HeLa (ATCC® CCL-2™), используемая в работе, получена из коллекции банка глубоководнозамороженных клеточных культур ГУ «НИИВ им. Д. И. Ивановского РАМН» и представляет собой эпителиальные клетки аденокарциномы шейки матки человека. Принцип данного метода базируется на способности митохондриальных дегидрогеназ живой метаболически активной клетки превращать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в формазан, который выпадает в виде кристаллов внутри клетки. Растворение формазана с помощью диметилсульфоксида (ДМСО) и последующая фотометрия цветного (фиолетового) раствора позволяет косвенно оценить долю погибших клеток под влиянием изучаемого соединения по изменению оптической плотности раствора в опытных лунках по отношению к контрольным. Оптическая плотность раствора определялась на микропланшетном ИФА-фотометре (Immunochem 2100 «High Technology Inc.», США).

Для определения генотоксичности исследуемых соединений использовали тест Эймса [Миронов А. Н. и др., 2012; Маргулис А. Б. и др., 2012]. Принцип теста Эймса базируется на культивировании тест-штаммов *Salmonella typhimurium* (*Salmonella typhimurium* TA100: генотип: *hisG46*, *rfa*, *uvr-*, *pkm101*, *bio-*, ревертирование к прототрофности происходит путем замены пар оснований, коллекция микроорганизмов кафедры генетики ФГБОУ ВО «МГУ им. М. В. Ломоносова») ауксотрофных по гистидину, т.е. нуждающиеся в нем, на специальной питательной среде, не содержащей гистидин. Видимый рост на используемой среде могут давать штаммы в которых произошли мутационные изменения от ауксотрофности по гистидину к прототрофности.

Изучение противомикробной активности замещенных амидов на основе 4-, 6-, 7-аминоиндолов в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов *in vivo* проводили на модели экспериментальной хирургической раневой инфекции [T. Dai et al., 2011; Amsterdam D., 2014]. Количественное определение микроорганизмов в ранах проводилось методом поверхностных смывов и путем гомогенизации инфицированных ран. С целью оценки системной инфекции изучались внутренние органы, такие как печень, селезенка, почки и кровь. После каждого посева проводили определение чувствительности полученных микроорганизмов

к исследуемым соединениям методом серийных разведений. Все культуры микроорганизмов, выделенные из крови и органов исследуемых животных, были исследованы с помощью бактериологического анализатора, чтобы гарантировать то, что выделенные микроорганизмы имеют те же свойства, что и используемые для инфицирования штаммы.

Все исследования проводились также в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований [2012].

Статистическую обработку полученных 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]. Данные обрабатывали статистически на Intel Atom N570, применяя программу Stat 6.0. В работе использовали персональный компьютер и стандартный набор программ по статистике.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

#### ***Химико-технологический этап и неэкспериментальный прогноз биологической активности исследуемых соединений***

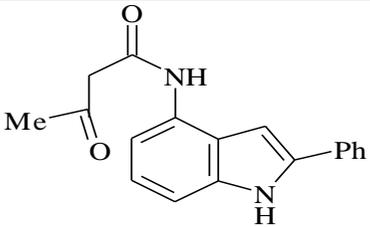
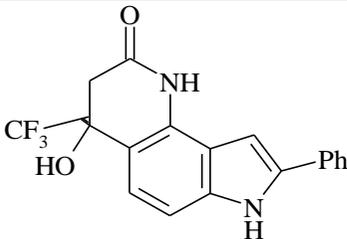
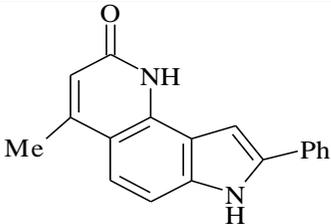
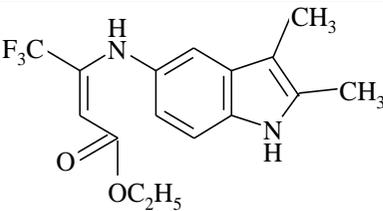
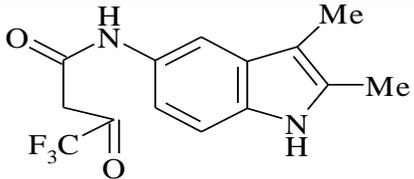
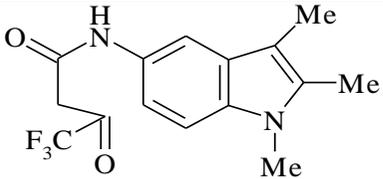
На химико-технологическом этапе исследования были разработаны методы получения и синтезированы 16 исходных аминокислот и 32 их производных индолиламинов, енаминов и пирролохинолонов. Проведена оценка чистоты полученных субстанций.

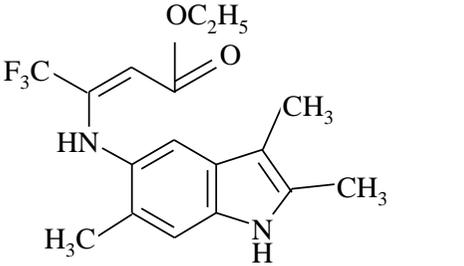
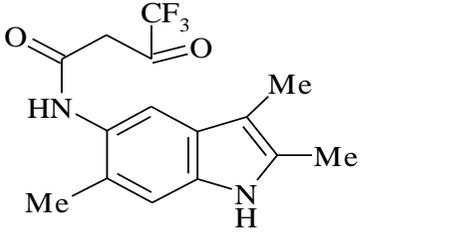
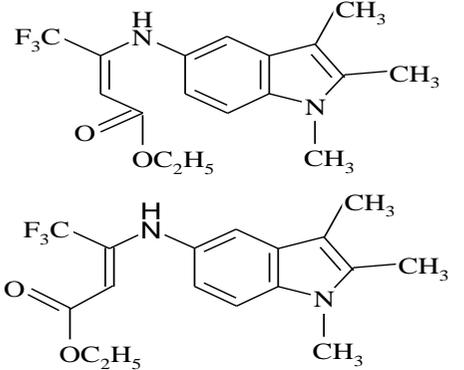
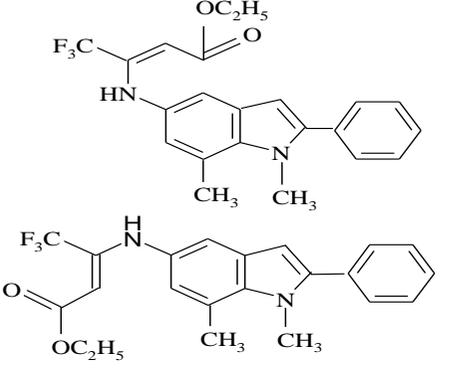
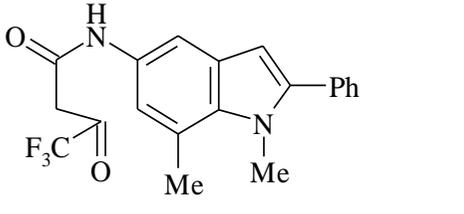
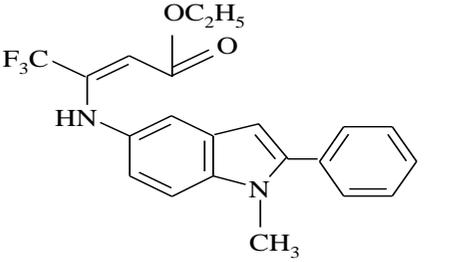
Поскольку в современной фармакологической науке доминируют подходы к разработке и отбору биологически активных молекул, основанные на многоэтапном процессе, одним из элементов которого является фармакологический скрининг, для снижения экономических затрат, гуманизации научных исследований с использованием лабораторных животных и биологических систем, был осуществлен неэкспериментальный прогноз токсичности и противомикробной активности в рядах синтезированных производных замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминокислот.

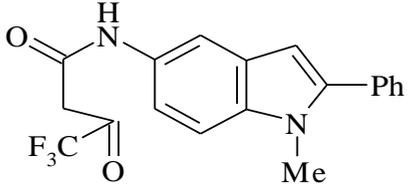
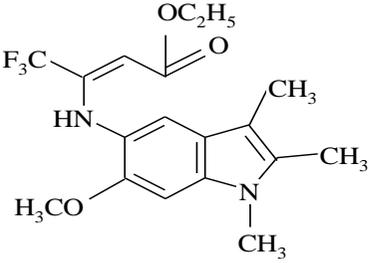
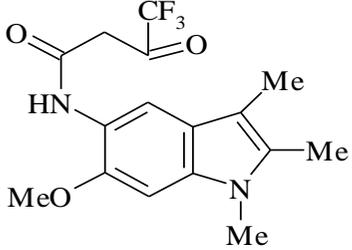
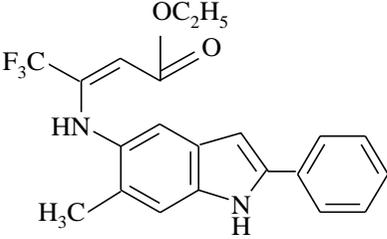
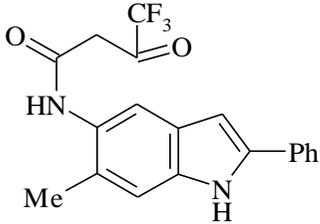
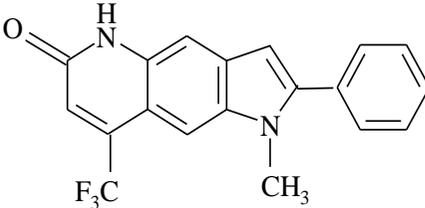
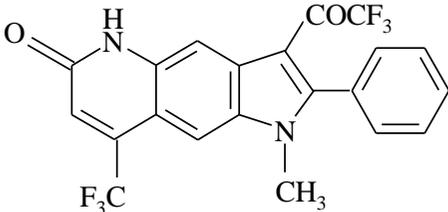
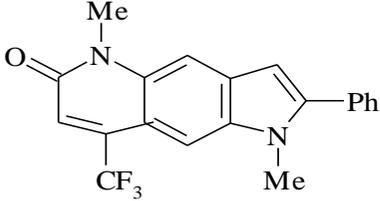
В настоящее время усилиями отечественных и зарубежных ученых создана компьютерная система прогнозирования биологической активности веществ PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) на основе анализа так называемых обучающих выборок, содержащих десятки тысяч молекул органических веществ различных химических классов, проявляющих множество видов биологической активности. В своей работе мы использовали версию 9.1, зарегистрированную в 2007 году.

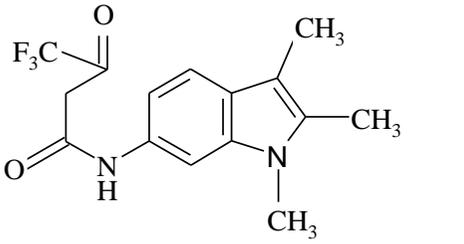
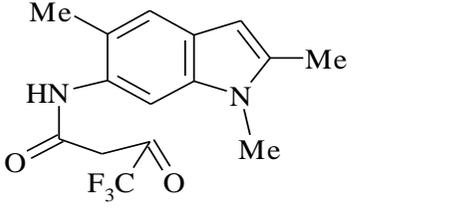
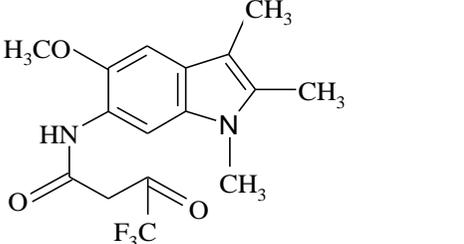
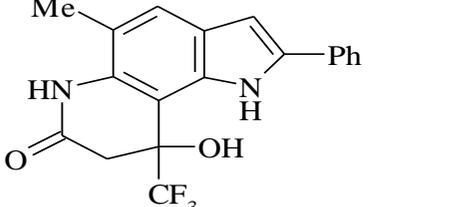
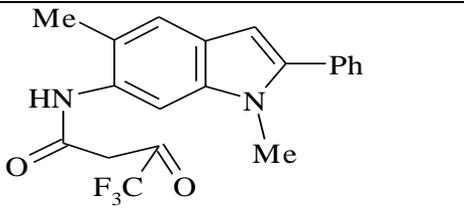
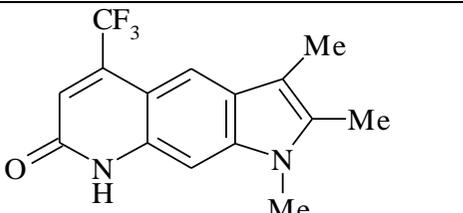
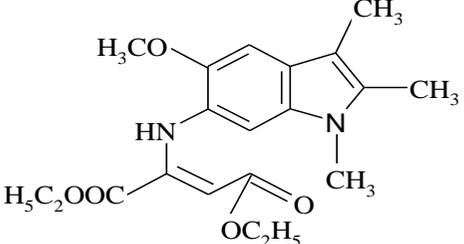
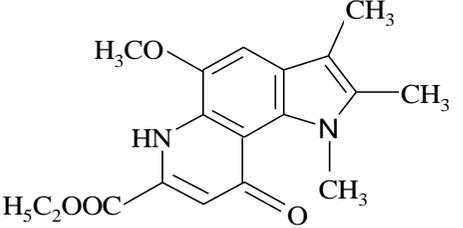
Для каждого из производных, индолиламинов, енаминов и пиррохинолонов, был рассчитан прогноз потенциальной фармакологической активности и токсичности. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1.

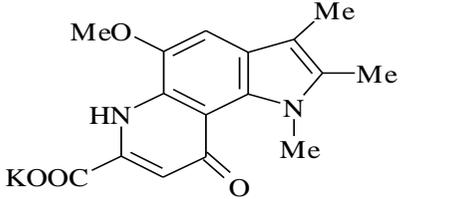
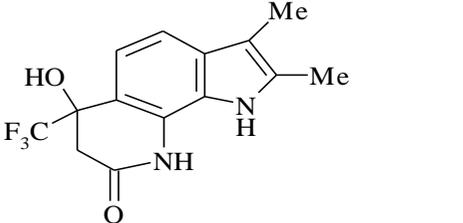
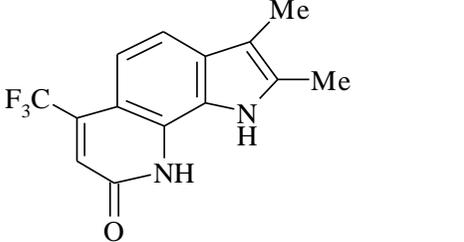
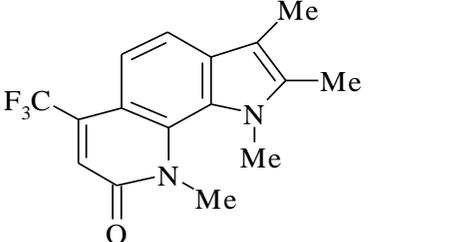
Таблица 1 – Неэкспериментальный прогноз противомикробной активности в рядах замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов

| Соединение  | Структурная формула   | <i>Pa</i> | Соединение   | Структурная формула   | <i>Pa</i> |
|---|---|-----------|--|---|-----------|
| 1   | 2   | 3         | 4  | 5   | 6         |
| 3-Оксо- <i>N</i> -(2-фенил-1 <i>H</i> -индол-4-ил)бутанамид (16-6D)                       |    | 0,572     | 4-Гидрокси-8-фенил-4-(трифторметил)-1,3,4,7-тетрагидро-2 <i>H</i> -пирроло[2,3- <i>h</i> ]хинолин-2-он (18-5D) |    | 0,832     |
| 4-Метил-8-фенил-1,7-дигидро-2 <i>H</i> -пирроло[2,3- <i>h</i> ]хинолин-2-он (17-17)       |    | 0,611     | Этиловый эфир (Z)-4,4,4-трифтор-3-[(2,3-диметил-1 <i>H</i> -индолил-5)амино]-2-бутеновой кислоты (1c)          |    | 0,424     |
| <i>N</i> -(2,3-диметил-1 <i>H</i> -индол-5-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (2c) (19-3D) |  | 0,624     | 4,4,4-трифтор-3-оксо- <i>N</i> -(1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индол-5-ил)бутанамид (2d) (20-2D)                  |  | 0,553     |

| 1  | 2   | 3     | 4  | 5   | 6     |
|--|---|-------|--|---|-------|
| <p>Этиловый эфир (<i>Z</i>)-4,4,4-трифтор-3-[(2,3,6-триметил-1<i>H</i>-индолил-5)-амино]-2-бутеновой кислоты (<b>1e</b>)</p>   |    | 0,418 | 4,4,4-трифтор-3-оксо- <i>N</i> -(2,3,6-триметил-1 <i>H</i> -индол-5-ил)бутанамид ( <b>2e</b> ) ( <b>21-64D</b> )                   |    | 0,508 |
| <p>Этиловый эфир (<i>E,Z</i>)-4,4,4-трифтор-3-[(1,2,3-триметил-1<i>H</i>-индолил-5)-амино]-2-бутеновой кислоты (<b>1d</b>)</p> |   | 0,452 | Этиловый эфир ( <i>E,Z</i> )-4,4,4-трифтор-3-[(1,7-диметил-2-фенил-1 <i>H</i> -индолил-5)-амино]-2-бутеновой кислоты ( <b>1g</b> ) |   | 0,409 |
| <p><i>N</i>-(1,7-диметил-2-фенил-1<i>H</i>-индол-5-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (<b>2g</b>) (<b>24-235D</b>)</p>          |  | 0,599 | Этиловый эфир ( <i>Z</i> )-4,4,4-трифтор-3-[(1-метил-2-фенил-1 <i>H</i> -индолил-5)-амино]-2-бутеновой кислоты ( <b>1h</b> )       |  | 0,335 |

| 1  | 2   | 3     | 4  | 5   | 6     |
|--|---|-------|--|---|-------|
| <p><i>N</i>-(1-метил-2-фенил-1<i>H</i>-индол-5-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (2h) (<b>22-32D</b>)</p>                    |    | 0,536 | <p>Этиловый эфир (<i>Z</i>)-4,4,4-трифтор-3-[(6-метокси-1,2,3-триметил-1<i>H</i>-индолил-5)-амино]-2-бутеновой кислоты (<b>1i</b>)</p> |    | 0,437 |
| <p>4,4,4-трифтор-<i>N</i>-(6-метокси-1,2,3-триметил-1<i>H</i>-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (<b>2i</b>) (<b>25-66D</b>)</p>    |    | 0,762 | <p>Этиловый эфир (<i>Z</i>)-4,4,4-трифтор-3-[(6-метил-2-фенил-1<i>H</i>-индолил-5)-амино]-2-бутеновой кислоты (<b>1k</b>)</p>          |    | 0,407 |
| <p>4,4,4-трифтор-<i>N</i>-(6-метил-2-фенил-1<i>H</i>-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (<b>2k</b>) (<b>23-43D</b>)</p>             |   | 0,770 | <p>1-Метил-2-фенил-8-(трифторметил)-1,5-дигидро-6<i>H</i>-пирроло-[2,3-<i>g</i>]хинолин-6-он (<b>1l</b>)</p>                           |   | 0,228 |
| <p>1-метил-2-фенил-3-трифторацетил-8-(трифторметил)-1,5-дигидро-6<i>H</i>-пирроло-[2,3-<i>g</i>]хинолин-6-он (<b>2l</b>)</p> |  | 0,374 | <p>1,5-Диметил-2-фенил-8-(трифторметил)-1,5-дигидро-6<i>H</i>-пирроло-[2,3-<i>g</i>]хинолин-6-он (<b>26-39D</b>)</p>                   |  | 0,576 |

| 1   | 2   | 3     | 4  | 5   | 6     |
|---|---|-------|--|---|-------|
| 4,4,4-трифтор-3-оксо- <i>N</i> -(1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индол-6-ил)бутанамид                                |    | 0,134 | 4,4,4-Трифтор-3-оксо- <i>N</i> -(1,2,5-триметил-1 <i>H</i> -индол-6-ил)бутанамид ( <b>27-243D</b> )                  |    | 0,682 |
| 4,4,4-трифтор- <i>N</i> -(5-метокси-1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индол-6-ил)-3-оксобутанамид                      |    | 0,472 | 9-Гидрокси-5-метил-2-фенил-9-(трифторметил)-1,6,8,9-тетрагидро-пирроло-[2,3- <i>f</i> ]хинолин-7-он ( <b>30-7D</b> ) |    | 0,851 |
| <i>N</i> -(1,5-диметил-2-фенил-1 <i>H</i> -индол-6-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид ( <b>28-S3</b> )           |   | 0,909 | 1,2,3-Триметил-5-(трифторметил)-1,8-дигидро-7 <i>H</i> -пирроло[3,2- <i>g</i> ]хинолин-7-он ( <b>29-ТФПХ</b> )       |   | 0,501 |
| Диэтиловый эфир (2- <i>Z</i> )-2-[(5-метокси-1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индол-6-ил)амино]бутен-2-диовой кислоты |  | 0,103 | 1,2,3-Триметил-5-метокси-7-этоксикарбонил-6,9-дигидро-1 <i>H</i> -пирроло[2,3- <i>f</i> ]хинолин-9-он                |  | 0,056 |

| 1  | 2   | 3     | 4  | 5   | 6     |
|--|---|-------|--|---|-------|
| Калиевая соль 7-гидроксикарбонил-1,2,3-триметил-5-метокси-1 <i>H</i> -пирроло[2,3- <i>f</i> ]хинолин-9-она ( <b>31-КПХ</b> ) |  | 0,499 | 6-Гидрокси-2,3-диметил-6-(трифторметил)-1,6,7,9-тетрагидро-8 <i>H</i> -пирроло[3,2- <i>h</i> ]хинолина-8-он ( <b>32-НД</b> ) |  | 0,817 |
| 2,3-Диметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8 <i>H</i> -пирроло[3,2- <i>h</i> ]хинолин-8-он ( <b>34-1D</b> )                    |  | 0,510 | 1,2,3,9-Тетраметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8 <i>H</i> -пирроло[3,2- <i>h</i> ]хинолин-8-он ( <b>36-4D</b> )             |  | 0,926 |

Прогноз наличия ( $P_a$ ) или отсутствия ( $P_i$ ) активности в ряду исследуемых замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов являлся отправной точкой для последующих лабораторно-экспериментальных этапов нашей работы. Для экспериментального изучения были отобраны вещества с вероятностью наличия противомикробной активности в фармакологическом спектре более 50%, т.е.  $P_a$  более 0,500 вне зависимости от вероятности и прогнозной степени токсичности.

По результатам внеэкспериментального скрининга для последующих исследований на экспериментально-микробиологических и фармакологических этапах работы были отобраны вещества с лабораторными шифрами **17, 6D, 5D, 39D, 2D, 3D, 32D, 64D, 43D, 235D, 66D, 243D, 7D, S3, HD, 1D** и **4D, ТФПХ, КПХ** для которых была спрогнозирована высокая вероятность наличия противомикробной активности в фармакологическом спектре.

### ***Исследование противомикробной активности in vitro и острой токсичности исследуемых соединений in vivo***

Для выделения из представленного ряда производных замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов наиболее перспективных молекул мы остановились на двух ключевых параметрах: противомикробная эффективность в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, а также острая токсичность при внутривентральном, внутрижелудочном введении и накожном нанесении. Выбирая подобный дизайн стартового экспериментального этапа, мы основывались на следующем: фармакологическая перспектива кандидата (-ов) в противомикробное лекарственное средство должна основываться на сочетании в первую очередь активности в отношении патогенных для человека штаммов микроорганизмов, в том числе обладающих резистентностью к известным химиотерапевтическим лекарственным средствам, и безопасности вещества для макроорганизма (человека). Противомикробную активность оценивали *in vitro* по определению МПК методом серийных разведений в жидкой питательной среде и диско-диффузионным методом. О безопасности судили по показателю ЛД<sub>50</sub>, определенному у мышей и крыс при указанных путях введения (поступления) действующего вещества в организм животного.

В результате исследования представленной группы соединений мы установили следующее (таблица 2; 3). Из подгруппы веществ, полученных на основе замещенного 4-аминофенилиндола, соединение с лабораторным шифром **5D** (циклический амид), является наиболее активным. Оно обладает выраженной активностью в отношении грамположительных кокков, представителей родов *Staphylococcus*, в том числе MRSA штаммов, *Streptococcus* и *Enterococcus*, активно подавляет рост грамотрицательных микроорганизмов, представителей семейства *Enterobacteriaceae* родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* и

*Klebsiella*, но малоактивно в отношении *P.aeruginosa*. Циклический амид **5D** обладает широким спектром противомикробного действия и активен в отношении антибиотикоустойчивых штаммов *S.aureus* и *S.epidermidis*, *E.coli* и *B.cereus*. При этом, соединение **5D** не уступает по активности препаратам сравнения диоксидину, нитрофурантоину, фосфомицину и мирамистину. Соединения с лабораторными шифрами **6D** (амид) и **17** (пирролохинолон) оказались малоактивны как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных тест-штаммов исследуемых микроорганизмов.

При изучении острой токсичности соединения с лабораторным шифром **5D** установлено отсутствие половой видоспецифичности, показатель ЛД<sub>50</sub> при внутрибрюшинном введении колебался в диапазоне от 580 до 857 мг/кг для крыс и от 709 до 1039 мг/кг для мышей, что с учетом коэффициентов биологического переноса дозы является допустимым. При внутривенном введении значения показателя острой токсичности не выходили за рамки 945-1348 мг/кг для мышей, а накожное нанесение вещества не приводило к гибели животных в диапазоне доз от 2000 до 5000 мг/кг. По классификации токсичности веществ изучаемое соединение относится к практически нетоксичным соединениям.

Из группы производных 5-аминоиндолов, обладающих по результатам компьютерного скрининга вероятностью наличия противомикробной активности, умеренную противомикробную активность проявляют амиды с лабораторными шифрами **43D**, **66D**, **235D** и пирролохинолон **39D**. Исследуемые амиды показали узкий спектр противомикробного действия, в который входят лишь грамположительные микроорганизмы. Наиболее активным в изучаемой группе оказался пирролохинолон **39D**, соединение способное активно подавлять рост и размножение грамположительных, в том числе резистентных к традиционным антимикробным препаратам, а также грамотрицательных исследуемых микроорганизмов, но в достаточно высокой концентрации (250 мкг/мл и более). В то же время, соединение **39D** мало активно в отношении *P.aeruginosa*. Соединение с лабораторным шифром **39D** не уступает по активности препаратам сравнения диоксидину, нитрофурантоину, фосфомицину и мирамистину.

При внутрибрюшинном введении соединения с лабораторным шифром **39D** показатель острой токсичности при внутрибрюшинном введении колебался от 331 до 541 мг/кг. Токсичность вещества не зависела от вида и пола лабораторных животных. При внутривенном введении мышам наблюдали закономерный рост показателя ЛД<sub>50</sub> до 642-850 мг/кг. При накожном нанесении исследуемого соединения в максимально возможной концентрации пирролохинолон **39D** не вызывал гибель животных. Соединение относится к умеренно токсичным веществам.

В группе наиболее перспективных соединений, полученных на основе 6-аминоиндолов, и отобранных для биологического этапа исследования, противомикробную активность проявили вещества с лабораторными шифрами **243D**, **S3** и **7D**. Соединение **S3** высокоактивно в отношении грамотрицательных микроорганизмов, в том числе *P.aeruginosa*. Обладает способностью подавлять рост и размножение грамположительных микроорганизмов. Амид **S3** активен в отношении антибиотикоустойчивых штаммов *S.aureus*, в том числе MRSA штамма, *E.coli* и *P.aeruginosa*.

Соединение с лабораторным шифром **7D** также активно в отношении кишечной палочки и некоторых других грамотрицательных микроорганизмов. Циклический амид **7D** активен в отношении антибиотикоустойчивых штаммов *S.aureus*, в том числе MRSA штамма, *E.coli* и *B.cereus*, а также подавляет рост и размножение *M.tuberculosis*. Соединения с лабораторными шифрами **S3** и **7D** не уступают по активности препаратам сравнения диоксидину, нитрофурантоину, фосфомицину и мирамистину. Соединение **243D** обладает низкой противомикробной активностью и узким спектром противомикробного действия.

**Таблица 2 – Показатели МПК исследуемых соединений в отношении тест-штаммов микроорганизмов**

| № п/п | Шифр исследуемого соединения | Для <i>S.aureus</i> 29213, мкг/мл | Для <i>S.pyogenes</i> 1238, мкг/мл | Для <i>E.coli</i> 25922, мкг/мл | Для <i>B.cereus</i> 96, мкг/мл | Для <i>P.aeruginosa</i> 27853, мкг/мл |
|-------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| 1     | 2                            | 3                                 | 4                                  | 5                               | 6                              | 7                                     |
| 1     | <b>6 D</b>                   | ≤ 250                             | ≤ 250                              | ≤ 250                           | ≤ 250                          | ≤ 250                                 |
| 2     | <b>17</b>                    | ≤ 250                             | ≤ 250                              | ≤ 250                           | ≤ 250                          | ≤ 250                                 |
| 3     | <b>5 D</b>                   | <b>7,8</b>                        | <b>31,25</b>                       | <b>125</b>                      | <b>62,5</b>                    | ≤ 250                                 |
| 4     | <b>3 D</b>                   | ≤ 250                             | ≤ 250                              | ≤ 250                           | ≤ 250                          | ≤ 250                                 |
| 5     | <b>2 D</b>                   | ≤ 250                             | ≤ 250                              | ≤ 250                           | ≤ 250                          | ≤ 250                                 |
| 6     | <b>64 D</b>                  | ≤ 250                             | ≤ 250                              | ≤ 250                           | ≤ 250                          | ≤ 250                                 |
| 7     | <b>32 D</b>                  | ≤ 250                             | ≤ 250                              | ≤ 250                           | ≤ 250                          | ≤ 250                                 |
| 8     | <b>43 D</b>                  | <b>125</b>                        | <b>62,5</b>                        | ≤ 250                           | <b>125</b>                     | ≤ 250                                 |
| 9     | <b>243 D</b>                 | <b>125</b>                        | <b>125</b>                         | ≤ 250                           | <b>250</b>                     | ≤ 250                                 |
| 10    | <b>235 D</b>                 | <b>125</b>                        | <b>62,5</b>                        | <b>250</b>                      | <b>62,5</b>                    | <b>250</b>                            |
| 11    | <b>66 D</b>                  | <b>125</b>                        | <b>125</b>                         | ≤ 250                           | <b>250</b>                     | ≤ 250                                 |

| 1  | 2           | 3            | 4            | 5            | 6           | 7           |
|----|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| 12 | <b>39 D</b> | <b>31,25</b> | <b>31,25</b> | <b>250</b>   | <b>125</b>  | ≤ 250       |
| 13 | <b>S 3</b>  | <b>62,5</b>  | <b>250</b>   | <b>31,25</b> | <b>250</b>  | <b>62,5</b> |
| 14 | <b>7 D</b>  | <b>125</b>   | <b>250</b>   | <b>62,5</b>  | <b>62,5</b> | ≤ 250       |
| 15 | <b>HD</b>   | <b>59</b>    | <b>117</b>   | <b>108</b>   | <b>117</b>  | <b>184</b>  |
| 16 | <b>1 D</b>  | ≤ 250        | <b>125</b>   | ≤ 250        | <b>125</b>  | ≤ 250       |
| 17 | <b>4 D</b>  | <b>125</b>   | <b>125</b>   | <b>125</b>   | <b>125</b>  | ≤ 250       |
| 18 | <b>КПХ</b>  | ≤ 250        | ≤ 250        | ≤ 250        | ≤ 250       | ≤ 250       |
| 19 | <b>ТФПХ</b> | ≤ 250        | ≤ 250        | ≤ 250        | ≤ 250       | ≤ 250       |

**Таблица 3 – Показатели МПК исследуемых соединений в отношении опытных штаммов микроорганизмов**

| № п/п | Шифр исследуемого соединения | Для <i>Staphylococcus spp.</i> , мкг/мл | Для <i>Streptococcus spp.</i> , мкг/мл | Для <i>E.coli</i> , мкг/мл | Для <i>B.cereus</i> , мкг/мл | Для <i>P.aeruginosa</i> , мкг/мл |
|-------|------------------------------|---|--|----------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| 1     | Диоксидин                    | 125-1000                                | 64-1000                                | 8-250                      | -                            | 125-1000                         |
| 2     | Нитро-фурантоин              | 1-100                                   | 2-100                                  | 2-300                      | -                            | -                                |
| 3     | Фосфомицин                   | 0, 5-500                                | 2-250                                  | 0,5-250                    | -                            | 0,5-500                          |
| 4     | Мирамистин                   | 1,0-100                                 | 1,0-100                                | 2,0-500                    | 1,0-100                      | 2,0-500                          |
| 5     | <b>5 D</b>                   | <b>3,9-500</b>                          | <b>31,25-750</b>                       | <b>62,5-1000</b>           | <b>62,5-1000</b>             | ≤ 250                            |
| 6     | <b>43 D</b>                  | 250-1000                                | 62,5-1000                              | ≤ 500                      | 125-1000                     | ≤ 500                            |
| 7     | <b>243 D</b>                 | 250-1000                                | 125-750                                | ≤ 500                      | 250-1000                     | ≤ 500                            |
| 8     | <b>235 D</b>                 | 125-1000                                | 62,5-1000                              | 250-1000                   | 62,5-750                     | 500-1500                         |
| 9     | <b>66 D</b>                  | 125-1000                                | 125-1000                               | ≤ 500                      | 125-1000                     | ≤ 500                            |
| 10    | <b>39 D</b>                  | <b>31,25-1000</b>                       | <b>15,6-750</b>                        | <b>500-1500</b>            | <b>125-750</b>               | ≤ 500                            |
| 11    | <b>S 3</b>                   | <b>31,25-1000</b>                       | <b>125-1000</b>                        | <b>31,25-500</b>           | <b>250-1000</b>              | <b>62,5-1000</b>                 |
| 12    | <b>7 D</b>                   | <b>62,5-1000</b>                        | <b>250-1000</b>                        | <b>31,25-500</b>           | <b>62,5-500</b>              | ≤ 500                            |
| 13    | <b>HD</b>                    | <b>14,25-1000</b>                       | <b>28,5-1000</b>                       | <b>59,0-1000</b>           | <b>117-1000</b>              | <b>184-1000</b>                  |
| 14    | <b>1 D</b>                   | ≤ 500                                   | 62,5-1000                              | ≤ 500                      | 117-1000                     | ≤ 500                            |
| 15    | <b>4 D</b>                   | <b>125-1000</b>                         | <b>62,5-1000</b>                       | <b>125-1000</b>            | <b>125-1000</b>              | <b>500-1500</b>                  |

При внутрибрюшинном введении соединения с лабораторными шифрами **S3** и **7D** проявляли свойства умеренно токсичного вещества, тогда как при внутрижелудочном введении крысам и накожном нанесении в максимально возможном объеме и максимально возможной концентрации для данных способов введения соединения **S3** и **7D** не вызывали гибель экспериментальных животных, вследствие чего определение средней смертельной дозы не представлялось возможным.

По совокупности полученных результатов, изучаемые соединения с лабораторными шифрами **S3** и **7D** относятся к практически нетоксичным веществам.

Группа соединений, полученных на основе замещенных 7-аминоиндолов, наиболее перспективная по результатам скринингового этапа исследования, показала различную противомикробную активность. Наиболее активными оказались соединения с лабораторными шифрами **HD** и **4D**, проявившие широкий спектр действия и способны задерживать рост и размножение грамположительных, в том числе *M.tuberculosis*, и грамотрицательных микроорганизмов. Циклический амид **HD** в дозе от 117 мкг/мл способен подавлять рост и размножение *P.aeruginosa*. Изучаемый циклический амид **HD** активен в отношении антибиотикоустойчивых штаммов *S.aureus*, *E.coli* и *P.aeruginosa*. Соединения с лабораторными шифрами **HD** и **4D** не уступают по активности препаратам сравнения диоксидину, нитрофурантоину, фосфомицину и мирамистину.

В рамках исследования биологических свойств была исследована острая токсичность 6-гидрокси-2,3-диметил-6-(трифторметил)-1,6,7,9-тетрагидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]хинолина-8-она (**HD**) и 1,2,3,9-тетраметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]хинолин-8-он (**4D**). Как и амид **S3** и циклический амид **7D**, исследуемые вещества проявили умеренные токсические свойства при внутрибрюшинном введении. При этом токсичность при внутрижелудочном введении и накожном способе нанесения для крыс определить не удалось по объективным причинам.

Полученные результаты изучения острой токсичности, в частности, невозможность установить показатель ЛД<sub>50</sub> при внутрижелудочном введении на фоне определяемой токсичности при внутрибрюшинном введении указывают на то, что ряд производных не всасывается при приеме внутрь и для них создание пероральных лекарственных форм с ожиданием развития резорбтивного эффекта – бесперспективно.

На основании изложенных рассуждений для дальнейшего углубленного изучения спектра противомикробной активности, механизмов антимикробного действия, эффективности на моделях экспериментальных инфекций в опытах *in vivo* нам необходимо было отобрать 3-4 наиболее перспективных вещества. Для решения этого вопроса мы воспользовались функциональными возможностями метода бинарной логистической регрессии, который

позволяет учесть вклад отдельных факторов в формирование общего эффекта кандидата в лекарственное средство.

На основе расчета показателей отношения шансов для коэффициента предикции активности ( $Pa$ ), значения среднего межгруппового показателя ЛД<sub>50</sub> (среднее значение для самцов и самок мышей), активности в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов построили ROC-кривую уравнения бинарной логистической регрессии, представленную на рисунке 1.

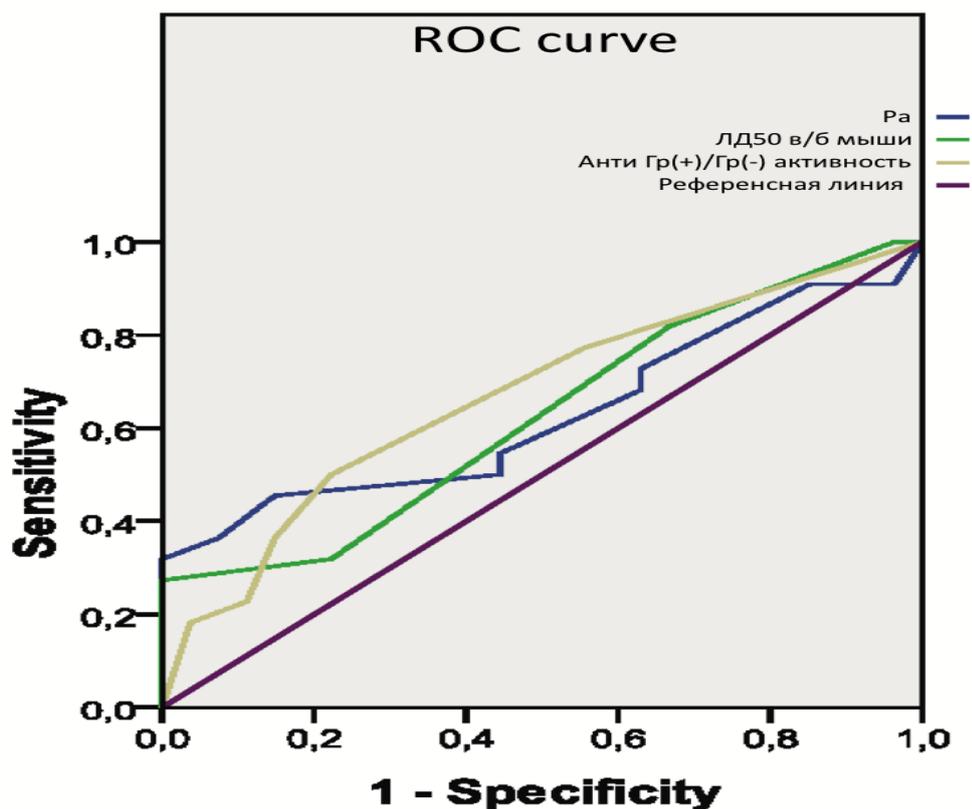


Рисунок 1 – ROC-кривые для изученных показателей активности соединений

В таблице 4 представлены значения основных параметров кривой для изученных показателей.

Анализ показателей, изображенных на ROC-кривой, показал, что они являются чувствительными индикаторами для выделения наиболее перспективных фармакологических агентов по совокупности и оптимальному сочетанию критериев противомикробной активности и безопасности.

**Таблица 4 – Значения показателей ROC-кривой для критериев, характеризующих безопасность и противомикробную активность потенциальных химиотерапевтических лекарственных средств**

| Показатель  | AUC   | SE    | p     | Доверительный интервал на 95% уровне значимости | Чувствительность – Специфичность, (%) |
|---|-------|-------|-------|---|---------------------------------------|
| <i>Pa</i>   | 0,675 | 0,032 | 0,037 | 0,517-0,834                                     | 73,6 – 65,9                           |
| ЛД <sub>50</sub> при внутривнутрибрюшинном введении | 0,660 | 0,024 | 0,043 | 0,505-0,814                                     | 87,3 – 45,9                           |
| Анти Гр(+)/Гр(-) активность                         | 0,669 | 0,041 | 0,032 | 0,514-0,823                                     | 76,4 – 48,4                           |

Примечание: AUC – площадь под кривой; SE – среднее квадратичное отклонение; значения *p* менее 0,05 имеют статистическую значимость

Таким образом, используя вышеописанный математический подход, нам удалось выявить вещества, наиболее перспективные для последующего изучения: циклические амиды **5D**, **7D**, **HD** и нециклический амид **S3**.

***Закономерности зависимости противомикробной активности от структуры молекулы и характера заместителей в исследуемых индолиламидах и пирролохинолонах***

Наряду с вышеуказанным, при исследовании зависимости биологической активности индолиламидов, енаминокетонов, пирролохинолонов от их элементного состава и строения нами доказано, что полученный и исследованный новый класс противомикробных соединений весьма перспективен, поскольку их основой являются структуры метаболитов, встречающиеся в некоторых живых организмах. Известно, что индольная и пирролохинолиновая системы являются структурными элементами молекул многих природных соединений.

Противомикробная активность, полученных и изученных производных аминокетонов и пирролохинолонов, на основе анализа результатов наших исследований и литературных данных, обусловлена боковой цепью молекул.

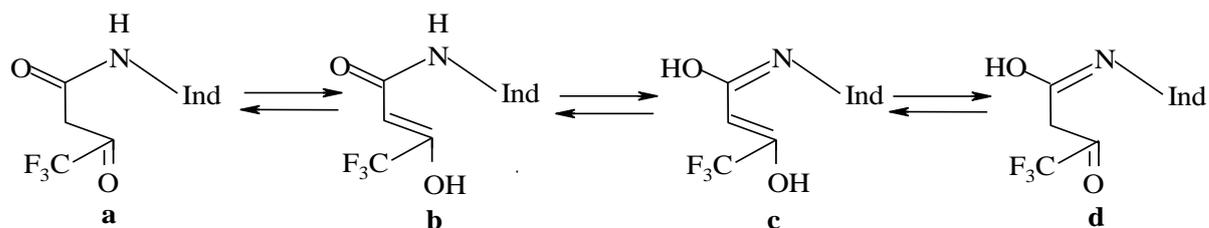
Обнаружено, что противомикробной активностью обладают *N*-индолиламиды, полученные из замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов и трифторацетоуксусного эфира,

имеющие трифторметильный заместитель в амидной части молекулы (**5D**, **HD**, **235D**, **43D**, **S3**, **7D**, **66D**, **243D**, **4D**).

Обнаруженная активность *N*-индолилтрифторацетиламидов определяется тонкой структурой молекул. Из литературных данных известно, что важными классами антимикробных препаратов являются спирты и амиды, т. е. соединения содержащие HO- или O=C-NH-функции. Этим требованиям отвечают, полученные и исследованные нами, циклические амиды **HD**, **5D**, **7D**, в молекулах которых имеются как закрепленная гидроксильная, так и амидная группы. Действительно эти соединения по сравнению с другими показывают наибольшую противомикробную активность.

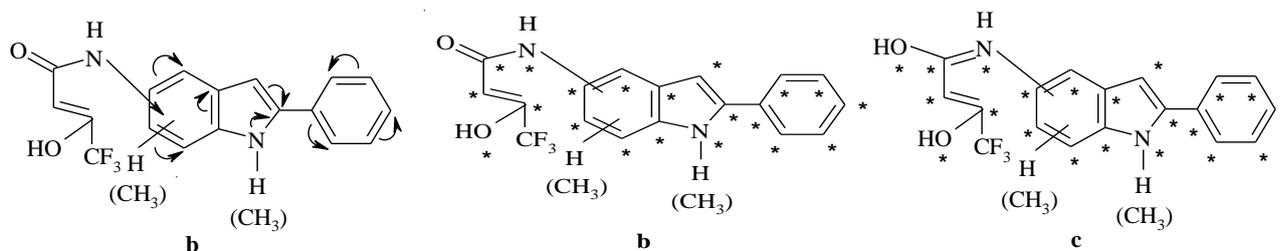
Активность нециклических амидов зависит от характера замещения в бензольном и пиррольном кольцах индольной системы, а также положения амидной группировки.

Спектрами ЯМР<sup>1</sup>H установлено в растворе ДМСО (димексид) индолиламиды нециклического строения образуют равновесную систему, состоящую из четырех возможных таутомеров: **a**, **b**, **c**, **d**.



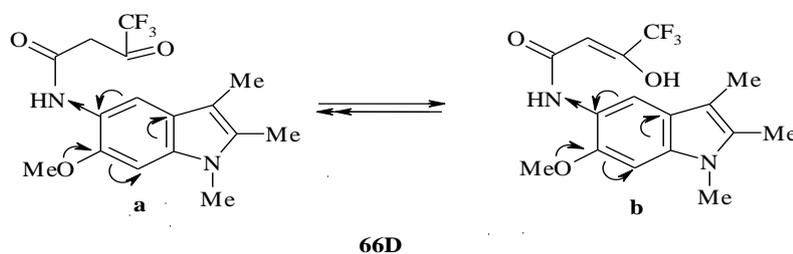
Исходя из структур, наиболее активными должны быть таутомеры **b**, имеющие, как и циклические амиды, гидроксильную и амидную группы. Поэтому большую активность следовало ожидать от соединений в молекулах которых замещенный индольный фрагмент способствует стабилизации **b** таутомерной формы. Из общих закономерностей распределения электронной плотности дестабилизирующим фактором для существования амидного фрагмента в **b** форме является электронно-донорное влияние замещенного индолильного радикала, причем это влияние больше в индолил-5-амидах, чем в амидах, на основе замещенных 6-аминоиндолов. Действительно более высокую активность в этом ряду показывают амиды на основе замещенных 6-аминоиндолов, например, **S3** по сравнению с индолил-5-амидами (**3D**, **235D**, **43D** и др.), что связано, по-видимому, с более высокой концентрацией **b** форм в растворах ДМСО равновесной системы.

Как для производных 5-, так и для 6-индолиламидов противомикробная активность усиливается с введением в  $\alpha$ -положение пиррольного кольца индола фенильного заместителя. Это объясняется как некоторым электронно-акцепторным влиянием фенильной группы, так и увеличением длины цепи сопряжения **b** таутомерной формы молекулы, что способствует ее стабилизации и увеличению концентрации в растворе ДМСО.



Наличие или отсутствие метильных групп в индольном фрагменте амидов не вносят существенного изменения противомикробной активности, т. к. алкильные радикалы в молекулах практически не оказывают влияние на имеющееся в растворе ДМСО таутомерное равновесие.

Метоксильная группа в положении 6 индолил-5-амида резко снижает противомикробную активность, что, по-видимому, связано с дестабилизацией **b** таутомерной формы под действием сильного положительного мезомерного эффекта (+M) O-CH<sub>3</sub>.



Это приводит к снижению концентрации более активной **b** формы амида в равновесном растворе.

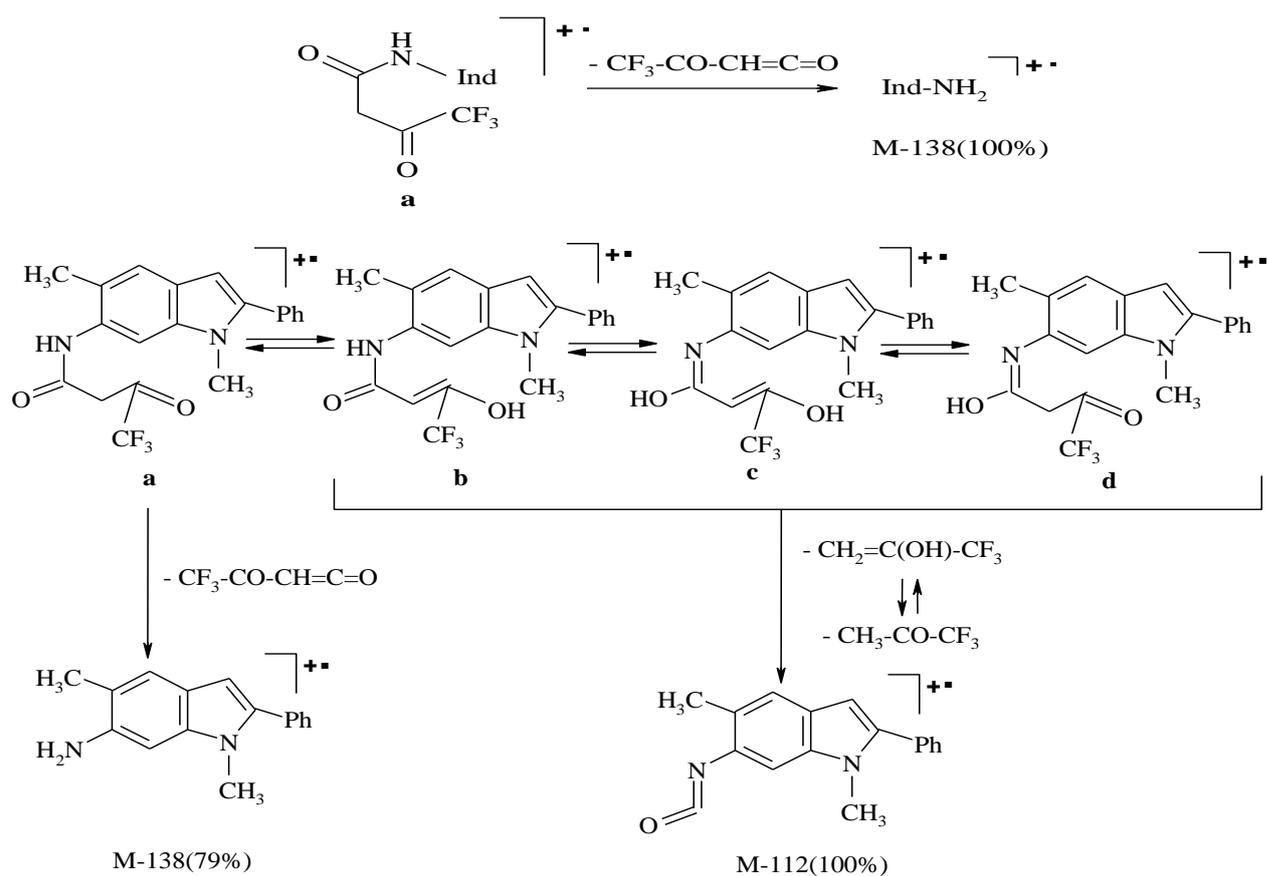
Исходя из изложенного, по-видимому, основная роль группы CF<sub>3</sub> в молекулах нециклических амидов как сильного акцепторного заместителя, способствующего енолизации трифторацетильной функции. Однако нельзя исключать противомикробный эффект соединений из-за наличия фторсодержащего заместителя как фторвысвобождающего. Так, противомикробная активность трифторметилпирролохинолонов в отличие от пирролохинолонов без заместителя CF<sub>3</sub> можно объяснить только этим.

Замена трифторметильной группы в пирролохинолоне на калийкарбоксийную приводит (в случае, с **КПХ**) к изменению активности на стимулирующую.

У соединений без трифторметильной группы противомикробная активность не обнаружена.

Таким образом, трифторметилзамещенные индолиламида и пирролохинолоны обладают в зависимости от структуры той, или иной противомикробной активностью. Наиболее активны в этом ряду циклические амиды **5D** на основе 2-фенил-4-аминоиндола, **7D** на основе 5-метил-2-фенил-6-аминоиндола, **HD** на основе 2,3-диметил-7-аминоиндола, имеющие в своих молекулах одновременно закрепленные спиртовую и амидную функции. Из исследованных нециклических амидов наиболее высокую активность, сравнимую с соединениями **5D**, **7D**, **HD**, показывает

образец **S3** на основе 1,5-диметил-2-фенил-6-аминоиндола. По-видимому, для данного амида как и циклических имеет место более предпочтительное существование таутомерных форм **b**, **c**, **d** (особенно **b**) с гидроксильными группами наряду с амидокарбонильной структурой **a**. Об этом свидетельствует спектр ЯМР  $^1\text{H}$  в ДМСО- $d_6$ , где помимо сигнала протонов группы  $\text{CH}_2$  для формы **a**, имеет место синглет винильного протона  $=\text{CH}$  для таутомеров **b** или **c**. Кроме этого масс-спектральное поведение амида **S3** существенно отличается от схемы распада в условиях электронной ионизации других нециклических индолиламинов. И если для последних, основным направлением деструкции в условиях электронной ионизации является элиминирование от молекулярных ионов молекулы трифтордикетена (относительная интенсивность сигнала 100%), то для соединения **S3** молекулярный ион наряду с элиминированием молекулы трифтордикетена (относительная интенсивность сигнала 79%) отщепляет молекулу 1,1,1-трифторпропанона (относительная интенсивность сигнала 100%), что свидетельствует о деструкции молекулы в виде либо амидоенольной формы **b**, либо таутомерных форм **c,d**.



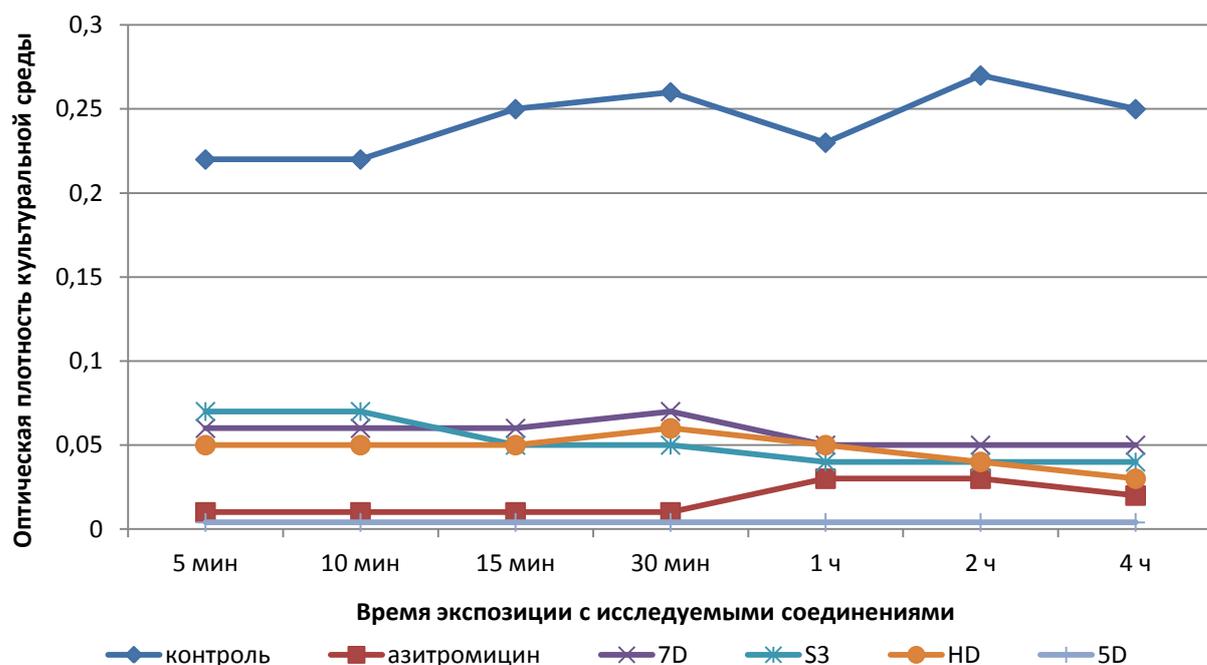
Соединения **5D**, **7D**, **HD**, **S3** сочетают высокую антимикробную активность, низкую токсичность. Эти соединения довольно доступны, можно синтезировать их по разработанным нами методикам с хорошими выходами и высокой степенью чистоты и без выраженных финансовых затрат.

Для научно-практического обоснования безопасного использования выявленной противомикробной активности соединений нового класса для повышения эффективности противомикробной химиотерапии мы остановились на следующих ключевых параметрах: определение типа противомикробного действия, изучение токсических эффектов исследуемых соединений на клетки прокариот и эукариотические клетки и изучение одного из возможных механизмов противомикробного действия, воздействие на ДНК микробной клетки.

***Определение типа противомикробного действия, изучение токсических эффектов на клетки прокариот и эукариотические клетки и изучение механизма противомикробного действия исследуемых соединений***

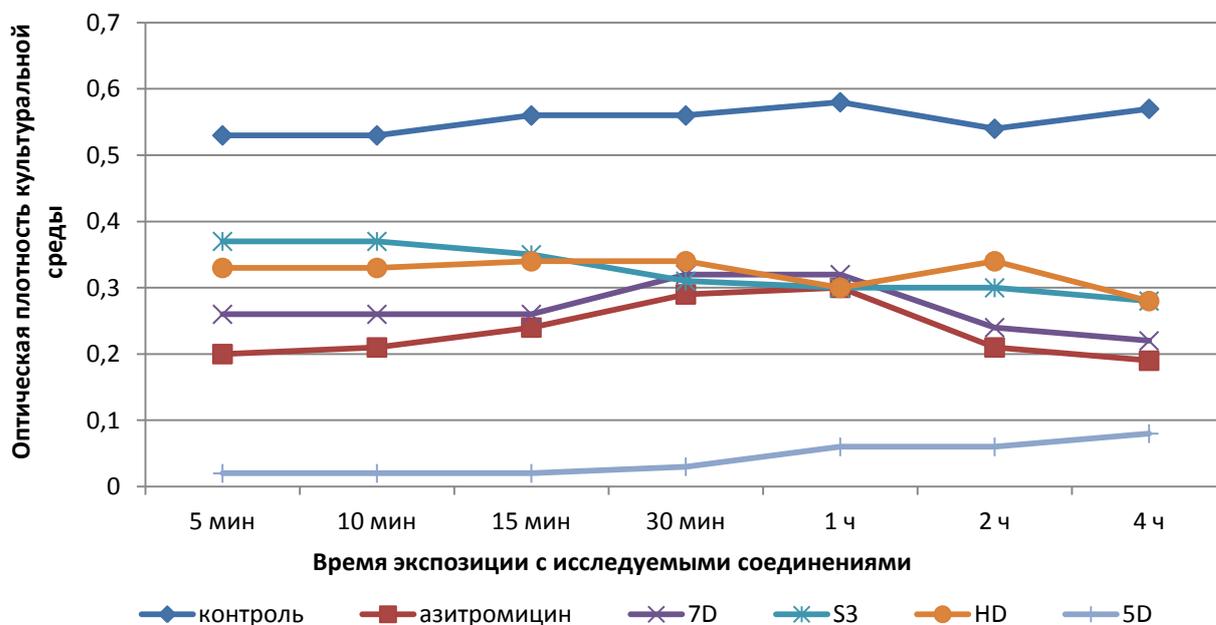
Для определения типа противомикробного действия использовали методику проведения опытов при воздействии исследуемых соединений в физиологическом растворе при комнатной температуре и коротких экспозициях. Циклический амид **5D**, из группы соединений, полученных на основе 4-амино-фенилиндола, амид **S3** и циклический амид **7D**, из группы соединений, полученных на основе замещенных 6-аминоиндолов и циклический амид **HD**, из группы соединений, полученных на основе замещенных 7-аминоиндолов, в течение 24 часов и более вызывали задержку роста и размножения тест-штамма *S.aureus ATCC 6538-P* (рисунок 2). Препарат сравнения азитромицин задерживал рост и размножение тест-штамма *S.aureus* в течение 3-суток. После 4-х суточного культивирования в присутствии МПК азитромицина наблюдалось появление видимого роста микробной популяции в проходящем свете. После культивирования в течение 48 часов все исследуемые соединения, кроме амида **S3**, продолжали подавлять рост исследуемого штамма микроорганизма. Видимый рост и соответствующее увеличение плотности культуральной среды через 48 ч наблюдалось в пробирках с соединением **S3** после экспозиций в течение 5 мин, 10 мин и 15 мин.

После 3-х суток видимый рост наблюдался во всех пробирках в присутствии циклического амида **HD** и амида **S3**. Через 96 часов культивирования в термостате при 37 °C наблюдался видимый рост микроорганизмов в присутствии соединения **7D**. Экспериментальное исследование в присутствии циклического амида **5D** сопровождалось отсутствием видимого роста *S.aureus ATCC 6538-P* в течение 5 суток культивирования, хотя наблюдался прирост микробной популяции по показателям оптической плотности среды. По показателям изменения значения D культуральной среды в присутствии всех исследуемых соединений, не зависимо от наличия или отсутствия видимого роста микробной популяции, наблюдалась устойчивая тенденция к задержке роста и размножения тест-штамма *S.aureus* в течение всего эксперимента (рисунок 3).



**Рисунок 2 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus* ATCC 6538-P после экспозиций с исследуемыми соединениями и культивировании в течение 24 часов**

Запоздалый рост микроорганизмов свидетельствует о способности соединений, полученных на основе 4-, 6- и 7-замещенных аминокислот задерживать рост и размножение микроорганизмов и оказывать в МПК бактериостатическое действие.



**Рисунок 3 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus* ATCC 6538-P после экспозиций с исследуемыми соединениями и культивировании в течение 110 часов**

Изучена цитотоксичность препаратов с лабораторными шифрами **5D**, **HD**, **S3** и **7D** *in vitro* на линии опухолевых клеток HeLa (ATCC ® CCL-2TM). МТТ-тест показал, что изучаемые соединения в исследуемом интервале концентраций (50-1000 мкг/мл) не обладают способностью оказывать токсическое воздействие на эукариотические клетки аденокарциномы шейки матки человека.

При исследовании соединений **7D**, **5D**, **S3** и **HD** в тесте Эймса установлено, что ни одно из соединений не вызывает превышение числа колоний, индуцированных His<sup>+</sup>-ревертантов, над спонтанным фоном мутирования (негативный контроль) более, чем в 2-2,5 раза, что свидетельствует об отсутствии мутагенной активности данных соединений в исследованном диапазоне концентраций и исключает токсическое воздействие на прокариотические клетки.

Действие большинства современных синтетических противомикробных препаратов связано либо с подавлением синтеза ДНК, либо с подавлением бактериального белкового синтеза на уровне трансляции или транскрипции. Изучение влияния новых соединений на структуру дезоксирибонуклеиновых кислот на примере бактериальной ДНК имеет большое значение не только для определения молекулярных механизмов антибактериальной активности соединений, но и для прогноза его возможной генотоксичности. Для выявления SOS-индуцирующей активности исследуемых соединений мы использовали тест-систему, в которой индукцию SOS оперонов в присутствии различных концентраций испытуемого вещества оценивали по абсолютному значению активности β-галактозидазы культуры тестерного штамма *E.coli* PQ37.

Исходя из доказанного бактериостатического типа действия в МПК исследуемых соединений, можно предположить, что воздействие на клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану микроорганизмов, что имеет следствием гибель микробной клетки, не является механизмом противомикробного действия группы изучаемых производных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов. Исследуемые соединения **7D**, **5D**, **S3** и **HD** демонстрировали дозозависимый SOS-индуцирующий эффект. Ранее показано, что при исследовании выше указанных соединений в тесте Эймса установлено, что ни одно из изученных соединений не обладает в данном диапазоне концентраций (от 10 до 1000 мкг/мл) ни прямым токсическим действием, ни мутагенной активностью по отношению к тестерному штамму *S.typhimurium* TA 100.

Таким образом, механизм действия исследуемых соединений включает воздействие на ДНК микробной клетки. В бактерицидных концентрациях соединения производные замещенных 4-, 6-, 7-аминоиндолов способны оказывать SOS-индуцирующее действие, в бактериостатических концентрациях, вышеуказанные соединения, возможно, имеют дополнительный механизм, не сопровождающийся воздействием на ДНК.

## ***Новый способ определения типа противомикробного действия новых соединений с антимикробной активностью***

В процессе исследования разработан новый способ определения типа противомикробного действия новых соединений с антимикробной активностью. Новый способ определения противомикробного действия (бактериостатическое или бактерицидное) основан на вычислении коэффициента оптической плотности культуральной среды в ходе культивирования микроорганизмов с противомикробными соединениями в жидкой питательной среде. Преимущества способа заключаются в быстром и качественном определении типа противомикробного действия биологически активных соединений, использование небольшого количества питательной среды при достаточно коротком временном интервале, составляющем 24 ч.

Новизна способа состоит в разработке опытным путем формулы расчета и определении показателей коэффициента оптической плотности культуральной среды, соотносящиеся с бактериостатическим типом действия и бактерицидным типом действия исследуемых соединений.

Способ определения типа противомикробного действия новых соединений, обладающих антимикробной активностью, включает проведение исследования оптической плотности культуральной жидкости в объеме 1 мл в стерильных кюветах при длине волны 600 нм, далее зависимость оптической плотности нового соединения со штаммом бактерий *Staphylococcus aureus 6538-P* обнуляется по показателям оптической плотности исследуемого соединения. Определяется оптическая плотность культуральной среды в присутствии штамма бактерий *Staphylococcus aureus 6538-P*, культивируемого при МПК в объеме 1 мл и при двух-, четырех- и шестикратном увеличении МПК исследуемого соединения. Определяется оптическая плотность культуральной среды с исследуемым микроорганизмом при культивировании без исследуемого соединения. На основе полученных показателей вычисляется коэффициент оптической плотности культуральной среды по формуле (1):

$$K_D = \frac{D_1 + D_2 + D_3 \dots + D_n}{n} \times 100, \quad (1)$$

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.

Показатель  $K_D$  с исследуемым соединением более 1 свидетельствует, что исследуемое соединение обладает бактериостатическим типом действия в отношении исследуемого

микроорганизма, если менее 1 – исследуемое соединение обладает бактерицидным типом действия в отношении исследуемого микроорганизма.

Для препаратов сравнения с доказанным бактерицидным и бактериостатическим действием был рассчитан показатель  $K_D$ .

Показатель  $K_D$  с ампициллином оказался менее 1 (формула 2), это свидетельствует о том, что противомикробный препарат обладает бактерицидным типом действия в отношении *Staphylococcus aureus* 6538-*P ATCC*.

$$K_D = \frac{0,003 + 0,0029 + 0,003 + 0,0028}{4} \times 100 = 0,293 \quad (2)$$

Показатель  $K_D$  с азитромицином более 1 (формула 3), следовательно, противомикробный препарат обладает бактериостатическим типом действия в отношении *Staphylococcus aureus* 6538-*P ATCC*.

$$K_D = \frac{0,018 + 0,014 + 0,010 + 0,007}{4} \times 100 = 1,23 \quad (3)$$

Показатель  $K_D$  с исследуемыми соединениями составлял более 1.

Например, показатель  $K_D$  с циклическим амидом **HD** в отношении *Staphylococcus aureus* 6538-*P ATCC* (формула 4).

$$K_D = \frac{0,030 + 0,019 + 0,011 + 0,005}{4} \times 100 = 1,625 \quad (4)$$

Показатель  $K_D$  с амидом **7D** в отношении *Staphylococcus aureus* 6538-*P ATCC* (формула 5).

$$K_D = \frac{0,060 + 0,030 + 0,012 + 0,004}{4} \times 100 = 2,65 \quad (5)$$

Это свидетельствует о том, что исследуемые соединения, синтезированные на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов обладают бактериостатическим типом противомикробного действия в отношении исследуемых микроорганизмов. С помощью нового способа определения типа противомикробного действия подтверждено бактериостатическое действие исследуемых соединений, изученное с помощью классической методики при воздействии исследуемых соединений в физиологическом растворе при комнатной температуре и коротких экспозициях.

***Исследование противомикробной активности исследуемых соединений на модели экспериментальной хирургической раневой инфекции, вызванной грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами в условиях *in vivo****

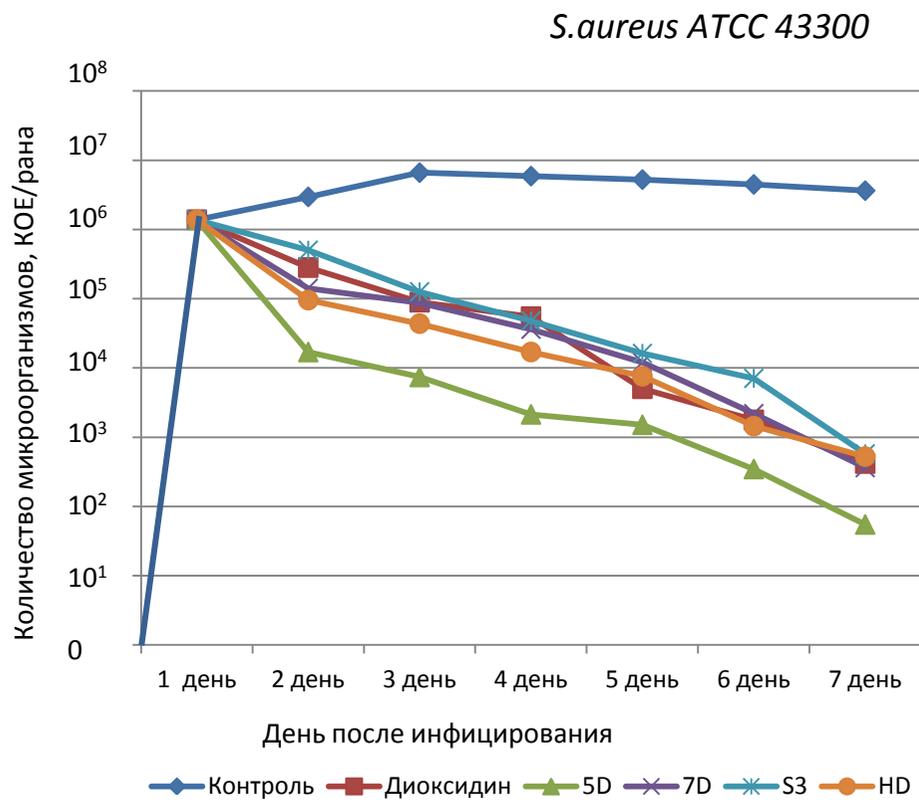
Исследования на модели экспериментальной хирургической раневой инфекции *in vivo* были проведены для оценки эффективности местного применения исследуемых соединений, с лабораторными шифрами **5D**, **7D**, **S3** и **HD**, против экспериментальной раневой инфекции у мышей, вызванной прямой инокуляцией *S.aureus* и соединений, с лабораторными шифрами **S3** и **HD**, против экспериментальной раневой инфекции у мышей, вызванной прямой инокуляцией *P.aeruginosa*, в поверхностные хирургические раны. Исследуемые микроорганизмы наиболее часто являются возбудителями раневых инфекций у человека. На этой модели исследуемые штаммы *S.aureus* и *P.aeruginosa* хорошо размножались в тканях кожи экспериментальных мышей и сохранялись в большом количестве в ранах в отсутствие эффективной терапии (таблицы 5, 6).

Местное лечение исследуемыми соединениями, растворенными в глицерине, приводило к сокращению числа жизнеспособных микроорганизмов в ранах значительно раньше, чем можно было бы ожидать при естественном заживлении необработанных ран, что приводило к элиминации бактерий из инфицированной ткани (рисунки 4, 5).

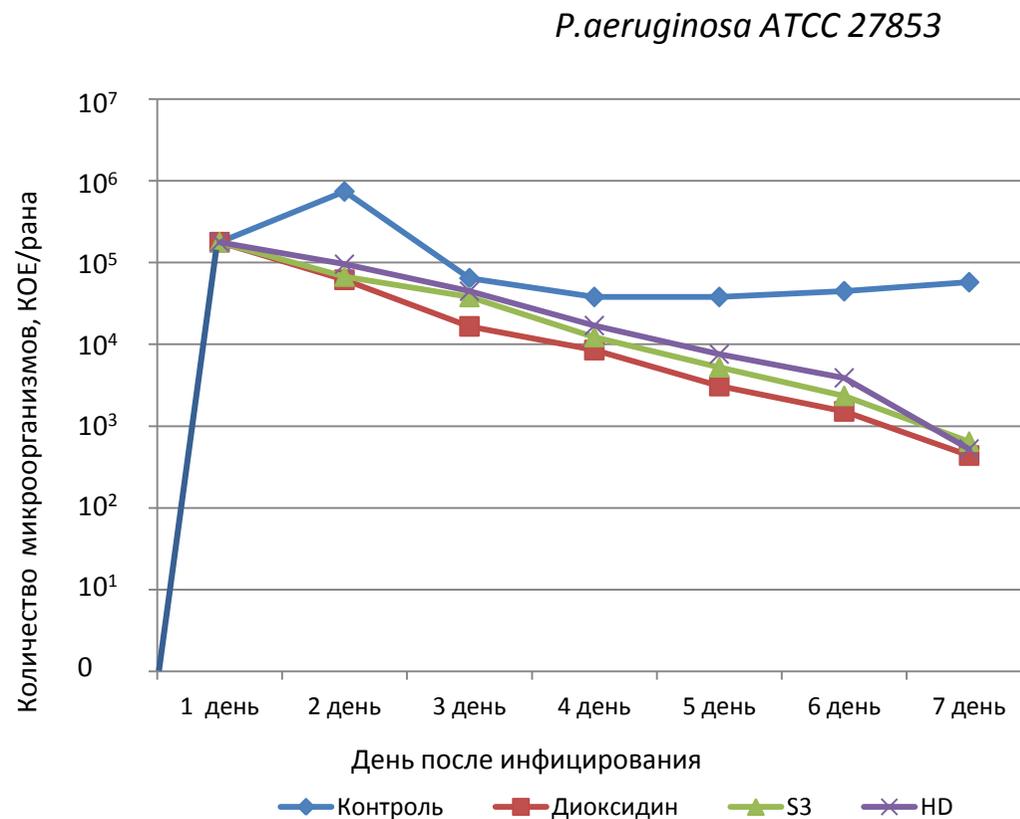
Исследуемые соединения эффективно препятствовали распространению микроорганизмов в подлежащие ткани и генерализации инфекционного процесса. Исследуемые соединения были столь же эффективны в устранении *S.aureus* и *P.aeruginosa* и ускоряли заживление зараженных ран, как и препарат сравнения диоксидин, хорошо зарекомендовавший себя, как средство для местного лечения кожных инфекций.

Эффективность изучаемых соединений в отношении экспериментальных микробных хирургических раневых инфекций, продемонстрированная в этом исследовании, свидетельствует о противомикробной активности при местном применении.

В целом, антибактериальные свойства исследуемых индолиламидов *in vitro* и *in vivo* поддерживают использование этих новых противомикробных соединений в качестве местных антибактериальных агентов.



**Рисунок 4 – Количественные показатели микроорганизмов в инфицированных ранах в процессе формирования экспериментальных хирургических ран, инфицированных *S.aureus* (метод поверхностных смывов)**



**Рисунок 5 – Количественные показатели микроорганизмов в инфицированных ранах в процессе формирования экспериментальных хирургических ран, инфицированных *P.aeruginosa* (метод поверхностных смывов)**

**Таблица 5 – Динамика показателей среднего микробного числа в ранах, инфицированных *S.aureus*, на фоне лечения исследуемыми соединениями (метод поверхностных смывов)**

| День после инфицирования | Среднее значение микробного числа в смывах с ран, Log КОЕ/рана(±m)* |           |                             |                |                            |                            |
|--------------------------|---|-----------|-----------------------------|----------------|----------------------------|----------------------------|
|                          | Контроль  | Диоксидин | Циклический амид <b>5 D</b> | Амид <b>S3</b> | Циклический амид <b>7D</b> | Циклический амид <b>HD</b> |
| 1                        | 2   | 3         | 4                           | 5              | 6                          | 7                          |
| 1                        | 7,15±1,4  | -         | -                           | -              | -                          | -                          |
| 2                        | 7,68±1,5  | 6,66±1,6  | 5,37±0,7                    | 6,19±1,3       | 6,85±0,8                   | 5,99±1,3                   |
| 3                        | 7,92±2,1  | 5,98±0,7  | 4,94±1,6                    | 5,98±2,0       | 6,03±2,2                   | 5,82±0,9                   |
| 4                        | 7,89±3,0  | 5,87±1,3  | 4,52±1,6                    | 5,75±0,9       | 5,83±1,4                   | 5,38±2,1                   |
| 5                        | 7,86±2,0  | 4,85±0,5  | 4,26±2,1                    | 4,93±1,5       | 5,32±2,4                   | 4,94±1,5                   |
| 6                        | 7,82±1,0  | 4,41±2,1  | 3,74±0,8                    | 4,54±0,5       | 4,93±0,9                   | 4,21±1,3                   |
| 7                        | 7,75±1,4  | 3,79±1,3  | 2,87±0,5                    | 3,75±1,3       | 3,88±0,5                   | 3,86±2,1                   |
| 10                       | 5,43±0,4  | -         | -                           | -              | -                          | -                          |
| 14                       | 2,93±2,4  | -         | -                           | -              | -                          | -                          |

\* – среднее отклонение.

**Таблица 6 – Динамика показателей среднего микробного числа в ранах, инфицированных *P.aeruginosa*, на фоне лечения исследуемыми соединениями (метод поверхностных смывов)**

| День после инфицирования | Среднее значение микробного числа в смывах с ран, Log КОЕ/рана(±m)* |           |                |                            |
|--------------------------|---|-----------|----------------|----------------------------|
|                          | Контроль  | Диоксидин | Амид <b>S3</b> | Циклический амид <b>HD</b> |
| 1                        | 6,4±1,4   | -         | -              | -                          |
| 2                        | 6,94±1,5  | 5,9±1,3   | 5,92±2,2       | 5,99±1,3                   |
| 3                        | 5,91±2,1  | 5,35±1,3  | 5,76±1,2       | 5,82±0,9                   |
| 4                        | 5,78±3,0  | 4,97±2,1  | 4,98±0,6       | 5,38±2,1                   |
| 5                        | 5,76±2,0  | 4,69±1,3  | 4,86±1,1       | 4,94±1,5                   |
| 6                        | 5,81±1,0  | 4,27±1,5  | 4,57±0,7       | 4,78±0,7                   |
| 7                        | 5,88±1,4  | 3,81±0,7  | 3,91±2,3       | 3,86±2,1                   |
| 10                       | 4,21±2,5  | -         | -              | -                          |
| 14                       | 3,82±1,0  | -         | -              | -                          |

\* – среднее отклонение.

## Выводы

1. Реализованы синтетические возможности использования в качестве исходных соединений 16 замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов и синтезирована серия из 32 индолиламидами, енаминов и пирролохинолонов, для 18 (соединения с лабораторными шифрами **17**, **6D**, **5D**, **39D**, **2D**, **3D**, **32D**, **64D**, **43D**, **235D**, **66D**, **243D**, **7D**, **S3**, **HD**, **1D**, **4D**, **ТФПХ**) из которых внеэкспериментальный прогноз наличия противомикробной активности в фармакологическом спектре составил более 50 % (*Pa* более 0,500 вне зависимости от вероятности и прогнозной степени токсичности).
2. Полученные новые соединения, на основе замещенного 2-фенил-4-аминоиндола (циклический амид с лабораторным шифром **5D**), замещенных 5-аминоиндолов (нециклические амиды с лабораторными шифрами **43D**, **66D**, **235D** и пирролохинолон **39D**), замещенных 6-аминоиндолов (нециклические амиды с лабораторным шифром **243D**, **S3** и циклический амид **7D**) и замещенных 7-аминоиндолов (циклический амид с лабораторным шифром **HD**, пирролохинолоны **1D** и **4D**), способны оказывать в диапазоне МПК 3,9-1500 мкг/мл неблагоприятное воздействие на рост и размножение прокариотических микроорганизмов.
3. Выявлены амиды и пирролохинолоны, полученные на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов (лабораторные шифры **5D**, **39D**, **S3**, **7D**, **HD**, **4D**), обладающие противомикробной активностью в диапазоне МПК 3,9-1000 мкг/мл и широким спектром антимикробного действия.
4. Наиболее активные амиды, полученные на основе замещенных 4-, 6- и 7-аминоиндолов (лабораторные шифры **5D**, **S3**, **7D**, **HD**) являются практически нетоксичными соединениям (класс токсичности III-IV) при различных путях введения в условиях *in vivo* (диапазон LD<sub>50</sub> 596-1753 мг/кг при внутрибрюшинном введении, 751-1994 мг/кг – при внутривенном, при накожном – более 5000 мг/кг).
5. Исследуемые соединения (лабораторные шифры **5D**, **S3**, **7D**, **HD**) в минимальных подавляющих концентрациях в диапазоне 20-100 мкг/мл оказывают бактериостатическое действие (показатель плотности культуральной среды (D): **5D** – 0,01-0,12; **S3** – 0,07-0,38; **7D** – 0,05-0,27; **HD** – 0,05-0,46 в течение 5-ти дней).
6. Разработанный и описанный в работе способ определения типа противомикробного действия, подтверждает бактериостатический тип действия исследуемых соединений (коэффициент плотности культуральной среды (K<sub>D</sub>): **5D** – 2,275; **S3** – 1,325; **7D** – 2,65; **HD** – 1, 625).
7. Соединения с потенциальной противомикробной активностью – производные 4-, 6-, 7-аминоиндолов (лабораторные шифры **5D**, **S3**, **7D**, **HD**) в диапазоне концентраций 50-1000

мкг/мл не оказывают токсического воздействия на клетки прокариот (индекс мутагенности <2) и эукариотические клетки (доля жизнеспособных клеток HeLa 70,4-112 %) *in vitro*.

8. Синтетические производные 4-, 6-, 7-аминоиндолов (лабораторные шифры **5D**, **7D**, **HD**) в диапазоне концентраций 500-1000 мкг/мл демонстрируют дозозависимый SOS-индуцирующий эффект *in vitro* (IF **5D** – 3,1; IF **7D** – 3,2; IF **HD** – 6,7).

9. Соединения с лабораторными шифрами **5D**, **S3**, **7D**, **HD** при орошении ран, инфицированных *S.aureus* и **S3**, **HD** – *P.aeruginosa*, раствором 10 мг/мл в глицерине 2 раза в сутки эффективно препятствуют распространению микроорганизмов в подлежащие ткани (*S.aureus* – 5,39-6,89 Log КОЕ/рана; *P.aeruginosa* – 5,98-5,99 Log КОЕ/рана к 2-му дню); генерализации инфекционного процесса (*S.aureus* в крови не обнаруживается, 30-40 % обнаружение в печени, почках, селезенке; *P.aeruginosa* в крови, печени, почках, селезенке не обнаруживается на 3-й день); ускоряют заживление инфицированных ран (*S.aureus* – 2,87-3,88 Log КОЕ/рана; *P.aeruginosa* – 3,86-3,91 Log КОЕ/рана на 7-й день) на модели экспериментальной хирургической раневой инфекции *in vivo*.

10. Противомикробная активность соединений, на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов, зависит от структуры молекул и характера заместителей в исследуемых индолиламидах и пирролохинолонах. Амиды, имеющие трифторметильный заместитель в амидной части молекулы, обладают противомикробным действием (**5D**, **HD**, **235D**, **43D**, **S3**, **7D**, **66D**, **243D**, **4D** – диапазон МПК<sub>90</sub> 62,5-250 мкг/мл). Наиболее активны циклические амиды, имеющие в своих молекулах одновременно закрепленные спиртовую и амидную функции (НО- или O=C-NH-) **5D**, **7D**, **HD** (диапазон МПК<sub>90</sub> 62,5-125 мкг/мл).

11. Активность нециклических амидов зависит от характера замещения в бензольном и пиррольном кольцах индольной системы, а также от места расположения амидной группировки. Соединение **S3**, в молекуле которого амид-енольная форма дополнительно стабилизирована фенильным заместителем, обладает наибольшей активностью среди нециклических амидов (**S3** – МПК<sub>90</sub> 62,5-125 мкг/мл; **243D**, **235D**, **43D**, **66D** – диапазон МПК<sub>90</sub> 125-250 мкг/мл; **2D**, **3D**, **32D**, **64D** – МПК ≤ 1000 мкг/мл).

### Практические рекомендации

1. Полученные новые соединения, на основе замещенного 2-фенил-4-аминоиндола (циклический амид с лабораторным шифром **5D**), замещенных 6-аминоиндолов (нециклический амид с лабораторным шифром **S3** и циклический амид **7D**) и замещенных 7-аминоиндолов (циклический амид с лабораторным шифром **HD**) рекомендуются в качестве

противомикробных средств для внедрения в клиническую практику, для лечения ран, инфицированных *S.aureus* и *P.aeruginosa*.

2. С целью быстрого и качественного определения типа противомикробного действия новых фармакологических веществ рекомендуется способ, основанный на вычислении коэффициента оптической плотности культуральной среды в ходе культивирования микроорганизмов с противомикробными соединениями в жидкой питательной среде (МХБ).

3. Рекомендуется дальнейший направленный синтез и поиск соединений с более высокой противомикробной активностью в рядах производных замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов.

4. Не рекомендуется использование антимикробной терапии без предварительного определения чувствительности микроорганизмов к противомикробным препаратам. Целесообразно проводить мониторинг и контроль устойчивости микроорганизмов в конкретном лечебном учреждении, регионе и использовать его результаты для адекватной антибактериальной терапии.

5. Новые соединения, на основе замещенного 2-фенил-4-аминоиндола (циклический амид с лабораторным шифром **5D**), замещенных 5-аминоиндолов (нециклические амиды с лабораторными шифрами **43D**, **66D**, **235D** и пирролохинолон **39D**), замещенных 6-аминоиндолов (нециклические амиды с лабораторным шифром **243D**, **S3** и циклический амид **7D**) и замещенных 7-аминоиндолов (циклический амид с лабораторным шифром **HD**, пирролохинолоны **1D** и **4D**) рекомендуются для использования в селективных питательных средах в качестве агентов отрицательной селекции, неблагоприятно влияющих на рост и размножение чувствительных микроорганизмов.

#### Список научных работ, опубликованных автором по теме диссертации

1. Yamashkin, S. A. Synthesis of functionally pyrrolo[3,2-h]quinolines from 2,3-dimethyl- and 1,2,3-trimethyl-7-aminoindoles / S. A. Yamashkin, G. A. Romanova, **I. S. Romanova (I. S. Stepanenko)**, M. A. Yurovskaya // Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 2003. – Vol. 39. – № 8. – P. 1048-1056.
2. Yamashkin, S. A. Synthesis of functionally substituted pyrrolo[2,3-g]- and pyrrolo[3,2-f]quinolines from 5-amino-2-phenyl- and 5-amino-1-methyl-2-phenylindoles / S. A. Yamashkin, G. A. Romanova, **I. S. Romanova (I. S. Stepanenko)**, M. A. Yurovskaya // Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 2003. – Vol. 39. – № 9. – P. 1188-1196.
3. Yamashkin, S. A. Synthesis of functionally pyrrolo[3,2-q]quinolines from 6-amino-7-methoxy-1,2,3-trimethylindole / S. A. Yamashkin, E. A. Oreshkina, **I. S. Romanova (I. S. Stepanenko)**, M. A. Yurovskaya // Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 2005. – Vol. 41. – №10. – P.1280-1289.

4. Ямашкин, С. А. Влияние фторсодержащих антибиотиков на рост и развитие микроскопических грибов / С. А. Ямашкин, Д. А. Кадималиев, **И. С. Романова (И. С. Степаненко)**, О. С. Надеждина, М. А. Большаков, Н. Б. Бычкова // *Материалы международной конференции «Проблемы биодеструкции техногенных загрязнителей окружающей среды»*. – Саратов: Изд-во Научная книга. – 2005. – С. 59-60.
5. Ямашкин С. А. Синтез пирроло [3,2-f]хинолинов из замещенных 5-аминоиндолов и щавелевоуксусной килоты / С. А. Ямашкин, Н. В. Жукова, **И. С. Романова (И. С. Степаненко)** // *Материалы Международной конференции по химии гетероциклических соединений посвященной 90-летию со дня рождения А. Н. Коста*. – Москва. – 2005. – С. 375.
6. Ямашкин С. А. Синтез пирролохинолинов из 2,3-диметил-, 1,2,3-триметил-6-аминоиндолов и 4,4,4-трифторацето-уксусногэфира / С. А. Ямашкин, Е. А. Орешкина, **И. С. Романова (И. С. Степаненко)** // *Материалы Международной конференции по химии гетероциклических соединений посвященной 90-летию со дня рождения А. Н. Коста*. – Москва. – 2005. – С. 376.
7. Yamashkin, S. A. The potential use of 6-amino-5-methoxy(methyl)-2,3-dimethyl- and methoxy(methyl)-1,2,3-trimethyl-indoles in synthesis of pyrrolo[2,3-f]quinolines / S. A. Yamashkin, **I. S. Romanova (I. S. Stepanenko)**, E. A. Oreshkina, M. A. Yurovskaya // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. – 2006. – Vol. 42. – № 1. – P. 86-91.
8. Ямашкин, С. А. Синтез новых аналогов кофермента из 6-аминоиндолов и щавелевоуксусного эфира / С. А. Ямашкин, Н. В. Жукова, **И. С. Романова (И. С. Степаненко)** // «Наука и инновации в Республике Мордовия», V республиканская научно-практическая конференция [материалы], 8-9 февраля 2006 г. / редкол. : В. А. Нечаев и др. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та. – 2006. – С. 648-652.
9. Кадималиев Д. А. Изучение влияния новых соединений пирролохинолинового ряда на рост и развитие гриба *Lentinus tigrinus* // Д. А. Кадималиев, С. А. Ямашкин, **И. С. Степаненко**, О. С. Надеждина, М. А. Большаков, Н. Б. Бычкова // «Наука и инновации в Республике Мордовия», V республиканская научно-практическая конференция [материалы], 8-9 февраля 2006 г. / редкол. : В.А.Нечаев и др. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та. – 2006. – С. 700-702.
10. Yamashkin, S. A. Synthesis of pyrroloquinolines from substituted 6-aminoindoles and oxaloacetic ester / S. A. Yamashkin, N. V. Zhukova, **I. S. Romanova (I. S. Stepanenko)** // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. – 2008. – Vol. 44. – № 7. – P. 793-801.
11. Акулина, И. В. Возможности коррекции 2-(1'-гидрокси-4'-изопропенил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаной кислотой оксидативного стресса, возникшего у крыс на фоне хронического пролиферативного воспаления / И. В. Акулина, Л. Е. Никитина, Р. С. Гараев, Н. П. Артемова, **И. С. Степаненко** // *Современные проблемы науки и образования*. – 2011. – № 5. – С. 13. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=4848>.
12. Акулина, И. В. К вопросу о механизме противовоспалительного действия 2-(1'-гидрокси-4'-изопропенил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтаной кислоты / И. В. Акулина, Л. Е. Никитина, Л. Ю. Дорофеева, Р. С. Гараев, Н. А. Липатова, **И. С. Степаненко** // *Наука и бизнес: пути развития*. – 2011. – № 6. – С. 12-15.

13. Akulina, I. V. Estimation of influence of 2-(1'-hydroxy-4'-isopropenyl-1'-methylcyclohexyl-2'-thio)-methylethanoate on lipid peroxidation and antioxidant system of animals in chronic proliferative inflammation / I. V. Akulina, L. E. Nikitina, N. P. Artemova, **I. S. Stepanenko**, L. Yu. Dorofeeva // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2011. – № 10-2. – С. 5
14. **Степаненко, И. С.** Исследование механизма противовоспалительного действия тиотерпеноида ментанового ряда / И. С. Степаненко, И. В. Акулина // **Аспирантский вестник Поволжья.** – 2012. – № 5-6. – С. 84-87.
15. **Степаненко, И. С.** Исследование пула стафилококков в микробиоме зева студентов 3 курса Медицинского института ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н. П. Огарева» и определение их антибиотикочувствительности / И. С. Степаненко, Т. В. Грабова, В. Н. Каргаев, И. В. Румянцева, Т. А. Еськина // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2013. – Т. 15. – № 2. – Приложение 1. – С. 41.
16. Акулина, И. В. Тиотерпеноид ментанового ряда в регуляции окислительного статуса при НПВП-гастропатии / И. В. Акулина, **И. С. Степаненко** // **Фармация.** – 2013. – № 1. – С 45-48.
17. **Степаненко, И. С.** Изучение противомикробной активности фторзамещенных пирролохинолинов / И. С. Степаненко, А. И. Котькин, С. А. Ямашкин // **Фундаментальные исследования.** – 2013. – № 8. – Ч. 6. – С. 1406-1410.
18. Котькин А. И. Изучение антимикробной активности некоторых фторзамещенных пирролохинолинов / А. И. Котькин, **И. С. Степаненко** // Путь в науку. Биология, экология, химия: Материалы Международной молодежной научно-практической конференции. – Ярославль. – 22-26 апреля 2013. – С. 28-29.
19. **Степаненко, И. С.** Биологическая активность 6-гидрокси-2,3-диметил-6-трифторметил-6,7,8,9-тетрагидро-1Н-пирроло[3,2-*h*]хинолина-8-она / И. С. Степаненко, А. И. Котькин, С. А. Ямашкин // Наука и образование в XXI веке: сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции. – Тамбов. – 30 сентября 2013. – М-во обр. и науки РФ. Изд-во : ТРОО «Бизнес-Наука-Общество» – Часть 7. – С. 140-141.
20. **Степаненко, И. С.** Культуральные свойства клинически значимых микроорганизмов (учебное пособие) / И. С. Степаненко, Г. Н. Холодок, И. П. Кольцов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – № 3-2. – С. 165-166
21. Кадималиев, Д. А. Влияние различно-замещенных пирролохинолинов на физиологобиохимические характеристики лигнолитического гриба *Lentinus tigrinus* / Д. А. Кадималиев, **И. С. Степаненко**, С. А. Ямашкин, О. С. Надеждина // **Микология и фитопатология.** – 2014. – Вып. 5. – Т. 48. – С. 309-314.
22. **Степаненко, И. С.** Антимикробная активность (+)-лимонена и его производного (+)-1,2-оксида лимонена / И. С. Степаненко, С. В. Сяткин, И. В. Акулина, Л. Е. Никитина, Р. С. Гараев // **Вестник Чувашского университета.** – 2014. – № 2. – С. 368-374.

23. Степаненко, И. С. Исследование противотуберкулезной активности 6-гидрокси-2,3-диметил-6-трифторметил-6,7,8,9-тетрагидро-1Н-пирроло[3,2-*h*]хинолина-8-она / И. С. Степаненко, А. И. Котькин, С. А. Ямашкин, М. В. Бородулина, Е. Л. Лямина, Н. А. Рогожина // **Современные проблемы науки и образования**. – 2014. – № 6. – С. 1378-1381 (Электронный журнал) URL: [www.science-education.ru/120-15881](http://www.science-education.ru/120-15881).
24. Степаненко, И. С. Изучение микробиома зева студентов медицинского института и определение антибиотикочувствительности выделенных штаммов гемолитических стафилококков / И. С. Степаненко, Т. В. Грабова, А. И. Котькин // **Фундаментальные исследования**. – 2014. – № 3. – Ч. 4. – С. 601-605.
25. Котькин А. И. Противомикробная активность азотистых гетероциклов / А. И. Котькин, **И. С. Степаненко**, С. А. Ямашкин // XLIII Огаревские чтения : материалы науч. конф. : в 3 ч. / отв. за вып. П. В. Сенин. – Саранск : Изд-во Мордов. ун-та, 2015. – С. 6-9.
26. Степаненко, И. С. Антимикробная активность азотсодержащих гетероциклов / И. С. Степаненко, А. И. Котькин, С. Е. Чванов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – Т. 17. – № 2. – Приложение 1. – С. 44-45.
27. Степаненко, И. С. Исследование противотуберкулезной активности 6-гидрокси-2,3-диметил-6-трифторметил-6,7,8,9-тетрагидро-1Н-пирроло[3,2-*h*]хинолина-8-она / И. С. Степаненко, А. И. Котькин, С. А. Ямашкин, М. В. Бородулина, Е. Л. Лямина, Н. А. Рогожина // **Медицинский альянс**. – 2015. – № 1. – С. 120-121.
28. Степаненко, И. С. Определение антибиотикочувствительности выделенных штаммов гемолитических стафилококков микробиома зева студентов Медицинского института / И. С. Степаненко, Ю. А. Костина // **Фундаментальные исследования**. – 2015. – № 7-3. – С. 489-492.
29. Степаненко, И. С. Пирролохинолины: перспективный класс соединений с противомикробной активностью / И. С. Степаненко, С. А. Ямашкин, А. И. Котькин // Проблемы медицинской микологии. – 2015. – Т. 17. – № 2. – С. 135-136.
30. Степаненко, И. С. Противомикробная активность производных 6-амино-5-метил-2-фенил- и 6-амино-1,5-диметил-2-фенилиндолов / И. С. Степаненко, А. И. Котькин, Е. А. Алямкина, С. А. Ямашкин // **Современные проблемы науки и образования**. – 2015. – № 5. – С. 152-160 (Электронный журнал) URL: [www.science-education.ru/128-22043](http://www.science-education.ru/128-22043).
31. Ямашкин, С. А. О возможности использования 3-незамещенных 6-аминоиндолов в синтезе пирролохинолинов / С. А. Ямашкин, **И. С. Степаненко**, А. И. Котькин // Book of abstracts International Congress on Heterocyclic Chemistry «KOST-2015» dedicated to 100 years anniversary of professor Alexei Kost. – Moscow, Russian Federation. – Lomonosov Moscow State University. – October 18-23, 2015. – P. 539.
32. Ямашкин, С. А. О возможности синтеза потенциально биологически активных азотсодержащих гетероциклов из 4-амино-2-фенилиндола / С. А. Ямашкин, Е. А. Алямкина, **И. С. Степаненко** // Book of abstracts International Congress on Heterocyclic Chemistry «KOST-

- 2015» dedicated to 100 years anniversary of professor Alexei Kost. – Moscow, Russian Federation. – Lomonosov Moscow State University. – October 18-23, 2015. – P. 540.
33. **Степаненко, И. С.** Противомикробная активность 2-(1'-гидрокси-4'-изопренил-1'-метилциклогексил-2'-тио)-метилэтанойата (терпенсульфида) / И. С. Степаненко, Ю. А. Костина, И. В. Акулина, Л. Е. Никитина, С. А. Ямашкин, А. И. Котькин // **Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке.** – 2016. – Т. 18. – № 2. – С.598-602.
34. Ямашкин, С. А. Использование результатов масс-спектрометрии при доказательстве строения продуктов первичной реакции аминокислот с  $\beta$ -кетоефирами / С. А. Ямашкин, **И. С. Степаненко**, А. И. Котькин // **Успехи современного естествознания.** – 2016. – № 2. – С. 76-79.
35. Котькин, А. И. Анализ масс-спектрометрического распада индолиленаминокетоефиров и индолиламинов / А. И. Котькин, **И. С. Степаненко**, С. А. Ямашкин // В книге: Успехи синтеза и комплексообразования тезисы докладов I Всероссийской молодежной школы-конференции. Российский университет дружбы народов. – 2016. – С.131.
36. **Степаненко, И. С.** Противотуберкулезная активность некоторых производных аминокислоты и пирролохинолинов / И. С. Степаненко, С. А. Ямашкин, А. И. Котькин, Ю. А. Костина, М. И. Бородулина // Проблемы медицинской микологии. – 2016. – Т. 18. – № 2. – С. 116.
37. **Степаненко, И. С.** Биологическая активность и анализ масс-спектрального распада трифторметилпирролохинолинов / И. С. Степаненко, С. А. Ямашкин, А. И. Котькин // **Успехи современного естествознания.** – 2016. – № 8. – С. 55-60.
38. Алямкина, Е. А. Соединения с потенциальной антимикробной активностью на основе 4-амино-2-фенилиндолы / Е. А. Алямкина, **И. С. Степаненко**, С. А. Ямашкин, М. А. Юровская // **Вестник Московского университета.** – 2016. – Т. 57. – № 6. – С. 410-417.
39. **Степаненко, И. С.** Изучение цитотоксичности производных аминокислоты и пирролохинолинов *in vitro* / И. С. Степаненко, С. А. Ямашкин, И. В. Акулина, А. И. Котькин, Ю. А. Костина // **Успехи современного естествознания.** – 2016. – № 11-2. – С. 271-275.
40. Alyamkina, E. A. 4-amino-2-phenylindole-based compounds with potential antibacterial activity // E. A. Alyamkina, S. A. Yamashkin, **I. S. Stepanenko**, M. A. Yurovskaya // **Moscow University Chemistry Bulletin.** – 2017. – Vol. 72. – №1. – P. 24-28.
41. **Степаненко, И. С.** Исследование чувствительности *Streptococcus pyogenes*, выделенных из зева, к традиционным антибиотикам / И. С. Степаненко, Ю. А. Костина, А. А. Батаршева, Е. Д. Сладников // Международный научно-исследовательский журнал. – 2017. - № 6-2 (60). – С.31-35.
42. **Степаненко И. С.** Противомикробная активность соединений на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминокислот / И. С. Степаненко, С. А. Ямашкин, Ю. А. Костина, А. А. Батаршева, Е. Д. Сладников // Проблемы медицинской микологии. – 2018. – Т. 20. – № 2. – 117.
43. Батаршева А. А. Выделение *Staphylococcus species* со слизистой носа и исследование антибиотикочувствительности выделенных штаммов / А. А. Батаршева, Ю. А. Костина, Е. Д.

- Сластников, **И. С. Степаненко** // Огарев-online [Электронный ресурс]. – 2018. – № 4. – С. 1-7.
44. **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. Batarshcheva, M. A. Mironov // **Research Results in Pharmacology**. – 2018. – Vol. 4. – Issue 3. – P. 17-26.
45. **Stepanenko, I. S.** A new method for determining the type of antimicrobial effect of compounds with antimicrobial activity / I. S. Stepanenko // *EurAsian Journal of BioScience*. – 2018. – Vol. 12. – P. 519-525.
46. Ямашкин, С. А. Химические превращения производных замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов / С. А. Ямашкин, **И. С. Степаненко**, А. И. Котькин // Научный альманах. – 2018. – № 5-2(43). – С. 152-161.

### Список сокращений

MRSA – метициллинрезистентный *Staphylococcus aureus*

АТСС – Американская коллекция типовых культур

ДДМ – диско-диффузионный метод

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

КОЕ – колониеобразующая единица

ИК – инфракрасная спектроскопия

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МПК – минимальная подавляющая концентрация

МХА – Мюллер-Хинтон агар

МХБ – Мюллер-Хинтон бульон

УФ – ультрафиолетовая электронная спектроскопия

ФЭК – фотоэлектроколориметр

ЯМР – спектроскопия ядерного магнитного резонанса

*Автор выражает глубокую и искреннюю благодарность:*

**ЯМАШКИНУ СЕМЕНУ АЛЕКСАНДРОВИЧУ** – доктору химических наук, профессору кафедры химии, технологии и методик обучения ФГБОУ ВО «МГПИ им. М. Е. Евсевьева»;

**КАРГАЕВУ ВЛАДИМИРУ НИКОЛАЕВИЧУ** – директору ГКУ «ТФОМС Республики Мордовия»;

**ЧВАНОВУ СЕРГЕЮ ЕВГЕНЬЕВИЧУ** – главному врачу ГБУЗ РМ «РИКБ»;

**РУМЯНЦЕВОЙ ИРИНЕ ВАЛЕНТИНОВНЕ** – заведующему лабораторией клинической микробиологии ГБУЗ РМ «РИКБ»;

**ЕСЬКИНОЙ ТАТЬЯНЕ АНДРЕЕВНЕ** – фельдшеру-лаборанту лаборатории клинической микробиологии ГБУЗ РМ «РИКБ»;

**БОРОДУЛИНОЙ МАРГАРИТЕ ИВАНОВНЕ** – заведующему бактериологической лабораторией ГКУЗ РМ «РПД»;

**ДЗЮБЕ АЛЕКСАНДРУ ИВАНОВИЧУ** – главному врачу ГКУЗ РМ «РПД»;

**ИЛЬИНСКОЙ ОЛЬГЕ НИКОЛАЕВНЕ** – доктору биологических наук, профессору, заведующему кафедрой микробиологии ФГАОУ ВО «КФУ»;

**КАРАМОВОЙ НАЗИРЕ СУНАГАТОВНЕ** – кандидату биологических наук, доценту кафедры микробиологии ФГАОУ ВО «КФУ»;

**АКУЛИНОЙ ИРИНЕ ВЛАДИМИРОВНЕ** – кандидату медицинских наук, доценту кафедры фармакологии, клинической фармакологии и биохимии ФГБОУ ВО «ЧГУ им. И. Н. Ульянова»

**ПАВЛОВОЙ СВЕТЛАНЕ ИВАНОВНЕ** – доктору медицинских наук, заведующему кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и биохимии ФГБОУ ВО «ЧГУ им. И. Н. Ульянова»;

**ЮРОВСКОЙ МАРИНЕ АБРАМОВНЕ** – доктору химических наук, профессору, ведущему научному сотруднику лаборатории биологически активных органических соединений (БАОС) химического факультета ФГБОУ ВО «МГУ им. М. В. Ломоносова»;

**БЛИНОВУ ДМИТРИЮ СЕРГЕЕВИЧУ** – доктору медицинских наук, профессору, главному научному сотруднику АО «ВНЦ БАВ».