

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАУЧНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н. П. ОГАРЕВА»**

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)

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
Блинова Е. В. д.м.н., доцент

Саранск, 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. Природные, химически модифицированные, синтетические противомикробные и противогрибковые препараты на основе различных классов соединений и проблемы, возникающие в процессе их применения в качестве антисептиков, дезинфектантов, консервантов и химиотерапевтических средств (обзор литературы)	20
1.1. Природные, химически модифицированные, синтетические противомикробные и противогрибковые препараты на основе различных классов соединений, применяемые для устранения микроорганизмов вне организма человека, в окружающей среде (дезинфектанты и консерванты)	22
1.2. Природные, химически модифицированные, синтетические противомикробные и противогрибковые химиотерапевтические препараты на основе различных классов соединений, используемые для устранения микроорганизмов на поверхностях и в организме человека.....	53
1.3. Механизмы развития резистентности к противомикробным агентам	62
ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования	73
2.1. Методика химического эксперимента	73
2.1.1. Синтез аминокислот и их характеристика	73
2.1.2. Синтез индоламинов, енаминов, пирролохинолонов	74
2.1.3. Названия (№-лабораторный шифр) и структура исследуемых соединений	81
2.1.4. Препараты сравнения и растворитель	86

2.1.5. Характеристика микроорганизмов, используемых в работе	88
2.1.6. Характеристика питательных сред, используемых в работе	99
2.1.7. Характеристика экспериментальных животных ..	106
2.2. Основные этапы проведения тестирования чувствительности микроорганизмов к исследуемым соединениям	108
2.3. Определение чувствительности микобактерий к исследуемым соединениям	113
2.4. Изучение острой токсичности исследуемых соединений	114
2.5. Определение типа противомикробного действия исследуемых соединений	116
2.6. Определение цитотоксичности исследуемых соединений <i>in vitro</i>	117
2.7. Изучение генотоксичности исследуемых соединений <i>in vitro</i>	119
2.7.1. Тест на токсичность по отношению к <i>Salmonella typhimurium</i>	120
2.7.1. Полуколичественный метод учета генных мутаций (тест Эймса)	121
2.7.1. Полуколичественный метод учета генных мутаций (тест Эймса)	124
2.8. SOS-хромотест	125
2.8.1. Определение активности щелочной фосфатазы ...	126
2.8.2. Определение активности β -галактозидазы	127
2.9. Модель экспериментальной хирургической раневой инфекции <i>in vivo</i>	127
2.9. Модель экспериментальной хирургической раневой инфекции <i>in vivo</i>	130
3.0. Статистическая обработка полученных результатов	131
ГЛАВА 3. Синтез и биологическая активность соединений на основе 4-амино-2-фенилиндола	131

ГЛАВА 4. Синтез и биологическая активность соединений на основе 5-аминоиндолов	150
ГЛАВА 5. Синтез и биологическая активность соединений на основе замещенных 6-аминоиндолов	190
ГЛАВА 6. Синтез и биологическая активность соединений на основе 7-амино-2,3-диметил-1,2,3-триметилиндолов	218
ГЛАВА 7. Тип противомикробного действия соединений на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов	241
ГЛАВА 8. Новый способ определения типа противомикробного действия соединений, обладающих антимикробной активностью	266
ГЛАВА 9. Влияние исследуемых соединений на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов на ДНК прокариотической клетки	280
ГЛАВА 10. Исследование токсических эффектов соединений на основе замещенных 4-, 6-, 7-аминоиндолов на эукариотические клетки и прокариотические клетки <i>in vitro</i>	290
10.1. Цитотоксичность исследуемых соединений <i>in vitro</i>	290
10.2. Исследование генотоксических эффектов исследуемых соединений <i>in vitro</i>	290
ГЛАВА 11. Противомикробная активность исследуемых соединений <i>in vivo</i> на модели экспериментальной хирургической раневой инфекции	299
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	323
ИТОГИ ВЫПОЛНЕНИЯ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ	357
ВЫВОДЫ	361
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	364
ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО РАЗВИТИЯ ТЕМЫ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	366
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ ...	368
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	370

ВВЕДЕНИЕ

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 [519; 397; 229; 530; 48; 374]. 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 действии, бактериостатическом – подавляющем рост и размножение микроорганизмов действии, мутагенном – изменяющем наследственные свойства микробной клетки [53; 106; 514]. 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 веществ, которые обладают способностью подавлять рост и размножение или вызывать гибель прокариот (антисептики, дезинфектанты, консерванты и антибиотики) [324; 154; 24; 514].

Химические абиотические факторы внешней среды широко используются для подавления роста и размножения и уничтожения патогенных микроорганизмов [523; 392; 514].

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 [53; 86; 73; 106; 229; 392].

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 [47; 36; 33; 44; 48]. 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.) [406; 458; 49; 160; 135; 136; 387; 109]. Ежегодно от инфекционной патологии в мире погибают около двадцати миллионов человек. Ежегодная заболеваемость инфекционными заболеваниями исчисляется сотнями миллионов случаев. В конечном итоге, актуальность проблемы создания новых противомикробных средств определяют колоссальная адаптационная способность микроорганизмов, огромное количество биологических форм патогенов, постоянное возникновение форм с множественной резистентностью, появлением новых видов микроорганизмов и связанные с этим сложности терапии и профилактики инфекционных заболеваний. В то же время, перспективы разработки и внедрения новых антимикробных средств выглядят, прямо сказать, удручающе [133; 472].

Степень разработанности проблемы

При проведении микробиологического мониторинга в течение последних пяти лет отмечается тенденция к увеличению доли полирезистентных штаммов, это метициллинрезистентные *S.aureus*, *P.aeruginosa*, представители семейства

Enterobacteriaceae устойчивые к трем и более традиционно применяемым антибиотикам [340; 50; 49; 519; 160; 135; 136; 399; 109].

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 [350; 207].

В современных условиях, исследования, которые базируются на одном из фундаментальных принципов преодоления резистентности микроорганизмов – поиск новых соединений с антимикробной активностью и, может быть, с иным механизмом действия – несомненно, вызывают интерес [52; 103].

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. Аминоиндолы традиционно занимают особое место в химии индола. Индольный компонент является частым представителем живых систем, его содержат, например, молекулы незаменимой белковой аминокислоты триптофана и биогенного амина серотонина. Соединения с аминогруппой в бензольной части молекулы, как любые ароматические амины, могут давать различного рода производные с участием аминогруппы, это представляет особый интерес для синтеза новых соединений с биологической активностью [169; 171; 526; 527; 185].

В работе проводились исследования по изучению взаимодействия β -диоксосоединений с замещенными аминокислотами с различным положением аминогруппы 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. Изучаемые соединения входят в структуру некоторых алкалоидов и коферментов бактериальных и животных дегидрогеназ, примером являются алкалоид «Вомипирин» и «Метоксантин» – кофермент PQQ. Выявлено влияние новой группы соединений на физиологические характеристики микроскопических грибов [169; 171; 526; 527; 185; 41]. Производные пирролохинолинов уже используются для уничтожения клинически латентных микроорганизмов [194].

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 индолиламидов и пирролохинолонов для повышения эффективности противомикробной химиотерапии.

Задачи исследования

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

1. Синтезировать серию индолиламидов и пирролохинолонов на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов.
2. Исследовать способность полученных химических соединений оказывать противомикробное действие на рост прокариотических микроорганизмов.
2. 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.
3. Изучить токсические эффекты новой группы соединений, производных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов при воздействии на клетки прокариот и эукариотические клетки *in vitro*.
4. Исследовать возможность воздействия на генетический материал клеток прокариот синтетических производных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов *in vitro*.
5. Определить острую токсичность потенциальных противомикробных соединений, производных 4-, 6-, 7-аминоиндолов при различных путях введения в условиях *in vivo*.
6. Исследовать чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к потенциальным противомикробным соединениям, производным 4-, 6-, 7-аминоиндолов в условиях экспериментальной инфекции *in vivo*.
7. Установить ведущие закономерности зависимости противомикробной активности от структуры молекулы и характера заместителей в исследуемых индолиламидах и пирролохинолонах.

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 индолиламида и пирролохинолоны, доказана перспективность целенаправленного синтеза биологически активных соединений на основе ароматических аминов индольного ряда. В результате исследования реакций 4-амино-2-фенилиндола с β -кетоефирами (этиловым эфиром ацетоксусной кислоты, этиловым эфиром трифторацетоксусной 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-трифторацетоксусным эфиром в термических условиях шли преимущественно с участием сложноэфирной группы кетоефира. 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-трифторацетоксусным эфиром в бензоле со следами соляной кислоты приводила к образованию соответствующих амидов, то есть превращение реализовывалось за счет этоксикарбонильной группы кетоефира. При этом в зависимости от природы заместителя у пиррольного атома азота шло образование нециклических амидов (соединения с лабораторным шифром 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 НО- 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 индолиламинов 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».

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, генной 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).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Синтезированная серия индоламинов 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 диссертации

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 ^1H), 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.

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.

ГЛАВА 1. ПРИРОДНЫЕ, ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ, СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ И ПРОТИВОГРИБКОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ СОЕДИНЕНИЙ И ПРОБЛЕМЫ, ВОЗНИКАЮЩИЕ В ПРОЦЕССЕ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ АНТИСЕПТИКОВ, ДЕЗИНФЕКТАНТОВ, КОНСЕРВАНТОВ И ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ (обзор литературы)

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. Инфекция – это вторжение в организм хозяина вредоносных микроорганизмов (микробные патогены), которые затем размножаются в тесной взаимосвязи с тканями хозяина. Инфекции могут различаться по степени тяжести и могут варьироваться от латентных до молниеносных [114; 113; 397; 229; 530; 138].

В течение долгого времени происходило непрерывное сражение между людьми и множеством микробных патогенов. Противомикробные препараты относятся к числу немногих, которые вылечивают путем устранения патогенных микроорганизмов. Разработка противомикробных препаратов для клинического применения была самой успешной в медицине [16]. Противомикробные препараты активны в отношении важных компонентов основных областей микробного обмена, а именно, синтеза клеточной стенки, синтеза белка, синтеза рибонуклеиновой кислоты (РНК), синтеза дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и промежуточного метаболизма [115; 324; 314].

Успешное использование противомикробных средств для ингибирования и ликвидации инфекционных организмов сталкивается с определенными трудностями, поскольку микробные патогены развивают различные формы резистентности к лекарственным средствам. Использование антимикробных препаратов расширяется и, соответственно, увеличивается уровень и сложность

резистентности. Возникновение резистентности к нескольким противомикробным агентам в микробных патогенах стало ведущей проблемой общественного здравоохранения, поскольку существенно снижается количество доступных, а иногда и нет эффективных противомикробных средств, для лечения инфекций, вызванных этими патогенами. Микробные патогены могут проявлять устойчивость к противомикробным агентам с помощью различных механизмов, таких как возникновение мутаций, селекция или получение резистентных генов от других микробиологических патогенов. Пациенты, инфицированные резистентными патогенами, часто страдают от неэффективного лечения, которое обычно имеет неблагоприятный исход, особенно в случае инфекционных процессов с тяжелым течением [441; 427].

В настоящее время наиболее широко используемые противомикробные агенты подвержены резистентности, и даже некоторые новые агенты сталкиваются с одной и той же проблемой. Преодоление резистентности обычно достигалось путем обнаружения новых противомикробных агентов или использованием производных, полученных полусинтетическими методами, которые не подвержены существующим механизмам устойчивости. Поэтому, поиск новых соединений, понимание механизма действия препаратов и того, как работают механизмы сопротивления микроорганизмов, проблемы, с которыми сталкивается химиотерапия инфекционных заболеваний, и способы решения этих проблем не теряют актуальность и в 21 веке [115; 445; 523; 392].

Все противомикробные средства, используемые в настоящее время, можно разделить на две группы: препараты, применяемые для устранения микроорганизмов вне организма человека, в окружающей среде (дезинфектанты и консерванты) и химиотерапевтические препараты, используемые для устранения микроорганизмов на поверхностях и в организме человека (антисептики и антибиотики) [116; 398; 514].

1.1. Природные, химически модифицированные, синтетические противомикробные и противогрибковые препараты на основе различных классов соединений, применяемые для устранения микроорганизмов вне организма человека, в окружающей среде (дезинфектанты и консерванты)

В настоящее время доступно множество различных видов противомикробных препаратов (синтетических, полусинтетических, природных), которые служат различным целям в медицинских, ветеринарных, фармацевтических и других областях. Их роль в качестве дезинфицирующих средств, консервантов для широкого спектра продуктов и материалов достаточно велика [71; 75; 21; 22; 155; 156; 159; 39; 144; 60; 111; 153; 154].

Основными типами противомикробных и противогрибковых препаратов, применяемых в качестве дезинфицирующих средств, антисептиков и консервантов, являются следующие органические и неорганические соединения [433; 31; 26; 12; 220]:

- фенолы;
- органические и неорганические кислоты, сложные эфиры и соли;
- ароматические диамидины;
- поверхностно-активные вещества;
- антимикробные красители;
- галогены;
- соединения хлора;
- хинолин и изохинолиновые производные;
- спирты;
- окислители;
- соединения, увеличивающие, проницаемость мембран;
- производные тяжелых металлов;
- газообразные дезинфицирующие средства;
- другие группы.

Исторически известно, что фенольные и натуральные дистилляты, содержащие фенолы, с хлором и йодом, являются наиболее ранними в арсенале антисептиков. И сегодня они пользуются широко в качестве дезинфицирующих средств и в качестве консервантов для различных продуктов производства. Основное общее ограничение заключается в том, что они не должны использоваться там, где могут загрязнять продукты [356; 306; 251].

В последнее время нитрофенолы в значительной степени заменяются другими химическими соединениями для защиты растений, для чего в свое время они же пользовались с большой популярностью, хотя 4-нитрофенол по-прежнему находит применение как консервант в кожевенной промышленности [26; 104].

В серии бисфенолов активность зависит от того каким образом связаны фенильные радикалы. Галогенизация бисфенолов обеспечивает дополнительную биоцидную активность.

Большинство фенолов, которые используются для производства дезинфицирующих средств, получают из смолы, полученной в качестве побочного продукта при деструктивной (сухой) перегонке угля [205; 104; 26].

Фенол получают с чистотой 99% [20]. Крезол (2-, 3- и 4-крезолы) должен содержать менее 2% фенола. Некоторые дистилляты смолы содержат нейтральное масло (диапазон кипения 205-296 °C), смешанное с фенолами, предназначенными для производства дезинфицирующих средств [205; 104; 433].

Современный ассортимент солюбилизированных и эмульгированных фенольных дезинфицирующих средств довольно широк. Например, так называемые, «черные жидкости» являются важными фракциями каменноугольной смолы, солюбилизированными с мылом; «белые жидкости» получают путем эмульгирования фракций смолы. Термин «прозрачная растворимая жидкость» также используется для описания солюбилизированных продуктов, таких как лизол [249; 461].

Лизол представляет собой дезинфицирующее средство широкого спектра, демонстрирующее активность против вегетативных бактерий, микобактерий, грибов и вирусов. Большинство вегетативных патогенов, включая микобактерии,

погибают через 15 мин при разведении лизола в пределах от 0,3 до 0,6%. Бактериальные споры гораздо более устойчивы и есть данные, что споры *Bacillus subtilis* выживают в 2% лизоле в течение почти 3 дней. Еще большая устойчивость наблюдается для спор клостридий. Лизол по-прежнему сохраняет коррозионную природу, связанную с фенолами, и его следует использовать с осторожностью. Обнаружено, что как способ производства, так и характер применяемого мыла влияют на биоцидные свойства продукта [433; 104; 26].

Каменноугольная (и, в меньшей степени, нефтехимическая) промышленность дает большое количество фенольных продуктов. Однако сам фенол в больших количествах производится синтетическим способом, как и некоторые его производные. Три таких фенола, которые широко используются, представляют собой 2-фенилфенол, *n*-трет-октилфенол и 4-гексилрезорцин [101].

Октилфенол является фунгистатическим средством и использовался в качестве консерванта для белковых продуктов, таких как клеи и непищевые желатины [306; 251; 59].

2-фенилфенол (2-фенилфеноксид) обладает антибактериальными и противогрибковыми свойствами и используется в качестве консерванта, особенно против грибов, в самых разных областях применения. Многие штаммы *P.aeruginosa* более устойчивы и требуют более высоких концентраций, чем перечисленные выше, для их ингибирования. Основное применение это производное фенола нашло в качестве ингредиента в дезинфицирующих средствах соснового типа, в качестве консервантов и общего сельскохозяйственного дезинфицирующего средства. Оно особенно полезно в качестве слабицида и фунгицида в бумажной, картонной промышленности, а также в качестве дополнения к парафиновому воску при приготовлении вощенной бумаги, вкладышей для бутылок и колпачков [306; 251; 21].

4-Гексилрезорцин имеет низкую токсичность для слизистых, поэтому применяется в медицине. Используется в виде 0,1%-ного раствора в 30% водном

глицерине как дезинфицирующее средство для кожи, а также в таблетках и рассасываемых пластинах для лечения инфекций горла [433; 104; 19].

Галогенирование фенолов усиливает антимикробную активность. Исследования замещенных фенолов датируются началом двадцатого века, и были впервые изучены Ehrlich и широко изучены Klarman с соавторами. Хлорирование увеличивает биоцидную активность фенолов [306; 251].

2,4,6-Трихлорфенол используется в качестве бактерицидного, фунгицидного и инсектицидного агента. Находит применение в консервации текстильной и древесной продукции, в качестве консерванта, а также как ингредиент в некоторых антисептических составах [121].

Пентахлорфенол используют в качестве консерванта для адгезивов, текстиля, дерева, кожи, бумаги и картона. Он используется для консервации красок, но имеет тенденцию обесцвечиваться при солнечном свете. Соединение либо не применяется, либо запрещено во всех государствах ЕС, Индии, Индонезии, Китае, Новой Зеландии, России и Швейцарии. Пентахлорфенол разрешен только для обработки древесины с дополнительными ограничениями и/или нормативными требованиями в Канаде, Мексике и Соединенных Штатах. Также имеется информация о зарегистрированных видах применения для изготовления клеящих составов, в кожевенной промышленности, производстве бумаги и текстильных изделий. В настоящее время производится в Мексике и США [152; 4].

4-Хлор-3-метилфенол (хлоркрезол) используется в качестве консерванта в фармацевтических продуктах и добавок в фармакопейном процессе стерилизации, называемом «нагрев с бактерицидом», также как консервант для промышленных продуктов, таких как клеи, краски, масла для резки и в буровых растворах [306; 251].

4-Хлор-3,5-диметилфенол используется главным образом в качестве местного антисептика и дезинфицирующего средства, но не является спорицидным, не обладает активностью против туберкулезной палочки и инактивируется в присутствии органического вещества [297; 251; 205].

2,4-Дихлор-3,5-диметилфенол (дихлоркениленол, дихлор-метаксилол, ДХМК) обладает схожими свойствами, антимикробным спектром с ПХМК и используется в качестве ингредиента в дезинфицирующих средствах из сосны, в лечебных мылах и скрабах для рук [297; 251; 205].

4-Хлор-3-метилфенол (парахлорметакрезол) пригоден в качестве промышленного консерванта для таких продуктов, как загустители, клеи и пигменты [251; 433;].

Монохлор-2-фенилфенол может быть использован в составе дезинфицирующих средств из сосны, где солюбилизация осуществляется с помощью подходящего мыла [251].

2-Бензил-4-хлорфенол (хлорфен, *орто*-бензил-*пара*-хлорфенол, ОБПХФ) имеет широкий биоцидный спектр, активен против грамположительных и грамотрицательных бактерий, вирусов, простейших и грибов. Однако ОБПХФ чаще используется в дезинфицирующих препаратах в сочетании с другими фенолами [251].

Были получены и исследованы бромированные и фторированные монофенолы, но они не нашли широкого применения.

Нитрофенолы в целом более токсичны, чем галогенфенолы. 3,5-Динитро-*о*-крезол использовался в качестве овицида в садоводстве, но наиболее широко распространенный сегодня 4-нитрофенол входит в группу консервантов, используемых в кожевенной промышленности при концентрациях 0,1-0,5% [453; 139; 433].

Сам фенол – C_6H_5OH (ГФ РФ, 2015) эффективен против грамположительных и грамотрицательных вегетативных бактерий, но медленно действует на бактериальные споры и кислотоустойчивые бактерии. Он находит **в** настоящее время ограниченное применение в медицине, но используется в качестве консерванта в таких продуктах, как животные клеи [93; 150].

Главной составляющей скипидара является циклический углеводород пинен, который практически не имеет биоцидной активности [149; 94; 65].

Терпинеол, в отличие от пинена, проявляет собственную антимикробную активность, обладая, как и пинен свойством модифицировать действие фенолов в солюбилизованных дезинфицирующих препаратах, хотя и не одинаково для различных микроорганизмов. Он обладает приятным запахом гиацинта и используется в парфюмерии, особенно для мыльных изделий, а также в производстве дезинфицирующих средств [149; 94; 65].

Дихлорофен (5,5'-дихлор-2,2'-дигидроксидифенилметан) активен в той или иной степени против бактерий, грибов и водорослей и обычно используется в качестве альгицида, фунгицида, а при разведении 1 к 20 в качестве поверхностного биоцида. Дихлорофен нашел применение в качестве консерванта для туалетных принадлежностей, текстиля, предотвращения роста бактерий в системах водяного охлаждения и увлажнения растений, используется в качестве слаймицида в бумажном производстве (добавляется к бумагам и другим упаковочным материалам для предотвращения роста микроорганизмов), для предотвращения роста водорослей в теплицах [26; 189; 433; 104].

Гексахлорофан (2,2'-дигидрокси-3,5,6,3',5',6'-гексахлордифенилметан) используется главным образом благодаря выраженной антибактериальной активности, но оно гораздо активнее против грамположительных, чем грамотрицательных организмов. Нашел основное применение в качестве активного ингредиента в хирургических скрабах и лечебных мылах, а также использовался в ограниченной степени в качестве консерванта для косметики, но его токсичность ограничивает использование в косметических средствах, а максимальная концентрация составляет 0,1%, при условии, что она не должна использоваться в продуктах для детей или в продуктах личной гигиены [241; 433].

Бромхлорофан (3,3'-дибром-5,5'-дихлор-2,2'-дигидроксидифенилметан) заметно более активен против грамположительных организмов и используется в качестве активного ингредиента в препаратах для дезодорантов и зубных пастах [26; 104; 433].

Триклозан (2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифенилэфир) обычно оказывает бактериостатическое действие против широкого спектра грамположительных и

грамотрицательных бактерий, а также демонстрирует некоторую фунгистатическую активность. Встречается в широком спектре продуктов личной гигиены, таких как зубная паста, порошки для ручной стирки, дезодоранты. Он идеально подходит для этого, поскольку обладает низкой токсичностью и раздражительностью для кожи. Но связь между устойчивыми к триклозану бактериями и резистентностью к антибиотикам привели к опасениям относительно его использования [365; 22; 216].

Фентиклор (2,2'-дигидрокси-5,5'-дихлордифенилсульфид) обладает высокой активностью против грамположительных организмов и *P.aeruginosa*. Фентиклор нашел основное применение для лечения дерматофитных состояний. Однако он может вызвать фотосенсибилизацию, и поэтому его использование в качестве консерванта ограничено, но он обладает неплохим потенциалом в качестве фунгицида. Хлорированный аналог фентиклора 2,2'-дигидрокси-3,4,6,3'4',6'-гексахлордифенилсульфид оказался эффективным ингибитором роста микробов в эмульсиях с сосновым маслом. Доказана противогрибковая активность гидроксидифенилсульфидов [251].

Большое количество органических кислот, как ароматических, так и алифатических, и одна или две неорганические кислоты нашли применение в качестве консервантов, особенно в пищевой промышленности.

Некоторые, например бензойная кислота, используются для сохранения фармацевтических продуктов; другие салициловая, ундециленовая и также бензойная используются для местного лечения грибковых инфекций кожи. Было установлено, что уксус, содержащий уксусную кислоту (этановую кислоту), действует как консервант. Ранее он также использовался, как раневая повязка, позднее такие раневые повязки были вновь использованы при псевдомонададных инфекциях [433; 56; 100].

Соляная (HCl) и серная кислоты (H₂SO₄) – это две минеральные кислоты, иногда используемые в ветеринарной дезинфекции. Соляная кислота в высоких концентрациях является спорицидной и используется для дезинфекции шкур и кожи, зараженных спорами сибирской язвы. Серная кислота даже при высоких

концентрациях не является споридиной, но в некоторых странах она используется, в сочетании с фенолом, для обеззараживания полов, кормовых коробок и желобов в животноводстве [250].

Лимонная кислота является одобренным дезинфицирующим средством против ящура. Также, благодаря своим хелатирующим свойствам, лимонная кислота повышает проницаемость наружной мембраны грамотрицательных бактерий при использовании щелочных pH . Яблочная кислота и глюконовая кислота, но не винная кислота, также могут действовать как вещества, усиливающие проницаемость, при щелочном pH среды [190].

Уксусная кислота (этановая кислота), как разбавленное синтетическое соединение или как уксус натурального происхождения, используется главным образом в качестве консерванта для овощей. В молочной промышленности используются дезсредства, на основе надуксусной кислоты и перекиси водорода [400; 433; 100; 148].

Пропионовая кислота используется почти исключительно в виде натриевой и, в меньшей степени, кальциевой соли в хлебопекарной промышленности, для ингибирования роста плесени и бактерий в хлебах и пирожных. Это особенно полезно для ингибирования роста спорообразующих аэробных бактерий *Bacillus macerans*, которые приводят к возникновению инфекционного феномена, называемого «липкий хлеб». Другие продукты, успешно сохраняющиеся с пропионатами, включают сыры и солодовый экстракт. В дополнение к пищевым продуктам, упаковочные материалы также защищают от микробного повреждения пропионатами. Пропионовая кислота также используется в парфюмерных композициях и косметических средствах как антиоксидант и консервант. Дезинфектанты, содержащие надпропионовую кислоту, обладают микобактерицидным действием [100; 14].

Неодекановая кислота (ундециленовая кислота) используется либо как таковая, либо как соль кальция или цинка при лечении поверхностных дерматофитов. Обычно ее применяют в виде мази при концентрациях 2-15%.

2,4-Гексадиеновая кислота (сорбиновая кислота) – ненасыщенная карбоновая кислота эффективна против широкого спектра микроорганизмов и используется в виде самой кислоты или ее калиевой соли при концентрациях 0,01-0,1% для сохранения хлебобулочных изделий, безалкогольных напитков, алкогольных напитков, сыров, сухофруктов, рыбы, соленых огурцов, в упаковочных материалах и фармацевтических средствах [320; 434; 520; 56; 433].

Молочная кислота разделяет с некоторыми другими гидроксикислотами интересное свойство уничтожать микроорганизмы в воздухе. Было обнаружено, что молочная кислота является дешевым эффективным бактерицидом при распылении в областях, подлежащих стерилизации. Однако она оказывает небольшое раздражающее действие на слизистую оболочку носа, что, как правило, ограничивает его использование. Ее можно использовать в чрезвычайных ситуациях для стерилизации перчаточных боксов или вытяжек, если другие средства стерилизации не доступны. Молочная кислота в жидкой форме используется в качестве подкислителя для продуктов с низким содержанием pH и фруктовых соков [271; 179; 266; 535]. Средства, на основе йода и молочной кислоты, используются для профилактики маститов в животноводстве [63].

Бензойная кислота используется в качестве консерванта для пищевых и фармацевтических продуктов. В дополнение к использованию в качестве консерванта, бензойную кислоту в сочетании с другими агентами применяют для местного лечения грибковых инфекций. Бензойная кислота, как и многие другие соединения, ингибирует рост *Bacillus spp.* [271; 475; 412; 35].

Салициловая кислота часто используется в сочетании с бензойной кислотой и другими противогрибковыми средствами для местного лечения грибковых инфекций. Она обладает кератинолитической активностью и, кроме того, влияет на обменные процессы [275; 56; 20].

Дегидроацетоуксусная кислота (ДАУК) активна в отношении *Aerobacter aerogenes* 0,3 мкг/мл, *B.cereus* 0,3 мкг/мл, *Lactobacillus plantarum* 0,1 мкг/мл, *S.aureus* 0,3 мкг/мл, *P.aeruginosa* 0,4 мкг/мл, *A.niger* 0,05 мкг/мл, *Penicillium*

expansum 0,01 мкг/мл, *Rbizopus nigricans* 0,05 мкг/мл, *T.interdigitale* 0,005 мкг/мл, *Saccharomyces cerevisiae* 0,1 мкг/мл. Обширные токсикологические исследования показали, что соединение можно использовать в качестве консерванта для пищевых продуктов, косметических средств и лекарств [518; 433].

Пары сжигания серы, образующиеся оксиды серы, использовались еще древними греками и египтянами в качестве фумигантов для помещений и пищевых сосудов для очистки и дезодорации. Серная известь, водная суспензия элементной серы и гидроксида кальция, была введена в качестве фунгицида для садоводства в 1803 году. Позже, соли, главным образом натрия, калия и кальция, серной кислоты использовались при сохранении вина и пищи. Дрожжи и плесени могут расти при низких значениях pH и, следовательно, высоко значение сульфитов в качестве ингибиторов роста грибов в кислотных средах, таких как фруктовые соки [271].

Эфиры *n*-гидроксibenзойной кислоты (парабены), семейство биоцидов, которые можно рассматривать как фенолы или сложные эфиры ароматических гидроксикарбоновых кислот, относятся к наиболее широко используемой группе консервантов [419; 436; 124; 9]. Соединения проявляют низкую системную токсичность [433].

Таким образом, можно сказать, что парабены, как правило, более активны против грамотрицательных бактерий и грибов, включая дрожжи, чем против грамположительных бактерий, но *P.aeruginosa*, как это часто бывает, более устойчива [250; 302; 297].

Метилловые, этиловые, пропиловые и бутиловые эфиры ванилиновой кислоты (4-гидрокси-3-метоксибензойная кислота) обладают противогрибковыми свойствами. Было показано, что этилванилат менее токсичен, чем бензоат натрия, и он используется для консервирования пищевых продуктов и пищевых упаковочных материалов от заражения грибами [433].

Диамидины представляют собой группу органических соединений, которые были впервые введены в медицину в 20-е годы прошлого столетия, как возможные заменители инсулина, поскольку понижают уровень глюкозы в крови

человека. Позже было обнаружено, что они обладают собственной трипаноцидной активностью, в связи с чем, возникло исследование их антимикробной активности. При этом выявлено два соединения (пропамидин и дибромпропимидин), проявляющие активность против бактерий и грибов.

Пропамидин обладает широким спектром антибактериальной и противогрибковой активности [345; 308].

Микроорганизмы, подвергшиеся воздействию пропамидина, быстро приобретают устойчивость к нему с помощью последовательной субкультуры в присутствии возрастающих доз. Штаммы *S.aureus* метициллин-устойчивые (MRSA) могут проявлять заметную резистентность к пропамидину. Он, главным образом, используется в виде крема для местного применения при лечении раневых поверхностей [183; 308].

Дибромпропамидин (2,2'-дибром-4,4'-диамидинодифеноксипропан), активен против грамположительных неспорообразующих организмов. Устойчивость микроорганизмов может быть приобретена в последовательной субкультуре, а микробы, с приобретенной резистентностью к дибромпропамидину, также проявляют некоторую устойчивость к пропамидину [188; 433].

Различные бигуаниды, включая хлоргексидин, алексидин и полимерные формы проявляют антимикробную активность.

Хлоргексидин широко применяется в сочетании с бромидом цетилтриметиламмония в качестве местного антисептика и обладает широким спектром антибактериальной активности, как против грамположительных, так и против грамотрицательных бактерий. Некоторые бактерии, особенно штаммы *Proteus* and *Providencia spp.*, могут быть очень устойчивы к бигуаниду. Он не является спорицидным. Хлоргексидин не смертелен для кислотоустойчивых организмов, хотя и демонстрирует высокую степень бактериостаза. Он, однако, микобактериоциден [430; 434; 431; 46].

Основное применение хлоргексидина – это медицинская и ветеринарная антисептика. Спиртовой раствор хлоргексидина является очень эффективным

дезинфицирующим средством для кожи. Он используется в процедурах катетеризации, в орошении мочевого пузыря, в акушерстве и гинекологии. Это один из рекомендуемых бактерицидов для включения в глазные капли который широко используется в контактных линзах [278; 481; 371].

В ветеринарной практике хлоргексидин применяется в качестве дезинфицирующего средства для сосков коров после доения и может быть использован в качестве антисептика для ран. Его также широко используют в стоматологической практике из-за широкого спектра противомикробной активности, консистенции и низкой токсичности [284; 273; 24].

Хлоргексидин имеет низкую токсичность для слизистых и, в частности, ротовой полости, и его можно назначать для лечения горла в виде примочек [297; 339; 46].

Алексидин значительно более активно, чем хлоргексидин, в индуцировании изменения проницаемости клеток *E.coli*, а концентрации алексидина (но не хлоргексидина) выше МПК индуцируют клеточный лизис. Алексидин был рекомендован для использования в качестве перорального антисептического и препятствующего образованию зубного налета соединения [219; 493].

Полимер гексаметиленбигуанида ингибирует рост большинства бактерий на уровне от 5 до 25 мкг/мл, но для ингибирования *P.aeruginosa* требуется 100 мкг/мл, а для *P.vulgaris* требуется 250 мкг/мл. Он менее активен против грибов, например, *Cladosporium resinae*, которые участвуют в порче фармацевтических продуктов, и его требуется 1250 мкг/мл для предотвращения их роста и размножения [280; 281; 305].

Полигексаметилен бигуанид находит применение в качестве общего стерилизующего агента в пищевой промышленности, его можно использовать в пивоваренной промышленности, так как это не влияет на удержание пены на элях и пиве. Он также успешно используется для дезинфекции плавательных бассейнов. ПГМБ обладает активностью как против трофозита, так и цист *Acanthamoeba castellanii*. В последнее время было показано, что ПГМБ оказывает

благоприятное влияние на ингибирование формирования зубной бляшки при использовании в жидкостях для полоскания рта [328; 424].

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) имеют две области в своей молекулярной структуре, одна из которых представляет собой гидрофобную группу углеводородов, а другая – водопоглощающую (гидрофильную или полярную) группу. В зависимости от заряда или отсутствия ионизации гидрофильной группы поверхностно-активные вещества классифицируются на анионные, катионные, неионные и амфолитические (амфотерные) соединения [139].

Катионные поверхностно-активные вещества (КПАВ) обладают сильным бактерицидным, но слабыми детергентными свойствами. Термин «катионное моющее средство» обычно означает соединение четвертичного аммония (КАС). Также используются поверхностно-активные четвертичные аммиачные гермициды [289; 188; 101; 106].

Помимо монокулярных соединений производные 4-аминоквиная (например, лауролин) являются мощными противомикробными агентами, а также бискулярными соединениями подобными хлориду хедакина и деквалину. В дополнение к указанным выше соединениям полимерные КПАВ используются также в качестве промышленных биоцидов. Одно из таких соединений, хлорид 3-(триметокси)пропил-октадецилдиметиламмония, демонстрирует мощную антимикробную активность при химическом связывании с различными поверхностями [462; 433].

Антимикробные свойства КПАВ были впервые обнаружены в 1916 году, но они не достигли значимости до работы Domagk (1935) [297].

КПАВ в основном активны против грамположительных бактерий, более высокие концентрации (примерно 1 к 30 000 или 0,0033%) являются летальными для грамотрицательных бактерий, хотя *P.aeruginosa* имеет тенденцию к высокой устойчивости. Тем не менее, клетки этого микроорганизма, которые обладают высокой устойчивостью к хлориду бензалкония (1 мг/мл, 0,1%), выращенные в его присутствии, могут по-прежнему демонстрировать ультраструктурные

изменения. КПАВ имеют трипаноцидную активность, но не являются микобактериоцидами, предположительно из-за липидов воскового слоя этих микроорганизмов. Грамотрицательные бактерии, такие как *E.coli*, *P.aeruginosa* и *S.typhimurium*, резистентны к КПАВ, но дикие мутанты чувствительны [434; 112; 96; 32].

Вирусы более устойчивы к КПАВ, чем бактерии или грибки. КПАВ имеют выраженный протеолитический эффект и они активны против таких вирусов, как простой герпес, грипп и аденовирусы, оказывают слабое влияние на энтеровирусы, например, на вирус полиомиелита, вирус *Coxsacke* и *ECHO*. Также КПАВ обладают противогрибковыми свойствами, хотя они являются фунгистатическими, а не фунгицидными [434; 88].

КПАВ были рекомендованы для использования в пищевой гигиене в больницах, а также часто используются в пищевой промышленности [15]. КАВ, используемый в коммерческих целях в дезинфицирующих растворах контактных линз, активен против микроорганизмов, связанных с глазными инфекциями [233; 301]. Бензотион хлорид наносят на раны в виде водного раствора (0,1%) и в виде раствора (0,2%) в спирте и ацетоне для предоперационной дезинфекции кожи и для контроля роста водорослей в плавательных бассейнах. Цетримид используется для очистки и дезинфекции ожогов и ран, а также для предоперационной чистки кожи. Хлорид цетилпиридиния используют как средство для дезинфекции кожи и для антисептической обработки мелких раневых поверхностей в виде орального и глоточного антисептика и в качестве консерванта в эмульсиях. Косметически он используется при концентрации от 0,1 до 0,5% в препаратах для волос и в дезодорантах; более низкие концентрации (0,05-0,1%) включены в лосьоны для лица и бритья. В ветеринарии КПАВ используются для дезинфекции автоматических кормушек и для контроля микробного роста в шерсти. В общем, КАВ являются очень полезными дезинфицирующими и фармацевтическими, и косметическими консервантами [188; 247; 32].

Анионные поверхностно-активные агенты натриевые и калиевые соли высших жирных кислот (ВЖК, мыла), аминные мыла, сульфаты лаурилового эфира (например, лаурилсульфат натрия), а также сульфатированные жирные спирты. АПАВ обладают превосходными детергентными свойствами, но они, как считается, практически не обладают антибактериальным действием. Однако, изучены бактериостатические свойства ряда алкилсульфатов натрия и обнаружено, что в целом они ингибируют рост грамположительных, но не грамотрицательных бактерий [320; 520; 433].

Считается, что неионные поверхностно-активные вещества (НПАВ) не обладают антимикробными свойствами. Однако низкие концентрации полисорбатов влияют на проницаемость внешней мембраны грамотрицательных микроорганизмов, которые, таким образом, становятся более чувствительными к различным противомикробным агентам. Было также показано, что неионные поверхностно-активные вещества обладают противогрибковыми свойствами [463].

Высокие концентрации Твина превышают активность КПАВ, бигуанидов, парабенов и фенолов. Это свойство используется при разработке подходящих нейтрализующих агентов [26; 297; 343; 104].

Амфотерными агентами являются соединения смешанного анионно-катионного характера. Они сочетают моющие свойства анионных соединений с бактерицидными свойствами КПАВ. Бактерицидная активность такого рода препаратов остается практически постоянной в широком диапазоне значений pH , а также они менее легко инактивируются, чем КПАВ белками. Примерами амфотерных агентов являются додецил- β -аланин, додецил- β -аминомасляная кислота и додецилди(аминоэтил)глицин. Соединения являются бактерицидными для грамположительных и грамотрицательных бактерий, и, в отличие от КПАВ, анионных и неионных агентов, их спектр включает микобактерии, хотя скорость уничтожения этих организмов меньше, чем у других. Соединения на основе додецилди(аминоэтил)глицина находят применение в качестве дезинфицирующих средств в пищевой промышленности. Бетаины представляют собой группу

амфотерных поверхностно-активных веществ, которые имеют сходную структуру с самим бетаином или триметилглицином, природным компонентом свеклы и сахарной свеклы, получаемым в качестве побочного продукта сахарно-свекольной промышленности. Такие соединения совместимы с анионами и обладают высокой растворимостью в воде. Аналоги, в которых одна из метильных групп замещена длинноцепочечным алкильным остатком, находят применение в качестве детергентов и в качестве основы для солюбилизации или эмульгирования фенольных биоцидов [263; 433; 470].

В настоящее время два альдегида используются в качестве дезинфицирующих средств, а именно глутаровый альдегид и формальдегид, хотя другие изучены тоже и показывают противомикробную активность. Глутаральдегид обладает высокой микробицидной активностью против бактерий и их спор, мицелиальных и спорных форм грибов и различных типов вирусов. Несмотря на некоторые сомнения в его микобактерицидной активности, он в настоящее время считается эффективным противотуберкулезным агентом. Механизм действия глутаральдегида определяется взаимодействием с клеточной стенкой бактериальных клеток [361; 104; 78].

Кислотный раствор глутарового альдегида является эффективным микробицидом, при условии использования в течение длительного периода контакта [178; 196; 29].

Но кислотный раствор глутарового альдегида представляет собой значительно менее эффективное дезинфицирующее средство, чем щелочной. Развитие устойчивости микроорганизмов к глутаровому альдегиду возможно в период споруляции и прорастание спор *Bacillus spp.* Высушенные споры значительно более устойчивы к химическим дезинфицирующим средствам, чем споры в суспензии, и, похоже, глутаровый альдегид не является исключением. Использование теста Ассоциации официальных аналитических химиков (АОАС) с высушенными спорами *B.subtilis* показало, что для 2% щелочного раствора глутарадегида требуется до 10 ч для достижения стерилизации при 20 °C [332; 178; 196; 74].

Глутаральдегид рекомендуется для дезинфекции/стерилизации определенных видов медицинского оборудования, в частности цистоскопов и анестезиологического оборудования. Глутаровый альдегид уже давно используется для дезинфекции эндоскопов, артроскопов и лапароскопов, хотя имеются проблемы из-за его токсичности. Глутаральдегид также использовался в ветеринарной практике для дезинфекции посуды и помещений, но его потенциальные мутагенные и канцерогенные эффекты делают эти виды использования опасными для персонала [221; 203; 5; 501; 27].

Перуксусная кислота считается подходящим альтернативным глутаральдегиду дезинфицирующим средством, так как при ее разложении образуются только кислород и вода, а также она обладает широким спектром активности [353; 500; 193; 123].

Формальдегид – это микробицидный агент с летальной активностью против бактерий и их спор, грибов и многих вирусов. Описана резистентность к формальдегиду, обусловленная микробной плазмидой, по-видимому, из-за деградации альдегида [64; 118; 158; 142; 151].

Нокситиолин является бактерицидным средством и, по-видимому, обязан своей антибактериальной активностью, получающемуся при разложении, формальдегиду и широко используется как местно, так и в доступных полостях тела, особенно в качестве ирригационного раствора при лечении перитонита [105; 433].

Тауролин (бис-(1,1-диоксопергидро-1,2,4-тиазинил-4)метан) обладает широким спектром антимикробной активности *in vitro* и *in vivo* и считается нетоксичным носителем формальдегида. Установлено, что антибактериальная активность тауролина значительно выше, чем у свободного формальдегида. Было показано, что клинически интраперитонеальное введение тауролина приводит к значительному снижению частоты возникновения перитонита. Еще одним агентом, служащим источником формальдегида, является гексамин (метенамин). Сам по себе гексамин неактивен, но в условиях кислотного гидролиза распадается с образованием формальдегида [182; 245].

Орто-фталальдегид (ОФА) обладает мощной бактерицидной, спорицидной и вирулицидной активностью [500; 5; 211; 346].

Другие альдегиды тоже были изучены, но результаты наблюдались противоречивые [188; 5; 37].

Существуют три основные группы красителей, которые находят применение в качестве противомикробных агентов: акридины, группа трифенилметана и хиноны.

Акридины представляют некоторую ценность в качестве противомикробных агентов [498].

Они относительно медленны в своем действии и не являются спорицидными. Устойчивость к акридинам развивается в результате мутации и косвенного отбора. Интересно, что акридины могут устранить («излечить») резистентность в R^+ штаммах. MRSA и устойчивые к метициллину штаммы *S.epidermidis* (MRSE) более устойчивы к акридинам, чем иные антибиотикочувствительные штаммы, хотя эта резистентность зависит от наличия генов *qac*, особенно *qacA* или *qacR* [345; 92; 308].

На протяжении многих лет акридины занимали значительное место в медицине. Однако с появлением антибиотиков и других химиотерапевтических агентов они теперь используются нечасто. Основное их применение – лечение инфицированных ран [433; 58].

Наиболее важными компонентами антибактериальных препаратов трифенилметанового ряда являются кристаллический фиолетовый, бриллиантовый зеленый и малахитовый зеленый.

Эти соединения использовались в качестве местных антисептиков для обработки ран и ожогов, но были ограничены эффективностью против грамположительных бактерий, хотя против грамотрицательных организмов в меньшей степени и серьезным снижением активности в присутствии сыворотки. Штаммы MRSA и MRSE, содержащие *qac*-гены, более устойчивы к кристаллическому фиолетовому, чем штаммы *S.aureus* и *S.epidermidis*, содержащие R-плазмиды. Это, как полагают, является результатом эффективной

системы выброса в устойчивых штаммах. Тем не менее, кристаллический фиолетовый не находит широкого применения в качестве антибактериального агента, и клиническая значимость исследований противомикробной активности, таким образом, остается неопределенной [345; 433; 411; 308; 316].

Хиноны – это натуральные красители, которые придают цвет многим формам флоры и фауны. Химически они представляют собой дикетоциклогексадиены, простейшим членом которых является 1,4-бензохинон [139].

Что касается токсичности для бактерий, плесени и дрожжей, наиболее предпочтительны нафтахиноны, которые по активности следуют в следующем порядке: фенантренхиноны, бензохиноны и антрахиноны [25].

Наиболее важными микробицидными галогенонесущими препаратами являются соединения йода, хлора и брома. Фтор является слишком токсичным, раздражающим и агрессивным для использования в качестве дезинфицирующего средства, хотя, фториданионы, как было показано, индуцируют бактериальный лизис. Наиболее применяемые биоциды – йод, йодфторы и хлор-высвобождающие соединения (те, которые являются бактерицидными в силу «доступного галогена») [388; 101].

Йод был впервые применен для обработки ран около 140 лет назад и, как было показано, является эффективным микробицидным средством с быстрым летальным эффектом для бактерий и их спор, плесени, дрожжей и вирусов [433; 119].

К сожалению, йодные растворы окрашивают ткани и, как правило, токсичны [255; 43].

Повидон-йод спорициден и повязка с повидон-йодом уменьшает количество жизнеспособных спор *Bacillus globigii* на коже более чем на 99% за 1 ч, что говорит о том, что этот иодофор способен подавлять за короткое время спорообразующие микроорганизмы на коже. Показано, что повидон-йод эффективен против ряда MRSA-штаммов, *Chlamydia*, *Herpes simplex*, аденовирусов и энтеровирусов и значительно уменьшает микрофлору кожи,

демонстрируя пригодность для предварительной хирургической обработки рук [516; 416; 7; 443; 482; 107; 51].

Соединения хлора обычно используются в качестве дезинфицирующих агентов в пищевой промышленности из-за их высокой антимикробной эффективности, низкой токсичности для человека, широкого спектра применений и низкой стоимости, но имеют недостатки в том, что являются раздражающими и агрессивными. Соединения с органическим хлором менее раздражающие и коррозионные, чем соединения с неорганическим хлором, и обладают большей стабильностью, но медленнее действуют с точки зрения бактерицидной эффективности. Гипохлориты обладают широким антибактериальным спектром, хотя они менее активны против спор, чем против неспорулирующих бактерий, и обладают низкой активностью против микобактерий [231; 388; 354; 90; 8; 67; 57; 157].

Было обнаружено, что хлорнезистентные бактерии не подвержены влиянию брома, но их легко убивают растворами хлорбромидов. Такие смеси могут иметь значение при дезинфекции природных вод. Органические соединения хлора (*N*-хлорсоединения), которые содержат группу $=N-Cl$, проявляют микробицидную активность. Примерами таких соединений являются хлорамин-Т, дихлорамин-Т, галазон, а также дихлоризоциануровая кислота, дихлоризоцианураты натрия и калия [433; 83; 84].

Хлор-высвобождающие вещества продолжают широко изучаться. Изучена их спорицидная активность, противовирусная эффективность и полезность в стоматологической практике [329; 483; 317; 425; 354; 403].

Хлороформ ($CHCl_3$) [18] используется в качестве консерванта во многих фармацевтических продуктах, предназначенных для внутреннего использования, более ста лет. Хлороформ не присутствует в качестве одобренного материала в последней версии *Cosmetics Directive* [241], но по-прежнему включен в Британскую фармакопею [205], как общий анестетик и консервант, в США полностью запрещен.

Антимикробная активность брома была впервые обнаружена в 1930-х годах, но только через 30 лет она была коммерчески использована при дезинфекции воды. Наиболее часто используемым окислительным биоцидом в рециркуляционных водах является хлор, а бром был предложен в качестве альтернативы. Молекулярный бром в чистом виде не используется в коммерческих целях. Для этого применяется активированный бромид, полученный путем взаимодействия бромида натрия с сильным окислителем, таким как гипохлорит натрия или газообразный хлор, а также органические вещества, высвобождающие бром, такие как N-бром-N-хлордиметилгидантоин (БХДМГ) [262].

В ряду производных хинолина, проявляющих антимикробную активность, различают три основные группы: замещенные 8-гидроксихинолина, 4-аминохинолина и изохинолина. Однако, было показано, что вновь изученные производные хинолина, такие как гидразинохинолины, пиридазинохинолин и спироиндохинолин также обладают противомикробной активностью [260; 383; 505; 17].

8-Гидроксихинолин (оксин) обладает антибактериальной активностью против грамположительных бактерий, но гораздо меньше против грамотрицательных организмов, также обладает противогрибковой активностью, хотя и в меньшей степени [137; 17].

Производные 4-аминохинолина – это ПАВ, которые также попадают в эту группу. Наиболее важными среди них являются ацетат лауролина и хлорид деквалина (бис-ПАВ). Оба соединения обладают антибактериальной активностью, особенно против грамположительных бактерий, а также значительной активностью против многих видов дрожжей и грибов [69; 175].

Наиболее важным производным изохинолина является хлорид хедакина. Четвертичная соль изохинолина обладает антибактериальной и противогрибковой активностью и считается одним из наиболее активных противогрибковых агентов ПАВ [433].

Известно, что спирты обладают антимикробными свойствами. Как правило, алканолаы показывают быструю бактерицидную активность, включая кислотоустойчивые бациллы, но не являются спорицидными. Они обладают низкой активностью против одних вирусов, но являются вирулицидными по отношению к другим [100; 321].

Этанол является быстро летальным для неспорообразующих бактерий и разрушает микобактерии, но неэффективен во всех концентрациях против бактериальных спор. Обезвреживание спор *B.subtilis* может быть достигнуто путем обработки этанолом только при 65 °C [446].

Наиболее эффективная концентрация составляет около 60-70%. Растворы йода или хлоргексидина в 70% спирте могут быть использованы для предоперационной дезинфекции кожи. Этанол используется в косметических средствах из-за его относительно незначительного запаха и раздражающего действия. Средства для рук на спиртовой основе становятся все более популярными для дезинфекции. Гигиена рук имеет особое значение для медицинских профессий, с целью предотвращения внутрибольничных инфекций, вызванных перекрестной передачей микроорганизмов. Было показано, что соблюдение режима кожной дезинфекции улучшается за счет введения моющих средств для рук на спиртовой основе по сравнению с мылом и водой. Тем не менее, есть некоторые спорные вопросы об эффективности таких средств. Несмотря на то, что в некоторых исследованиях сообщалось, что спиртовые растворы более эффективны, чем мытье рук с антисептическим мылом и водой, другие исследователи настаивают, что такие средства менее эффективны [532; 370; 282; 469].

Метиловый спирт обладает низкой антибактериальной активностью и не является спорицидным. Кроме того, он потенциально токсичен и поэтому мало используется. Однако свежеприготовленные смеси спиртов (особенно метанола) и гипохлорита натрия весьма спорицидны [201; 393; 272].

Изопропиловый и *n*-пропиловый спирты являются более эффективными бактерицидами, чем этанол, но не являются спорицидными. Они смешиваются с

водой во всех пропорциях, но изопропиловый спирт имеет менее неприятный запах, чем *n*-пропиловый спирт, и считается подходящей альтернативой этанолу в различных косметических средствах либо как растворитель, либо как консервант. Изопропиловый спирт обладает вируцидной активностью, но не к «гидрофильным» (не липидным) вирусам. Продемонстрирована инактивация ВИЧ-1 изопропиловым спиртом [485; 296; 490; 76].

В дополнение к антимикробным свойствам бензиловый спирт является слабым местным анестетиком. Он обладает активностью против грамположительных и грамотрицательных бактерий и против плесени [289].

Фенилэтиловый спирт является антимикробным агентом с селективной активностью против различных бактерий, особенно грамотрицательных, и был рекомендован для использования в качестве консерванта в офтальмологических растворах, часто в сочетании с другими микробицидами. Из-за его более высокой активности против грамотрицательных бактерий в культуральные среды можно включать фенилэтанол для выделения грамположительных бактерий из смешанной флоры, например, фенилэтиловый спиртовой агар [289; 124].

Бронопол (2-бром-2-нитропропан-1,3-диол) обладает выраженной антибактериальной активностью, но ограниченной активностью против грибов [478; 293; 174].

Бронопол широко используется в качестве консерванта в фармацевтических и косметических препаратах. Однако следует избегать его использования для сохранения продуктов, содержащих вторичные амины, поскольку побочным продуктом этой реакции является нитрозоамин, являющийся канцерогеном [478; 426; 56; 100].

Антимикробная активность 2-феноксиэтанола и других консервантов была изучена в 70-х годах прошлого столетия. Феноксиэтанол обладает значительной активностью против *P.aeruginosa*, но имеет меньшую активность против других грамотрицательных и грамположительных бактерий. Используется в качестве консерванта в виде 1% водного раствора [289; 66].

Хлорбутол (хлорбутанол) является антибактериальным и противогрибковым средством. Его типичная концентрация при использовании в качестве фармацевтического консерванта составляет 0,3-0,5% мас/об [289].

2,4-Дихлорбензиловый спирт имеет широкий спектр активности, но как псевдомонады, так и золотистые стафилококки приобретают к нему резистентность [478].

Перекись (пероксид) водорода (H_2O_2) является привычным бытовым антисептиком. Она была обнаружена в 1818 году и признана агентом, обладающим антибактериальными свойствами. Растворы перекиси водорода обладают дезинфицирующими, антисептическими и дезодорирующими свойствами [297; 452; 402; 517; 77; 38].

Надуксусная (перуксусная) кислота ($CH_3-COOOH$) использовалась в качестве антибактериального агента с 1955 года. Перуксусная кислота имеет широкий спектр активности, включая бактерии и их споры, плесени, дрожжи, водоросли и вирусы. Раствор перуксусной кислоты находит широкое применение в пищевой промышленности и для дезинфекции осадка сточных вод [434; 354].

Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК) была предметом интенсивного исследования в течение многих лет [433].

В медицине ЭДТК обычно используют в качестве натриевых или кальций-натриевых солей. Натрий-кальциевый эдетат используется при лечении хронического отравления свинцом, натриевые соли используются клинически для хелатирования ионов кальция, тем самым уменьшая кальций в сыворотке. Также ЭДТК применяется в качестве стабилизирующего агента в некоторых инъекциях препаратах и для глазных капель. Некоторые грамотрицательные бактерии становятся чувствительными к лизоциму в присутствии ЭДТК в *трис*-буфере и при этом ЭДТК индуцирует лизис *P.aeruginosa* [454; 197; 295].

Пермеабиллизаторы (пермеабиллизующие агенты) являются химическими соединениями, которые увеличивают бактериальную проницаемость для биоцидов. Такие химические вещества включают хелатирующие агенты,

описанные выше, поликатионы, лактоферрин, трансферрин и соли некоторых кислот [489].

Поликислоты, такие как поли-*L*-лизин (лизин₂₀; PLL), индуцируют высвобождение липополисахарида (ЛПС) из наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Организмы, обработанные PLL, значительно более чувствительны к гидрофобным антибиотикам [489].

Лактоферрин, изменяя проницаемость мембран, повышает восприимчивость бактерий к лизоциму и антибиотикам, таким как пенициллин, что приводит к синергетическим сочетаниям [507; 225; 246; 359; 450].

Считается, что трансферрин, железосвязывающий белок, оказывает сходное действие с лактоферрином. Было также продемонстрировано, что молочная кислота изменяет проницаемость наружной мембраны грамотрицательных бактерий, но при низком значении *pH*. Молочная кислота не является хелатором, как лимонная, глюконовая и яблочная кислоты, но рассматривается как протонирующий агент анионных компонентов, имеющих фосфатные и карбонильные группы, что приводит к ослаблению межмолекулярных взаимодействий между компонентами наружной мембраны микроорганизмов [179; 266].

Исторически описано использование высоких концентраций соли, используемых эмпирически в процессе соления в качестве консерванта для мяса, а также использование медных и серебряных сосудов для предотвращения загрязнения воды путем роста микробов. Соль по-прежнему используется в некоторых частях мира в качестве консерванта для мяса, а соли тяжелых металлов, особенно серебра, ртути, меди и, в последнее время, олова, все еще используются в качестве противомикробных агентов. Производные меди, ртути, серебра и олова также находят применение в качестве антисептиков и консервантов. В дополнение к обладанию антимикробной активностью сами по себе многие ионы металлов необходимы для активности других лекарственных средств. Типичным примером является 8-гидроксихиолин, для которого

требуется Fe^{2+} для активации. Доказана взаимосвязь между антимикробными соединениями и катионами металлов [508; 309].

Медные соединения в основном используются в лесной, бумажной и лакокрасочной промышленности в качестве консервантов, но из-за токсичности практически не используются в фармацевтической и косметической промышленности [533; 288].

Серебро и его соединения нашли применение в качестве антимикробных средств с древних времен и используются и в настоящее время [432; 206; 460; 204; 429; 473].

Олигодинамическое действие серебра, исторически использовалось в системе очистки воды. Эффективность хирургической повязки, высвобождающей серебро, исследовалась с использованием системы нейтрализации, чтобы продемонстрировать, что образующиеся ионы Ag^+ отвечают за антибактериальные эффекты этой повязки. При концентрации 10^{-9} - 10^{-6} моль/л Ag^+ является чрезвычайно активным биоцидом [477; 435; 315; 227].

Ртуть – долгое время применялась еще алхимиками, арабскими врачами и другими медиками. В 1850-х годах в соли ртути включали фенол, гипохлориты и йод, дополняющие противомикробные препараты, имеющиеся в распоряжении врача. В настоящее время применение ртути в медицине уменьшилось, хотя ряд органических производных ртути используют по сей день в качестве бактериостатических и фунгистатических агентов, в качестве консервантов и бактерицидов в инъекционных растворах, например, меркурохром, нитромерзол, тиомерсал и фенилмеркурический нитрат. Соли, такие как стеарат, олеат и нафтенат, до недавнего времени широко использовались для сохранения древесины, текстиля, красок и кожи [89; 395; 434; 45].

Меркурохром (динатрий-2,7-дибром-4-гидроксимерфурилоцефан) теперь представляет только исторический интерес. Это был первый препарат, содержащий органическую ртуть, который можно было использовать в медицине, и водный раствор пользовался популярностью в качестве заменителя йодных растворов в качестве дезинфицирующего средства для кожи [433].

Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США в 1998 году решило запретить применение меркурохрома до проведения дополнительных исследований.

Нитромерзол активен против вегетативных микроорганизмов, но неэффективен против спор и кислотоустойчивых бактерий. В основном используется в США [434; 433].

Тиомерсал (мертиолат, натрий-*o*-(этилгидраргирумтио)-бензоат) – это производное ртути использовалось в качестве дезинфицирующего средства для кожи, а в настоящее время используется в качестве фунгицида и консерванта (0,01-0,02%) для биологических продуктов, например, бактериальных и вирусных вакцин. Он обладает противогрибковыми свойствами, но не действует на споры. Растворы устойчивы при автоклавировании, но менее стабильны при воздействии света или щелочей, и также они несовместимы с различными химическими соединениями, включая соли тяжелых металлов [289].

Нитрат фенилртути (ФРН) – это органическое производное используется в качестве консерванта в многодозовых контейнерах парентеральных инъекций и глазных капель. Нитрат фенилртути является полезным консервантом и также используется в качестве спермицида. Растворы фенилртутных нитратов при комнатной температуре неэффективны против бактериальных спор, но обладают противогрибковой активностью и используются при хранении бумаги, текстиля и кожи. Комплекс ацетата фенилртути (ФРА) с динафтилметансульфонатом натрия, обладает более высокой активностью и характеризуется более интенсивным проникновением в кожу [289; 297].

Ацетат фенилртути (ФРА) имеет такую же активность, свойства и применение, как и ФРН, и применяется в качестве консерванта в фармацевтической и других областях [289].

Оксид олова(IV) в одно время использовался в качестве перорального лекарственного средства для лечения поверхностных стафилококковых инфекций. В последнее время органические производные олова используется в качестве фунгицидов и бактерицидов, а также как текстильный и древесный консервант.

Эти соединения используются в качестве биоцидов в бумажной и лакокрасочной промышленности, а в сельском хозяйстве - как фунгициды и пестициды [423; 456].

Исследовано использование титана в качестве противомикробного средства в полости рта. Гранулы титана проявляли очень низкую антибактериальную активность. Но титан нашел применение в медицинских имплантатах, включая имплантаты зубов. Титановые поверхности, обработанные ионами фтора, демонстрировали антимикробную активность, но это объясняется не только возможным высвобождением ионов фтора, а возможно, образованием комплекса титанфторида на поверхности имплантата [347; 531].

Анилиды, общей формулы $C_6H_5-NH-COR$, салициланилид ($R=C_6H_4OH$) и дифенилмочевина (карбанилид) ($R=C_6H_5 \cdot NH$), являются основой для противомикробных средств [11; 122].

Салициланилид использовался в виде мази для лечения стригущего лишая, но концентрации выше 5% не использовались в лекарственных препаратах из-за раздражения кожи. Фотосенсибилизирующие свойства его производных ограничивают их использование в любой отрасли, где они могут контактировать с кожей человека. Кроме того, многие работники, которые исследовали гермицидные мыла, то есть обычные мыльные продукты с добавлением галогенированного салициланилида, карбанилида или, в этом случае, фенольных соединений, таких как гексахлорфен или ДХМК, сомневались в их необходимости, хотя некоторые могут действовать как дезодоранты, разрушая микроорганизмы кожи, которые реагируют с потом, вызывая запах тела [433].

В результате обширного исследования, 3,4,4'-трихлоркарбанилид (трихлокарбан), стал одним из наиболее мощных из семейства карбанилидов (дифенилмочевины), обладающих биоцидными свойствами. Трихлокарбан ингибирует рост многих грамположительных бактерий, включая MRSA и ванкомицинрезистентный энтерококк (VRE), но не активен против грамотрицательных микроорганизмов. Как и салициланилиды, он не нашел применения в средствах, которые могут контактировать с кожей человека,

несмотря на то, что был высоко оценен как активный ингредиент некоторых дезинфицирующих мыл [499].

Способ действия салициланилидов и карбанилидов (дифенилмочевины) подробно изучено. Эти соединения обязаны своим бактериостатическим действием способностью разряжать часть протонной движущей силы, тем самым ингибируя зависящие от нее процессы, то есть активный транспорт и энергетический обмен [434; 433].

Известно большое число химических соединений различных классов, являющихся полезными консервантами.

2,6-диметил-1,3-диоксан-4-илацетат (диметоксан) находит применение в качестве консерванта для эмульсий, промышленных процессов на водной основе, эмульсионных красок [13].

5-Бром-2,4-диметил-5-нитро-1,3-диоксан-6-илацетат (бронидокс) используется в качестве консерванта для туалетных принадлежностей. Он активен против бактерий, грибов и *Pseudomonas* [433].

Имидазолины введены в практику в качестве сельскохозяйственных фунгицидов еще в 1946 году. Другие производные, содержащие имидазольный цикл, недавно нашли успешное применение в качестве консервантов. Два из них являются производными 2,4-диоксотетрагидроимидазола (имидазолидонов) [433; 442; 352].

В 1970 году было описано семейство имидазолидинилмочевины для использования в качестве консервантов. Один из них, под названием *N,N'*-метилден-бис-[5'[1-гидроксиметил]-2,5-диоксо-4-имидазолдинил-мочевина] более активен против бактерий, чем грибов. Большинство микробиологических данных основаны на пробных тестах в косметических препаратах, которые имеют большое значение для косметической микробиологии [198; 30].

Диазолидинилмочевина показывает антибактериальную активность широкого спектра действия с некоторой активностью против плесневых грибов. Он в два раза активнее, чем имидазолидинилмочевина и часто используется в

сочетании с метил- и пропилпарабенами для обеспечения дополнительной активности против плесени [433].

В качестве противомикробных консервантов используются ряд изотиазолонов, которые находят применение в различных отраслях промышленности [389].

Представителями изотиазолинов являются хлор-2-метил-4-изотиазолин-3-он (ХМИТ) и 2-метил-4-изотиазолин-3-он (МИТ). Смесь этих двух производных изотиазолина используется в качестве консерванта для эмульсионных красок, активна в концентрациях 2,25-9 мкг/мл против широкого спектра бактерий, грибов и бактерий рода *Pseudomonas*, а также является мощным альгистатом. С августа 2001 года в ЕС любой продукт, содержащий ХМИТ/МИТ в соотношении 3:1, превышающий 15×10^{-6} должен содержать соответствующее предупреждение об опасности [247].

1,2-Бензизотиазолин-3-он (БИТ) доступен в продаже в различных составах и рекомендуется в качестве консерванта для промышленных эмульсий, клеящих веществ, полиролей, клея, бытовых и бумажных изделий. Он обладает низкой токсичностью для млекопитающих, но недопустим в качестве консерванта для косметики. При концентрациях, ингибирующих рост, БИТ мало влияет на целостность мембраны *S.aureus*, но значительно ингибирует активный транспорт и окисление глюкозы, а также оказывает заметное влияние на тиолсодержащие ферменты [237; 235; 319].

Уротропин (гексаметилентетрамин, гексамин) использовался в качестве антисептика мочевыводящих путей с 1894 года. Его активность объясняется медленным высвобождением формальдегида [433; 134].

Эфирные масла использовались эмпирически на протяжении всей истории в качестве консервантов и не теряют привлекательность как естественные консерванты по настоящее время. Масло *Melaleuca alternifolia* (чайное дерево) все чаще включается в потребительские товары в качестве противомикробного агента. Исследования показали, что масло чайного дерева является эффективным противомикробным средством, демонстрирующим активность против

устойчивого к метициллину *S.aureus*, дрожжей и вируса простого герпеса [360; 213; 373; 261; 310]. Тимол и карвакрол (изомер тимола) считаются активным ингредиентом нескольких эфирных масел и встречаются в растениях, таких как тимьян и орегано. Эфирные масла орегано и тимьяна являются сильными микробицидами для грамположительных и грамотрицательных бактерий и грибов и очень эффективны против *E.coli* O157: H7 [384; 209; 390; 191]. Карвакрол проявляет антимикробную активность, дестабилизируя цитоплазматическую мембрану и действуя как протонный обменник [486]. Тимол также нашел применение в качестве активного ингредиента в средствах для ополаскивания рта. Антисептик Листерин, который содержит эфирные масла тимола, ментола и эвкалипта демонстрирует антимикробную активность против микроорганизмов зубной бляшки [268; 269; 394]. Было также показано, что эфирные масла действуют синергически с другими противомикробными агентами и физическими условиями [323; 452; 528]. Были выделены и исследованы другие эфирные масла с различной степенью антимикробной активности [323; 468; 390; 191].

Газовая стерилизация – это использование газов в качестве стерилизующих или дезинфицирующих средств. Описано использование газообразного формальдегида при дезинфекции больничных постельных принадлежностей и одеял и в сочетании с низкотемпературным паром для дезинфекции теплочувствительного материала [214; 357]. Окись этилена обладает бактерицидной, микобактериоцидной, спорицидной, фунгицидной и вирицидной активностью. Используются также другие газы для газовой стерилизации – пропилен оксид, β -пропиолактон, озон, метил бромид и глицидальдегид [433].

Озон (O_3), является аллотропной формой кислорода. Он обладает мощными окислительными свойствами, препятствует бактериальному росту и бактерицидным, вирицидным и спорицидным, хотя споры в 10-15 раз более устойчивы, чем бактерии, не образующие споры [292; 413]. Газообразный озон реагирует с аминокислотами, РНК и ДНК. Он химически нестабилен в воде, но активность сохраняется из-за генерации свободных радикалов, включая НО. Синергические эффекты были показаны при одновременном использовании

ультразвука и ионизированных отрицательно заряженных частиц. Использование озона возможно для дезинфекции пищевых продуктов [327; 264].

Углекислый газ в безалкогольных напитках препятствует развитию различных типов бактерий. Рост психротропных слизистых бактерий заметно ингибируется углекислым газом в атмосфере [230; 433].

1.2. Природные, химически модифицированные, синтетические противомикробные и противогрибковые химиотерапевтические препараты на основе различных классов соединений, используемые для устранения микроорганизмов на поверхностях и в организме человека

В настоящее время в качестве препаратов для антибиотикотерапии используются следующие группы и отдельные противомикробные средства:

- препараты, подавляющие синтез клеточной стенки (пенициллины, цефалоспорины, карбопенемы, монобактамы, гликопептиды, циклосерин, фосфомицин);
- препараты, нарушающие функции цитоплазматической мембраны (полимиксины, полиеновые антибиотики, даптомицин, градимицидин);
- препараты, ингибирующие синтез белка (аминогликозиды, тетрациклины, макролиды, линкозамиды, левомицетин (хлорамфеникол), азалиды, оксазолидиноны (линезолид), хинупристин и дальфопристин, мупироцин, нитроимидазолы, спектиномицин, фузидиевая кислота);
- препараты, ингибирующие синтез нуклеиновых кислот (анзамицины, хинолоны/фторхинолоны, нитрофураны, нитроксолин, диоксидин);
- препараты, нарушающие синтез азотистых оснований и аминокислот (противоопухолевые (актиномицин D, оливомицин и др.) и противовирусные препараты);
- препараты, ингибирующие промежуточные пути метаболизма (сульфаниламиды и ко-тримоксазол) [98; 10; 398; 514].

Существование микробиологических патогенов известно в течение многих лет [375; 376; 397], поэтому на протяжении всей истории продолжалась борьба с множеством уже существующих изученных и вновь исследуемых патогенных микроорганизмов, которые вызывают инфекционные заболевания [474; 229; 530]. Открытие антимикробных агентов привело к успешному лечению и устранению инфекций. Ранее смертельные заболевания поддавались лечению у значительного числа пациентов [202; 324]. Разработка противомикробных препаратов для клинического применения наиболее успешна в отношении основных областей микробного обмена веществ: синтеза клеточной стенки, синтеза белка, синтеза РНК, синтеза ДНК и промежуточного метаболизма [303; 314]. Однако открытие антимикробных средств было ознаменовано появлением микробных патогенов, которые устойчивы к противомикробным препаратам, за счет приобретения многочисленных механизмов резистентности, которые позволяют им уклоняться от действия антимикробных агентов. В результате многие микроорганизмы стали устойчивыми практически к любым доступным антимикробным препаратам. Эта проблема становится все более острой в 21 веке, и теперь ясно, что фундаментальное понимание механизмов, которые микробные патогены разворачивают в развитии устойчивости, имеет важное значение для получения новых знаний о способах борьбы с этой проблемой [363; 441; 427]. Пациенты, инфицированные лекарственно-устойчивыми микробными патогенами, чаще других нуждаются в госпитализации и вынуждены длительно пребывать в больнице. Устойчивость микроорганизмов также вынуждает использовать более токсичные или более дорогие альтернативные противомикробные средства [311; 405; 372; 447]. Резистентность к лекарственным средствам представляет собой растущую глобальную угрозу для общественного здравоохранения, которая включает в себя все основные микробные патогены и противомикробные средства [348; 445; 523; 392].

Микробные клетки, как и любой живой организм, растут и делятся, неоднократно увеличивая биомассу, чтобы достичь количеств, необходимых для возникновения инфекционного процесса. Чтобы расти и размножаться,

микроорганизмы должны синтезировать или использовать многие типы биомолекул. Антимикробные агенты препятствуют специфическим процессам, которые необходимы для их роста и/или деления. Противомикробные химиотерапевтические препараты можно классифицировать на основе клеточного компонента или системы, на которые они влияют и в дополнение к тому, индуцируют ли они гибель клеток – бактерицидные или просто ингибируют рост клеток – бактериостатические агенты [333; 439; 494; 487]. Антимикробные препараты действуют путем ориентации на конкретные участки микробов, поэтому они часто классифицируются в соответствии с их основным механизмом биологического действия. Известные механизмы действия антимикробных агентов включают следующие: вмешательство в синтез клеточной стенки, ингибирование синтеза белка, нарушение синтеза нуклеиновых кислот, ингибирование промежуточных метаболических путей и нарушение проницаемости или целостности цитоплазматической мембраны [474; 229; 530].

Клеточная стенка является важной микробной структурой, ответственной за форму клетки. Кроме того, она предотвращает лизис клеток из-за разности внутри- и внеклеточного уровня осмотического давления, а также позволяет закреплять мембранные компоненты и внеклеточные белки, такие как адгезины [290; 344; 276]. Исходя из количества антимикробных препаратов для клинического применения, влияние на синтез бактериальных клеточных стенок является, возможно, основной областью, наиболее широко используемой для антимикробной химиотерапии. Компоненты механизма синтеза клеточной стенки являются привлекательными антимикробными мишенями из-за отсутствия аналогов в биологии человека, тем самым обеспечивая важную для терапии избирательность. Последовательные поздние стадии синтеза клеточной стенки включают цитоплазматический синтез строительных блоков, состоящих из N-ацетилмурамовой кислоты, связанной с N-ацетилглюкозамином и с присоединением боковой цепи пентапептида. Связывание субъединиц пептидогликана с молекулой липида II позволяет осуществлять последующую транслокацию через цитоплазматическую мембрану к наружному или

периплазматическому пространству клетки. Трансгликозилазные ферменты затем собирают субъединицы пептидогликана в линейную основу, катализируя образование гликозидных связей между компонентами N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамина. Линейно связанные субъединицы образуют незрелую структуру пептидогликана. Транспептидазные ферменты затем сшивают пептидные боковые цепи с пентаглициновыми мостиками, расщепляя концевые D-аланины боковой цепи пептида, тем самым создавая зрелый, подобный решетке пептидогликан, который обеспечивает бактериям форму и осмотическую устойчивость [303; 314].

Наиболее часто используемые антимикробные препараты, которые ингибируют биосинтез клеточной стенки – это β -лактамы антибиотики, такие как пенициллины и цефалоспорины [335; 228; 252]. Эти антибиотики, взаимодействуя с бактериальными транспептидазами, эффективно ингибируют формирование клеточной стенки микробных клеток напрямую. Таким образом, β -лактамы в качестве ингибиторов транспептидазы блокируют превращение незрелого пептидогликана в зрелый, поэтому эти ферменты часто называют пенициллинсвязывающими белками (РВР). Они могут это осуществлять за счет стереохимического сходства β -лактамовой части с D-аланил-D-аланин субстратом. В присутствии лекарственного средства этого класса транспептидазы образуют летальный ковалентный пенициллин-ферментный комплекс, который вызывает блокирование нормальной реакции транспептидирования. Это приводит к слабой сшивке пептидогликана, что делает, растущие бактерии, подверженными лизису и гибели [513; 400; 326].

Другим классом антимикробных агентов, которые ингибируют синтез клеточной стенки, являются гликопептиды. Механизм действия (общий для всех представителей класса гликопептидов, включая ванкомицин) представляет собой ингибирование синтеза пептидогликана. Ванкомицин и другие гликопептиды связываются с карбоксильным концевым ацил-D-аланил-D-аланиновым (ацил-D-Ala-D-Ala) остатком пентапептидной части липида II. Это специфическое взаимодействие, которое является сайтом первичного связывания, стерически

препятствует превращению фермента трансгликозилазы для включения дисахарид-пентапептидного мономера в зарождающийся пептидогликан. Это ингибирование синтеза пептидогликана ванкомицином приводит к более медленному ингибированию по сравнению с β -лактами, и его бактерицидная активность не зависит от концентрации. Ванкомицин образует стехиометрический комплекс 1:1 с пептидогликановым предшественником N-ацетилмурамилпентапептидом путем образования водородных связей. Фермент трансгликозилаза, который переносит дисахарид предшественника на растущий гликановый полимер пептидогликана клеточной стенки, ингибируется, по-видимому, из-за стерических требований гликопептидного предшественника пептидогликана. При этом реакции, катализируемые трансгликозилазой и транспептидазой, которые завершают синтез пептидогликана, ригидной клеточной стенки, блокируются [382; 484].

Несколько классов антимикробных агентов действуют путем ингибирования синтеза бактериальных белков (функции рибосом). К ним относятся аминогликозиды, макролиды, тетрациклины, линкозамиды, кетолиды, стрептограммы, оксазолидиноны и хлорамфеникол [362; 418; 409; 210]. Микробный синтез белка направляется рибосомами в сочетании с цитоплазматическими факторами, которые временно связываются с рибосомальными частицами во время фазы инициации, элонгации и терминации. Микробные рибосомы представляют глобулярные частицы с константой седиментации 70S, содержащие две субъединицы с константами седиментации 50S и 30S, которые соединяются на стадии инициации синтеза белка и разделяются на стадии терминации. Антимикробные агенты блокируют различные стадии синтеза бактериальных белков, препятствуя функционированию, как цитоплазматических факторов, так и рибосом. Ингибиторы, которые связываются с 30S-рибосомной субъединицей, в первую очередь вмешиваются в иницирование, хотя некоторые препятствуют взаимодействию мРНК-кодона с антикодоном АА-тРНК, что препятствует его удлинению. Ингибиторы, которые связываются с рибосомной субъединицей 50S

или с факторами элонгации, которые временно связаны с рибосомами на определенных этапах цикла, препятствуют этапам, связанным с процессом элонгации полипептидной цепи [232; 504].

Аминогликозиды действуют путем связывания с конкретными рибосомальными субъединицами. Препараты типа аминогликозидов могут взаимодействовать с различными сайтами связывания на рибосомальных субъединицах 30S, и они уничтожают бактерии, индуцируя образование аберрантных нефункциональных комплексов, а также вызывая неправильное считывание. Спектиномицин представляет собой природное противомикробное соединение ряда аминоциклитов, который тесно связан с аминогликозидами. Он связывается с другим белком на рибосоме и проявляет бактериостатическое действие, а не бактерицидное. Другими агентами, которые взаимодействуют с 30S рибосомами, являются тетрациклины. Эти препараты, по-видимому, ингибируют связывание аминоацил-тРНК на сайте А бактериальной рибосомы. При этом связывание тетрациклинов кратковременно, поэтому они являются бактериостатическими. Тем не менее, эти соединения ингибируют широкий спектр бактерий, хламидий, микоплазм и являются чрезвычайно эффективными [98; 10; 398; 514].

Существует три важных класса препаратов, которые ингибируют рибосомную субъединицу 50S. Хлорамфеникол является бактериостатическим средством, которое ингибирует рост и размножение как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Он тормозит образование пептидной связи путем взаимодействия с ферментом пептидилтрансферазой на субъединице 50S. Макролиды представляют собой макроциклические соединения, содержащие лактонное кольцо, которые связываются с 50S рибосомами и, по-видимому, нарушают взаимодействие с пептидилтрансферазой или процесс транслокации, а возможно и то, и другое. Наиболее известным макролидом является эритромицин, который ингибирует рост, как грамположительных, так и некоторых грамотрицательных видов микробов, таких как гемофилы, микоплазма, хламидии и легионеллы. Более поздние соединения, такие как азитромицин и

кларитромицин, обладают большей активностью и более широким спектром противомикробного действия, чем эритромицин. Линкозамиды, из которых наиболее важным является клиндамицин, имеют сходные сайты воздействия в микроорганизмах. Как и макролиды, линкозамиды обычно являются бактериостатическими, блокируя только образование новых полипептидных цепей [98; 10; 398; 514].

Для некоторых классов противомикробных препаратов характерно вмешательство в синтез нуклеиновых кислот. Синтез ДНК, транскрипция мРНК и деление клеток требуют модуляции хромосомной суперспирализации через катализируемые топоизомеразой разрывы и сшивание цепей [333; 439; 494; 487]. Энзимы ДНК-топоизомеразы делятся на два типа, I и II, в зависимости от того, катализируют ли они реакции, связанные с временным разрушением одной (типа I) или обеих (типа II) нитей ДНК [351; 285; 313]. Топоизомеразы контролируют постоянство ДНК внутри клеток и являются критическими для основных процессов трансляции белка и репликации клеток [259; 381; 177]. ДНК-гираза, топоизомераза ДНК типа II, представляет собой фермент, который отрицательно спирализует ДНК в присутствии АТФ. Кроме того, этот фермент играет роль в реакции раскручивания и скручивания двухцепочечной ДНК, деспирализует ДНК и также освобождает отрицательно сверхспирализованную ДНК в отсутствие АТФ. В результате фермент жизненно важен для всех клеточных процессов, которые касаются ДНК, а именно репликацию, рекомбинацию и трансформацию. Последние процессы исключительны для прокариотического царства и по существу имеет решающее значение для выживания микроорганизма. Таким образом, ДНК-гираза остается идеальной и привлекательной мишенью для антибактериальных препаратов [218; 274].

Хинолоны являются наиболее успешными противомикробными агентами, нацеленными на ДНК-гирazu. Данные соединения были получены из налидиксовой кислоты, нафтиридона, случайно обнаруженного в качестве побочного продукта при синтезе хлорохина [236; 223; 385; 256]. Хинолоны являются специфическими ингибиторами ДНК-гиразы. Хинолоны блокируют

реакции ДНК-гиразы, такие как суперспирализация и деспирализация, которые требуют раскручивания ДНК и восстановления, в частности, они препятствуют реакции деспирализации, катализируемой ДНК-гиразой, путем взаимодействия с субъединицей α (GyrA) [222; 330; 521]. Хинолоны первого поколения – налидиксовая и оксолиновая кислоты имеют относительно слабую антимикробную активность. Однако синтез фторхинолонов и их модификация в течение нескольких поколений, например, норфлоксацин и ципрофлоксацин (второе поколение), левофлоксацин (третье поколение) и моксифлоксацин и гемифлоксацин (четвертое поколение), привели к появлению ряда мощных противомикробных агентов [236; 223; 385; 256]. Помимо топоизомераз типа II, большинство бактериальных патогенов обладают дополнительной весьма важной топоизомеразой I (Топо I). Данный фермент структурно и по механизму действия отличается от гиразы и топоизомеразы IV, и как таковая представляет собой привлекательную мишень для открытия новых антибактериальных агентов [259; 381; 177].

Рифамицины ингибируют ДНК-зависимую транскрипцию путем высокоаффинного связывания с β -субъединицей (кодируемой *rpoB*) ДНК-зависимой и активно транскрибирующей РНК-полимеразой. β -Субъединица расположена в канале, который образован комплексом РНК-полимераза-ДНК, из которого возникает вновь синтезированная цепь РНК. Рифамицины уникально действуют на синтез РНК, не позволяя прогрессировать за пределы добавления двух рибонуклеотидов, что объясняется способностью молекулы лекарственного средства стерически ингибировать начинающуюся инициацию нити РНК. Следует отметить, что рифамицины, как полагают, не действуют через блокировку стадии элонгации на уровне синтеза РНК, хотя недавно обнаруженный класс ингибиторов РНК-полимеразы, способен ингибировать элонгацию полипептидной цепи путем аллостерической модификации фермента [333; 439; 494; 487].

Триметоприм и сульфонамиды препятствуют метаболизму фолиевой кислоты в микробной клетке путем конкурентного блокирования биосинтеза

тетрагидрофолата, который действует как носитель одноуглеродных фрагментов и необходим для окончательного синтеза ДНК, РНК и белков клеточной стенки. В отличие от млекопитающих, бактерии и простейшие паразиты обычно не имеют транспортной системы для приема готовой фолиевой кислоты из окружающей среды. Большинство этих организмов должны сами синтезировать фолиевую кислоту, хотя некоторые из них способны использовать экзогенный тимидин, обходя необходимость метаболизма фолиевой кислоты [98; 10; 398].

Сульфонамиды конкурентно ингибируют превращение птеридина и *p*-аминобензойной кислоты в дигидрофолиевую кислоту посредством фермента птеридиновой синтетазы. Сульфонамиды имеют большее сродство, чем *p*-аминобензойная кислота к птеридиновой синтетазе. Триметоприм обладает огромным сродством к бактериальной дигидрофолатредуктазе (от 10000 до 100 000 раз выше, чем к ферменту млекопитающих); связываясь с этим ферментом, он ингибирует синтез тетрагидрофолата [98; 10; 398; 514].

Биологические мембраны состоят в основном из липидов, белков и липопротеинов. Цитоплазматическая мембрана действует как диффузионный барьер для воды, ионов, питательных веществ и содержит почти все транспортные системы. Большинство научных работников считают, что мембраны представляют собой липидную матрицу с глобулярными белками, случайно распределенными для проникновения через липидный бислой. Ряд противомикробных агентов может вызывать дезорганизацию мембраны. Эти агенты можно разделить на катионные, анионные и нейтральные. Наиболее известными соединениями являются полимиксин В и колистерметат натрия (полимиксин Е) [98; 10; 398; 514].

Цитоплазматическая мембрана является эффективным барьером для молекул многих противомикробных соединений. Способ действия некоторых антимикробных агентов может заключаться в способности некоторых лекарственных средств повышать проницаемость мембраны, облегчая проникновение самих себя и других соединений. Сообщалось, что катионные антибактериальные препараты, такие как полимиксин В, увеличивают

проницаемость внешней мембраны для лизоцима и гидрофобных соединений. Первоначальным механизмом действия этих противомикробных агентов является разрушение структуры наружной мембраны, позволяющее молекулам самих веществ и молекулам других соединений проникать в клетку и ингибировать специфические метаболические процессы [386]. Полимиксин В способен изменять поверхностный заряд, липидный состав и структуру мембран, снижать градиент K^+ на цитоплазматической мембране, деполаризовать цитоплазматическую мембрану. Проницаемость внешней мембраны для молекул липофильных соединений является одним из основных факторов, контролирующих бактериальную чувствительность к полимиксину В. Поскольку молекулы полимиксина В являются более объемными, чем неорганические двухвалентные катионы, которые он вытесняет, порядок упаковки липополисахарида (ЛПС) изменяется в его присутствии. Это приводит к повышенной проницаемости внешней мембраны для различных молекул, а также способствует усвоению самого полимиксина В («самозапускающееся» поглощение) [337].

1.3. Механизмы развития резистентности к противомикробным агентам

Устойчивость к противомикробным препаратам стала важной проблемой в борьбе со многими заболеваниями и, несомненно, заслуживает научного вмешательства для принятия некоторых мер контроля [459; 48]. Микробы известны своей универсальностью в отношении лекарств, однако они имеют ограниченное число механизмов приобретенной противомикробной резистентности [311; 405; 372; 447]. Главным механизмом выживания, находящейся под угрозой гибели микробной популяции, является генетическая мутация, экспрессия скрытых генов резистентности и приобретение генов с резистентными детерминантами [238; 270]. Микробиологические патогены развили генетические и биохимические способы противодействия противомикробным агентам. Патогенные микробы могут иметь врожденную или

приобретенную резистентность к одному или нескольким классам противомикробных агентов. Основными генетическими механизмами, приводящими к резистентности к противомикробным препаратам, являются генетические мутации (точечные мутации, крупные делеции или транслокации), экспрессия скрытого резистентного гена и получение генов или фрагментов ДНК с помощью резистентных детерминант. Некоторые из генов наследуются, некоторые возникают через случайные мутации в микробной ДНК, а некоторые из них импортируются из других микроорганизмов. Эти генетические изменения кодируют изменения в связывающих белках, рибосомах, мембранной структуре или инактивирующих ферментах. После того, как патогены получают гены устойчивости для защиты от различных противомикробных агентов, они способны реализовывать несколько биохимических механизмов резистентности [279; 322]. Микробы биохимически противостоят антибактериальным агентам, инактивируя препараты с помощью β -лактамаз, ацетилаз, аденилаз и фосфорилаз, за счет сокращения доступа для лекарственных средств в силу изменения мембранных характеристик, изменения мишени действия, чтобы противомикробные средства больше не могли связываться с ней, путем формирования обходных путей метаболизма и развития невосприимчивости [364; 440; 449].

Взаимодействие между противомикробным агентом и молекулой-мишенью очень специфично, поэтому даже небольшие изменения в молекуле-мишени могут влиять на связывание антибиотика с мишенью [279; 322]. Антимикробные агенты действуют на мишени, которые присутствуют в микробных клетках, но достаточно различаются в отношении клеток млекопитающих, чтобы обеспечить избирательное ингибирование бактериальных аналогов. Из-за жизненно важных клеточных функций мишеней микроорганизмы не могут обойти антимикробное действие, полностью прекращая их синтез. Однако микробы способны приобретать некоторые мутационные изменения в мишени, которые снижают восприимчивость к ингибирующему действию лекарственных средств, сохраняя при этом их клеточную функцию [341; 322; 242].

Устойчивость к β -лактамам противомикробным агентам у *S.pneumoniae* обусловлена развитием пенициллинсвязывающих белков (PBPs) со сниженной аффинностью к препаратам. Устойчивость к цефалоспорином третьего поколения обусловлена наличием измененных форм PBP1a и 2х, тогда как устойчивость к пенициллину включает также изменения в PBP2b [287; 396; 244; 380; 448; 334; 529]. Измененные PBP возникают в результате рекомбинационных процессов между генами PBP *S.pneumoniae* и генами PBP близкородственных стрептококковых видов и распространяются путем трансформации [234; 455; 444].

Neisseria gonorrhoeae имеет четыре PBP, обозначенные PBP 1, 2, 3 и 4. Из них только PBP1 и 2 необходимы для жизнеспособности клеток и являются потенциальными мишенями для уничтожения *N.gonorrhoeae* антибиотиками. Поскольку пенициллин имеет приблизительно в 10 раз более высокую скорость ацилирования PBP2, чем PBP1, он убивает *N.gonorrhoeae* в типичных минимальных ингибирующих концентрациях путем инактивации PBP2. Пенициллин-резистентные штаммы *N.gonorrhoeae* способны передавать свои резистентные гены восприимчивым штаммам посредством трансформации и гомологичной рекомбинации. Восприимчивые штаммы *N.gonorrhoeae* становятся устойчивыми к пенициллину, приобретая множественные гены устойчивости поэтапно. Трансформация высокоуровневой резистентности к пенициллину опосредуется геном *penA*, кодируя измененные формы PBP2, которые в 5-10 раз уменьшают скорость их ацилирования пенициллином [464; 254; 480; 506].

Причиной устойчивости к гликопептидным антибактериальным агентам у *E.faecium* и *E.faecalis* является результатом получения одного из двух родственных кластеров генов, известных как VanA и VanB. Эти кластеры генов кодируют ферменты, которые продуцируют модифицированный пептидогликановый предшественник, заканчивающийся D-Аланил-D-лактатом (D-Ala-D-Lac) вместо D-Ala-D-Ala [208; 199; 304]. Гликопептиды обладают более низким сродством к D-Ala-D-Lac, чем к D-Ala-D-Ala [239; 224; 415]. Низкоаффинное взаимодействие гликопептидов с D-Ala-D-Lac происходит из-за

изменения структуры межмолекулярного водородного связывания, ответственного за высокоаффинный контакт между лекарственным средством и его субстратом [515; 422; 294; 253].

До сих пор рибосомальное метилирование остается наиболее распространенным способом резистентности к макролидам и линкозамидам. В патогенных организмах белки Erm диметилируют один аденин в образующейся 23S рРНК, которая является частью большой (50S) рибосомальной субъединицы [509; 488; 307; 496]. Остаток A2058 расположен в консервативной области домена V рибосомальной РНК 23S, которая играет ключевую роль в взаимодействии с противомикробными препаратами, такими как макролиды, линкозамиды и стрептограмины В. Вследствие метилирования связывание эритромицина с его мишенью нарушается. Перекрывающиеся сайты взаимодействия макролидов, линкозамидов и стрептограминов В в 23S рРНК объясняют перекрестную резистентность к трем классам лекарств. Широкий спектр микробных патогенов, которые являются мишенями для макролидов и линкозамидов, включая грамположительные виды, спирохеты и анаэробы, экспрессируют Erm метилметилазы. До настоящего времени зарегистрировано около 40 Erm генов [421; 307; 338].

Механизм резистентности могут представлять собой модификацию двух ферментов: ДНК-гиразы (также известной как топоизомераза II) (гены *gyrA* и *gyrB*) [331; 248; 322] и топоизомеразы IV (*parC* и *parE*). Мутации в генах *gyrA* и *parC* возникают вследствие нарушений репликации и хинолоны (фторхинолоны) не могут связываться с мишенью действия. Наиболее распространенная мутация *gyrA E.coli* вызывает снижение сродства комплекса модифицированных ДНК к лекарственным средствам, поэтому требуются более высокие концентрации химиопрепаратов. Хинолоны (ципрофлоксацин) связываются с субъединицей А ДНК-гиразы. Обычно устойчивость к хинолонам связана с мутациями в хромосомах, но сообщалось о резистентности к ним, связанной с плазмидой и точечными мутациями в генах *gyrA* и *parC* [279; 322].

В отличие от других механизмов, инактивация противомикробных агентов формирует устойчивость к лекарственным средствам с определенной химической структурой. Основные ферменты, которые инактивируют противомикробные агенты – это β -лактамазы, ферменты, модифицирующие аминогликозиды и хлорамфениколацетилтрансферазы [279; 322].

β -Лактамазы являются широко распространенными ферментами, которые классифицируются с использованием двух основных классификационных систем Ambler и Bush-Jacoby-Medeiros [180; 471; 512; 502; 48]. Известно около 300 различных β -лактамаз. Наиболее клинически значимую устойчивость имеют грамотрицательные организмы [510], она кодируется в хромосомах и плазмидах. Гены, которые кодируют β -лактамазы, переносятся транспозонами, но также они могут находиться в составе интегронов [312; 217; 184]. β -Лактамазы катализируют гидролиз почти всех β -лактамов, которые имеют сложноэфирную и амидную связь, например, пенициллины, цефалоспорины, монобактамы и карбапенемы. Сериновые β -лактамазы и цефалоспориназы (AmpC) найдены у *Enterobacter spp.* и *P.aeruginosa*, пенициллазы у *S.aureus*. Металло- β -лактамазы (MBL), обнаруженные у *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *E.coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter spp.* играют ту же роль, что и серин- β -лактамазы, и отвечают за устойчивость к имипенему, цефалоспоринов нового поколения и пенициллинам. Металло- β -лактамазы устойчивы к ингибиторам β -лактамаз, но чувствительны к азтреонаму. Специфические ферменты *A.baumannii* карбапенем-гидролизующие оксациллиназы (ОХА), которые имеют низкую каталитическую эффективность и одновременно с делецией поринов и другими механизмами устойчивости к антибиотикам, могут вызывать высокую устойчивость к карбапенемам [476; 336; 349; 420]. Резистентность *K.pneumoniae* за счет карбапенамаз (KPC-1) к имипенему, меропенему, амоксициллин/клавуланату, пиперациллин/тазобактаму, цефтазидиму, азтреонаму и цефтриаксону связано с неконъюгативным кодируемым плазмидой *bla* геном [192; 318].

Широкий спектр β -лактамаз (ESBL)-TEM, SHV, OXA, PER, VEB-1, BES-1, GES, IBC, SFO и CTX главным образом кодируется большими плазмидами. Они

могут переноситься двумя плазмидами или путем введения транспозонов. ESBL устойчивы к пенициллинам (кроме темоциллина), оксиминоцефалоспорином третьего поколения (например, цефтазидиму, цефотоксиму, цефтриаксону), азтреонаму, цефамандолу, цефоперазону, но они чувствительны к метоксицефалоспорином, например, цефамицином и карбапенемам, и могут ингибироваться ингибиторами β -лактамаз, например, клавулановой кислотой, сульбактамом или тазобактамом [476; 336; 349; 420; 48]. Штаммы, продуцирующие ESBL, обычно устойчивы к хинолонам, но их устойчивость зависит не от множественных резистентных плазмид, а от мутаций в генах *gyrA* и *parC*. Такие штаммы встречаются среди *E.coli*, *K.pneumoniae* и *P.mirabilis* [257; 215]. Число известных ESBL достигает 200 [286; 226; 258]. Гидролиз противомикробных препаратов может осуществляться другими ферментами, например, эстеразами. Ген *ereB* *E.coli* кодирует эритромицинэстеразу II, которая гидролизует лактонное кольцо эритромицина и олеандомицина. Ген *ereB* распространен в штаммах микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* и отвечает за резистентность к эритромицину и олеандомицину. Кольцеобразные эпоксидазы вызывают устойчивость бактерий к фосфомицину [257; 215].

Группа ферментов, инактивирующих аминогликозиды, хлорамфеникол, стрептограмин, макролиды или рифампицин, относится к классу трансфераз. Инактивация происходит путем связывания аденилильной, фосфорильной или ацетильной групп с периферическими молекулами лекарственного средства. Это достигается в процессе переноса через цитоплазматическую мембрану (со-субстрат АТФ, ацетил-СoА, NAD^+ , UDP-глюкоза или глутатион) [257; 215]. Аминогликозиды нейтрализуются специфическими ферментами: фосфорилтрансферазами (APHs), нуклеотидилтрансферазами или аденилилтрансферазами (ANT) и ацетилтрансферазами (AACs). Эти модифицирующие аминогликозиды ферменты (AME) уменьшают сродство модифицированной молекулы, препятствуют связыванию с 30S рибосомной субъединицей и обеспечивают расширенный спектр устойчивости к аминогликозидам и фторхинолонам [467; 428; 176; 181]. AME идентифицированы

в штаммах *S.aureus*, *E.faecalis* и *S.pneumoniae*. Предположительно, они эволюционировали от актиномицетов (*Streptomyces spp.* и *Micromonospora spp.*), которые продуцируют АМЕ. Большинство АМЕ передаются транспозонами [358; 291; 368].

Грамположительные, грамотрицательные бактерии и некоторые штаммы *H.influenzae* устойчивы к хлорамфениколу, и у них есть фермент хлорамфениколтрансацилаза, который катализирует реакцию ацетилирования гидроксильных групп хлорамфеникола, хотя и модифицированный хлорамфеникол способен связываться с субъединицей 50S рибосомы должным образом [479; 267; 300; 322; 410].

Реакции окисления и восстановления используются патогенными организмами в качестве механизма сопротивления противомикробным препаратам. *Streptomyces virginiae* продуцирует антибиотик виргинамицин М1 и защищает себя от своих собственных противомикробных агентов путем замены кетонной группы на остаток спирта в положении 16 [257; 215].

Механизм действия группы антибиотиков, включающих макролиды, линкозамиды и стрептограмины В, заключается в блокировании синтеза белка у бактерий путем связывания с 50S рибосомальной субъединицей [492; 298; 322; 404]. Устойчивость к этим лекарственным средствам называется резистентностью типа MLS(B) и встречается в широком диапазоне грамположительных и грамотрицательных бактерий [509; 488; 307; 496]. Сопротивление является результатом посттранскрипционной модификации компонента 23S рРНК 50S-рибосомальной субъединицы, включающей метилирование или диметилирование основных адениновых оснований в функциональной области пептидилтрансферазы. Например, в *E.coli* основание A2058 23S рРНК является мишенью для метилирования. Реакция метилирования катализируется аденин-специфическими N-метилтрансферазами, кодируемыми специфическим классом генов Emr (erythromycin ribosome methylation), присутствующими у широкого спектра микроорганизмов и часто плазмидсодержащих. Мутации в 23S рРНК, близкие к местам метилирования, также могут быть связаны с резистентностью к

макролидам в ряде организмов [491; 325; 503; 438; 200; 215]. В дополнение к множественным мутациям в 23S рРНК, изменения в белках L4 и L22 субъединицы 50S были обнаружены у макролидустойчивых штаммов *S.pneumoniae* [417; 511; 277].

Наружная мембрана грамотрицательных микроорганизмов содержит внутренний слой, который содержит фосфолипиды и наружный слой, который включает липид А. Такая композиция снижает поглощение лекарственного средства клеткой и перенос через наружную мембрану (через пориновые белки, например, *OmpF* в *E.coli* и *OprD* у *P.aeruginosa*). Молекулы лекарственного средства могут поступать в клетку с помощью таких механизмов, как диффузия через порины, диффузия через двухслойную мембрану и самопроизвольное поглощение. Приобретенная устойчивость ко всем классам противомикробных препаратов у *P.aeruginosa* обусловлена низкой проницаемостью наружной мембраны. Малые гидрофильные молекулы (β -лактамы и хинолоны) могут преодолевать внешнюю мембрану только через порины. Аминогликозиды и колистин не могут проникать в клетку через порины, поэтому самопроизвольное поглощение в клетке инициируется связыванием с липополисахаридами внешней стороны наружной мембраны [342; 457; 437; 534; 176]. В результате приобретает резистентность высокой степени почти ко всем аминогликозидам (особенно, к тобрамицину, нетилмицину и гентамицину) [265; 195].

Порины микробов для обратного оттока представляют собой энергозависимые транспортеры, которые выводят токсичные соединения, включая противомикробные препараты, и представляют один из основных механизмов, с помощью которых микробные патогены противостоят различным классам противомикробных агентов [290; 344; 276]. Системы оттока состоят из трех белковых компонентов, энергетически-зависимого насоса, расположенного в цитоплазматической мембране, внешних поринов мембраны и связывающего белка, который соединяет первые два мембранных компонента вместе [391; 299; 522; 283]. Насосы оттока могут быть специфичными для определенных противомикробных препаратов или могут быть способны прокачивать широкий

спектр несвязанных агентов, например, макролиды, тетрациклины и фторхинолоны и, таким образом, значительно способствуют множественной лекарственной устойчивости (MDR – multidrug resistance) [279; 322]. Активный отток лекарств из клетки является одним из распространенных механизмов устойчивости к противомикробным препаратам у бактерий, причем устойчивость развивается тогда, когда скорость оттока лекарственного средства через мембрану превышает уровень притока лекарственного средства, бактериальные геномы кодируют несколько, связанных с мембраной, систем множественного оттока. Эти системы обычно находятся под контролем сложной регуляторной сети, которая в ответ на присутствие препаратов и других стрессовых молекул увеличивает общую активность оттока и уменьшает объем притока [369; 414]. Микробные патогены, устойчивые к тетрациклинам, часто обнаруживают увеличение количества мембранных белков или насосов оттока, которые используются в качестве экспорта антимикробных агентов из микробной клетки. Для выведения токсичных соединений из цитоплазмы и периплазмы *P.aeruginosa* использует более четырех мощных MDR насосов для оттока. MexV-MexW-OprM MDR мембранные насосы отвечают за устойчивость к фторхинолонам, тетрациклинам, хлорамфениколу, эритромицину. Повышенная экспрессия эффлюксных насосов MexAB-OprM приводит к необходимости использования более высоких ингибирующих концентраций пенициллинов, цефалоспоринов широкого спектра действия, хлорамфеникола, фторхинолонов, макролидов, новобиоцина, сульфонамидов, тетрациклинов и триметоприма [279; 322].

Исходя и выше сказанного, необходимо осуществлять контроль и профилактику возникновения и распространения микробной резистентности. Контроль устойчивости микробов к антимикробным агентам требует многогранного подхода. Существенными компонентами данного подхода должны быть: сокращение неадекватного назначения противомикробных препаратов не только для людей, но и для животных, ограничение в использовании консервантов в пищевой промышленности, адекватное использование дезинфектантов и антисептиков в сельском хозяйстве и промышленности, борьба

с распространением резистентных организмов за счет усиления инфекционного контроля и гигиены окружающей среды и определение тенденций распространения устойчивости посредством постоянного наблюдения. Этот подход идеально подходит для классической парадигмы, основанной на ошибках. Распространение антибиотиков считается основным фактором возникновения и распространения противомикробной резистентности. Многие факторы приводят к неадекватному назначению лекарств в антимикробной практике, включая ожидания и требования пациента, желание врача максимально эффективно проводить лечение независимо от стоимости или последующих побочных эффектов, неспособность рассмотреть альтернативные методы лечения, неправильная интерпретация диагностических лабораторных исследований, недостаточность знаний врача и неэффективный менеджмент качества, медико-правовые соображения и убеждение, что более новые и дорогостоящие препараты представляют собой наиболее эффективное лечение инфекционных заболеваний [238; 270]. Поэтому, в настоящее время необходимо уделять особое внимание надлежащему выбору и срокам применения противомикробных препаратов в качестве основного вектора в снижении развития противомикробной резистентности. Правильная санитарно-гигиеническая практика поможет снизить возникновение в лечебных учреждениях лекарственно-устойчивых микробных патогенов и задержит появление таких видов в окружающей среде. Санитарно-эпидемиологические службы и медицинские учреждения должны постоянно следить за появлением лекарственной устойчивости в стационарах и за их пределами [61; 86; 103]. Поиск и разработка новых противомикробных средств, также один из основополагающих принципов преодоления устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

Таким образом, проблема резистентности к противомикробным средствам становится все более актуальной и тревожной в XXI веке [62; 108; 47; 33; 140; 48].

Поэтому 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.».

На кафедре химии ФГБОУ ВО «МГПИ им. Е. Е. Евсевьева» на протяжении 30 лет проводятся научные исследования по разработке методов синтеза и получения трициклических азотосодержащих гетероциклов – пирролохинолонов. Многие используемые в медицине, асептике и дезинфектологии противомикробные препараты представляют собой гетероциклические соединения. И учитывая, что синтезированные и исследуемые в настоящей работе соединения, производные бензаминдолов и пирролохинолонов, являются синтетическими аналогами пирролохинолинхинона, кофермента PQQ, витамина B₁₄, являющегося коферментом в окислительно-восстановительных реакциях в организме млекопитающих, мы сочли необходимым изучить их биологическую активность, с целью получения нового класса синтетических лекарственных средств на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов, способных оказывать противомикробное действие на прокариотические микроорганизмы и научно-практического обоснования безопасного использования выявленной активности индолиламидов и пирролохинолонов для повышения эффективности противомикробной химиотерапии.

Перечень известных проанализированных антимикробных и антигрибковых препаратов в результате проведенной исследовательской работы будет расширен новой группой синтетических соединений анилидного типа на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов. Методики синтеза, физико-химические характеристики, строение, микробиологическое исследование, обсуждение результатов скрининга N-(индолил)амидов, пирролохинолонов изложены в следующих главах настоящей работы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Методика химического эксперимента

Строение, состав и индивидуальность соединений, полученных при выполнении химического эксперимента, доказаны с использованием комплекса современных физико-химических методов: спектроскопия ядерным магнитным резонансом (ЯМР ^1H), ультрафиолетовая спектроскопия (УФ), инфракрасная спектроскопия (ИК), масс-спектрометрия, тонкослойная хроматография (ТСХ), элементный анализ. Полные результаты этих исследований обсуждены в научных публикациях, приведенные в списке литературы. Названия енаминам, амидам, пирролохинолонам даны по правилам компьютерной программы ACDLABS IUPAC Name Generator, структурные формулы соединений нарисованы в компьютерной программе ISIS Draw 2,4.

2.1.1. Синтез исходных аминокиндолов

Для получения исходных аминокиндолов используется следующая методика [2]. Например, для синтеза 2-фенил-4-аминокиндол (1) используют раствор, содержащий 0,75 г 2-фенил-4-нитрокиндол в 150 мл абсолютного метанола к которому добавляются 7 мл концентрированного гидразингидрата и каталитическое количество высокоактивного никеля Ренея. Затем реакционная масса нагревается в течение 1-3 ч. После окончания реакции осуществляется хроматографический контроль. После этого горячая смесь отфильтровывается от катализатора, отгоняется метанол до минимального объема и добавляется 100 мл воды. Осадок, выпавший в конечном итоге, отфильтровывается, промывается водой многократно и высушивается на воздухе. 2,3-Диметил-5-аминокиндол (2) получается аналогично из 2,3-диметил-5-нитрокиндол [497]. 1,2,3-Триметил-5-аминокиндол (3) получается аналогично из 1,2,3-триметил-5-нитрокиндол [451]. 2,3,6-Триметил-5-аминокиндол (4) получается аналогично из 2,3,6-триметил-5-

нитроиндола [168]. 1-Метил-2-фенил-5-аминоиндол (**5**) получается аналогично из 1-метил-2-фенил-5-нитроиндола [110]. 6-Метил-2-фенил-5-аминоиндол (**6**) получается аналогично из 6-метил-2-фенил-5-нитроиндола [173]. 1,7-Диметил-2-фенил-5-аминоиндол (**7**) получается аналогично из 1,7-диметил-2-фенил-5-нитроиндола. Очищается перекристаллизацией из бензола [165]. 2,3-Диметил-6-метокси-5-аминоиндол (**16**) получается аналогично из 2,3-диметил-6-метокси-5-нитроиндола [168]. 1,2,3-Триметил-6-метокси-5-аминоиндол (**8**) получается аналогично из 1,2,3-Триметил-6-метокси-5-нитроиндола [162]. 1,2,5-Триметил-6-аминоиндол (**9**) получается аналогично из 1,2,5-триметил-6-нитроиндола [166]. 1,5-Диметил-2-фенил-6-аминоиндол (**10**) получается аналогично из 1,5-диметил-2-фенил-6-нитроиндола [166]. 1,2,3-Триметил-6-аминоиндол (**11**) получается аналогично из 1,2,3-триметил-6-нитроиндола [168]. 5-Метил-2-фенил-6-аминоиндол (**12**) получается аналогично из 5-метил-2-фенил-6-нитроиндола [166]. 1,2,3-Триметил-5-метокси-6-аминоиндол (**13**) получается аналогично из 1,2,3-триметил-5-метокси-6-нитроиндола [82]. 2,3-Диметил-7-аминоиндол (**14**) получается аналогично из 2,3-диметил-7-нитроиндола [162]. 1,2,3-Триметил-7-аминоиндол (**15**). Получают аналогично из 1,2,3-триметил-7-нитроиндола [168].

2.1.2. Синтез индолиламидов, енаминов, пирролохинолинов

3-Оксо-*N*-(2-фенил-1*H*-индол-4-ил)бутанамид (**16-6D**) получают из смеси, содержащей 0,30 г 4-амино-2-фенилиндол и 0,19 г этилового эфира ацетоуксусной кислоты в 200 мл абсолютного бензола в присутствии следов ледяной уксусной кислоты после нагревания в течение 74 ч с насадкой Дина-Старка. По окончании реакции (контроль хроматографический) бензол отгоняют. 4-Гидрокси-8-фенил-4-(трифторметил)-1,3,4,7-тетрагидро-2*H*-пирроло[2,3-*h*]-хинолин-2-он (**18-5D**) получается аналогично из 0,40 г 4-амино-2-фенилиндол и 0,37 г этилового эфира трифторацетоуксусной кислоты, после нагревания в течение 84 ч. 4-Метил-8-фенил-1,7-дигидро-2*H*-пирроло[2,3-*h*]хинолин-2-он (**17-17**) получают из смеси, содержащей 0,02 г 3-оксо-*N*-(2-фенил-1*H*-индол-4-

ил)бутанамида и пятикратного избытка трифторуксусной кислоты после нагревания в течение 1 ч. По окончании реакции (хроматографический контроль) реакционную смесь выливают в 12% водный аммиак со льдом. Выпавший осадок отфильтровывают, многократно промывают водой. Сушат на воздухе [3; 185].

Этиловый эфир (Z)-4,4,4-трифтор-3-[(2,3-диметил-1*H*-индолил-5)амино]-2-бутеновой кислоты (**1c**) и N1-(4,4,4-трифтор-3-оксо-N-(2,3-диметил-1*H*-индол-5-ил)бутанамида (**2c**) (**19-3D**) получают из смеси, содержащей 1,2 г 2,3-диметил-5-аминоиндола и 1,4 г этилового эфира 4,4,4-трифторацетоуксусной кислоты в 300 мл абсолютного бензола в присутствии каталитического количества ледяной уксусной кислоты после кипячения в течение 30 ч с насадкой Дина-Старка. После того, как весь аминокиндол вступил в реакцию (контроль хроматографический), объем реакционной смеси доводят отгонкой бензола до 50 мл. Этиловый эфир (E,Z)-4,4,4-трифтор-3-[(1,2,3-триметил-1*H*-индолил-5)-амино]-2-бутеновой кислоты (**1d**) и N1-(4,4,4-трифтор-3-оксо-N-(1,2,3-триметил-1*H*-индол-5-ил)бутанамида (**2d**) (**20-2D**) получают и выделяют аналогично из 1,14 г 1,2,3-трииметил-5-аминоиндола и 1,2 г трифторацетоуксусного эфира (время кипячения 25 ч) [169].

Этиловый эфир (Z)-4,4,4-трифтор-3-[(2,3,6-триметил-1*H*-индолил-5)-амино]-2-бутеновой кислоты (**1e**) и 4,4,4-трифтор-3-оксо-N-(2,3,6-триметил-1*H*-индол-5-ил)бутанамида (**2e**) (**21-64D**) получают и выделяют аналогично из 0,64 г 2,3,6-трииметил-5-аминоиндола и 0,83 г трифторацетоуксусного эфира (время кипячения 35 ч). По окончании реакции (хроматографический контроль) бензол отгоняется и выделяется 0,18 г смеси енамина (**1e**) амида (**2e**). Полученную смесь кипятят в бензоле. Не растворившийся осадок (амид **2e**) отфильтровывается, промывается кипящим петролейным эфиром и перекристаллизовывается из спирта. Этиловый эфир (E,Z)-4,4,4-трифтор-3-[(1,7-диметил-2-фенил-1*H*-индолил-5)-амино]-2-бутеновой кислоты (**1g**) и N-(1,7-диметил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамида (**2g**) (**24-235D**) получают и выделяют аналогично из 0,47 г 1,7-диметил-2-фенил-5-аминоиндола и 0,38 г трифторацетоуксусного эфира (время кипячения 40 ч). По окончании реакции

(хроматографический контроль) бензол отгоняется и выделяется 0,65 г смеси енамина (**1g**) амида (**2g**). Полученная смесь кипятится в бензоле. Не растворившийся осадок (амид **2g**) отфильтровывается, промывается кипящим петролейным эфиром и перекристаллизовывается из спирта [173; 163].

Этиловый эфир (Z)-4,4,4-трифтор-3-[(1-метил-2-фенил-1*H*-индолил-5)-амино]-2-бутеновой кислоты (**1h**) и *N*-(1-метил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (**2h**) (**22-32D**) получают аналогично из 1,14 г 1-метил-2-фенил-5-аминоиндола и 1,10 г трифторацетоуксусного эфира (время кипячения 50 ч). По окончании реакции (хроматографический контроль) бензол отгоняется и выделяется смесь енамина (**1h**) амида (**2h**). Полученную смесь кипятят в гептане. Не растворившийся осадок (амид **2h**) отфильтровывается и перекристаллизовывается из гептана [172].

Этиловый эфир (Z)-4,4,4-трифтор-3-[(6-метокси-1,2,3-триметил-1*H*-индолил-5)-амино]-2-бутеновой кислоты (**1i**) и 4,4,4-трифтор-*N*-(6-метокси-1,2,3-триметил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (**2i**) (**25-66D**) получают и выделяются аналогично из 0,625 г 6-метокси-1,2,3-триметил-5-аминоиндола и 0,7 г трифторацетоуксусного эфира (время кипячения 25 ч). По окончании реакции (хроматографический контроль) бензол отгоняется и выделяет 0,825 г смеси енамина (**1i**) амида (**2i**). Полученная смесь растворяется в бензоле, амид высаживается добавлением гексана и перекристаллизовывается из гексана [167]. 6-Гидрокси-2,3-диметил-6-(трифторметил)-1,6,7,9-тетрагидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]хинолина-8-он (**32-HD**) получается аналогично из 0,4 г 2,3-триметил-7-аминоиндола и 0,5 г трифторацетоуксусного эфира (время кипячения 5 ч). По окончании реакции (хроматографический контроль) бензол отгоняется и выделяет амид, который перекристаллизовывается из толуола. При температуре плавления >300 °C данный амид превращается в пирролохинолон. 2,3-Диметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8*H*-пирроло [3,2-*h*]хинолин-8-он (**34-1D**) получается из раствора, содержащего 1,34 г (4,51 ммоль) 6-гидрокси-2,3-диметил-6-(трифторметил)-1,6,7,9-тетрагидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]хинолина-8-она в 10 мл трифторуксусной кислоты, в результате нагревания при температуре кипения в

течение 1 ч. По окончании реакции (хроматографический контроль) реакционная смесь выливается в 12% водный аммиак со льдом. Выпавший осадок отфильтровывается, промывается водой и сушится на воздухе, затем перекристаллизовывается из ДМФА. 1,2,3,9-Тетраметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]хинолин-8-он (**36-4D**) получается из раствора, содержащего 0,168 г 2,3-диметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]хинолин-8-она, пятикратного избытка диметилсульфата, гидроксида калия в водном бутаноне, после кипячения до окончания реакции (хроматографический контроль). Реакционная смесь выливается в воду. Выпавший осадок отфильтровывается, промывается водой и сушится на воздухе [161].

Этиловый эфир (*Z*)-4,4,4-трифтор-3-[(6-метил-2-фенил-1*H*-индолил-5)-амино]-2-бутеновой кислоты (**1k**) и 4,4,4-трифтор-*N*-(6-метил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (**2k**) (**23-43D**) получают из 0,81 г 6-метил-2-фенил-5-аминоиндола и 0,82 г трифторацетоуксусного эфира в результате нагревания в бензоле с добавлением каталитических количеств ледяной уксусной кислоты (время кипячения 17 ч). По окончании реакции (хроматографический контроль) бензол отгоняется и выделяется смесь енамина (**1k**) амида (**2k**). При перекристаллизации из бензола выделяет соединение **2k** [378; 110].

N-(1,2,3-триметил-1*H*-6-индолил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид выделяется из смеси, содержащей 0,45 г 1,2,3-триметил-6-аминоиндола и 0,5 г этилового эфира 4,4,4-трифторацетоуксусной кислоты в 200 мл абсолютного бензола в присутствии следов ледяной уксусной кислоты, в процессе нагревания в течение 85 ч с насадкой Дина-Старка. По окончании реакции (контроль хроматографический) бензол отгоняется. Соединение очищается перекристаллизацией из смеси петролейный эфир – бензол. 4,4,4-Трифтор-3-оксо-*N*-(1,2,5-триметил-1*H*-индол-6-ил)бутанамид (**27-243D**) получается из смеси, содержащей 0,35 г 1,2,5-триметил-6-аминоиндола и 0,361 г этилового эфира 4,4,4-трифторацетоуксусной кислоты в 200 мл абсолютного бензола в присутствии следов ледяной уксусной кислоты, при нагревании в течение 75 ч с насадкой Дина-Старка. По окончании реакции (контроль хроматографический) бензол

отгоняется. Соединение очищается перекристаллизацией из смеси петролейный эфир – бензол [82;164].

N-(5-метокси-1,2,3-триметил-1*H*-6-индолил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид получают аналогично из 0,67 г 1,2,3-триметил-5-метокси-6-аминоиндола и 0,61 г этилового эфира 4,4,4-трифторацетоуксусной кислоты, при нагревании в течение 26 ч. Соединение очищается перекристаллизацией из петролейного эфира [164; 524].

9-Гидрокси-5-метил-2-фенил-9-(трифторметил)-1,6,8,9-тетрагидро-пирроло-[2,3-*f*]хинолин-7-он (**30-7D**) выделяют из смеси, содержащей 0,30 г 5-метил-2-фенил-6-аминоиндола (**1**) и 0,37 г этилового эфира трифторацетоуксусной кислоты в 200 мл абсолютного бензола, в присутствии следов ледяной уксусной кислоты, при нагревании в течение 50 ч с насадкой Дина-Старка. По окончании реакции (контроль хроматографический) бензол отгоняется. Полученное вещество очищается промыванием кипящим бензолом. *N*-(1,5-диметил-2-фенил-1*H*-индол-6-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутан-амид (**28-S3**) получается аналогично из 0,30 г 1,5-диметил-2-фенил-6-аминоиндола (**2**) и 0,24 г этилового эфира трифторацетоуксусной кислоты, при нагревании в течение 80 ч [131].

1,2,3-Триметил-5-(трифторметил)-1,8-дигидро-7*H*-пирроло[3,2-*g*]хинолин-7-он (**29-ТФПХ**) получается из раствора, содержащего 0,168 г N1- (1,2,3-триметил-1*H*-6-индолил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид в 3 мл трифторуксусной кислоты, при нагревании в течение 4 ч. Охлажденная реакционная смесь выливается в разбавленный (10-12 %) водный аммиак со льдом, выпавший осадок отфильтровывается и очищается перекристаллизацией из этанола [164].

1-Метил-2-фенил-8-(трифторметил)-1,5-дигидро-6*H*-пирроло-[2,3-*g*]хинолин-6-он (**11**) и 1-метил-2-фенил-3-трифторацетил-8-(трифторметил)-1,5-дигидро-6*H*-пирроло-[2,3-*g*]хинолин-6-он (**21**) получается из 0,292 г *N*-(1-метил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид при нагревании в десятикратном избытке трифторуксусной кислоты. По окончании реакции (хроматографический контроль) реакционную массу выливают в 12% водный аммиак со льдом. Выпавший осадок отфильтровывается, промывается

многократно водой. Полученная смесь веществ **11** и **21** делится в толстом незакрепленном слое оксида алюминия в системе бензол – этилацетат (1:2). 1,5-Диметил-2-фенил-8-(трифторметил)-1,5-дигидро-6*H*-пирроло-[2,3-*g*]хинолин-6-он (**26-39D**) получают из раствора, содержащего 0,356 г 1-метил-2-фенил-8-(трифторметил)-1,5-дигидро-6*H*-пирроло-[2,3-*g*]хинолин-6-она, десятикратного избытка диметилсульфата, гидроксида калия, в результате кипячения до окончания реакции (хроматографический контроль), после чего выливается в воду. Выпавший осадок отфильтровывается, промывается водой и сушится на воздухе [161].

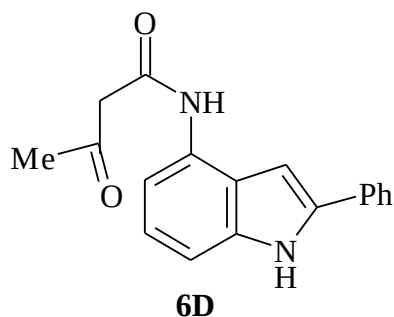
Диэтиловый эфир (2-*Z*)-2-[(5-метокси-1,2,3-триметил-1*H*-индол-6-ил)амино]бутен-2-диовой кислоты получается из смеси, содержащей 0,60 г 1,2,3-триметил-5-метокси-6-аминоиндола и 0,80 г щавелевоуксусного эфира, в результате кипячения в 300 мл абсолютного бензола в присутствии каталитического количества ледяной уксусной кислоты с насадкой Дина-Старка в течение 60 ч. После того, как весь аминоиндол вступает в реакцию (хроматографический контроль), бензол отгоняется. Вещество очищается перекристаллизацией из петролейного эфира. 1,2,3-Триметил-5-метокси-7-этоксикарбонил-6,9-дигидро-1*H*-пирроло[2,3-*f*]хинолин-9-он получается из 0,75 г диэтилового эфира (2-*Z*)-2-[(5-метокси-1,2,3-триметил-1*H*-индол-6-ил)амино]бутен-2-диовой кислоты, в процессе кипячения в дифениле в течение 10 мин. По окончании реакции (хроматографический контроль) еще теплую реакционную массу выливают в петролейный эфир. Выпавший осадок отфильтровывается и многократно промывается горячим петролейным эфиром от дифенила. Вещество очищается перекристаллизацией из этанола [170; 171].

Калиевая соль 7-гидроксикарбонил-1,2,3-триметил-5-метокси-1*H*-пирроло[2,3-*f*]хинолин-9-она (**31-КПХ**) получается из смеси, содержащей 0,15 г 1,2,3-триметил-5-метокси-7-этоксикарбонил-6,9-дигидро-1*H*-пирроло [3,2-*f*]хинолин-9-она в 10 мл этилового спирта, в процессе нагревания до кипения и добавления 0,5 г (0,9 ммоль) гидроксида калия в 1 мл воды. Реакционную смесь оставляют на несколько часов. Выпавший осадок отфильтровывается [41].

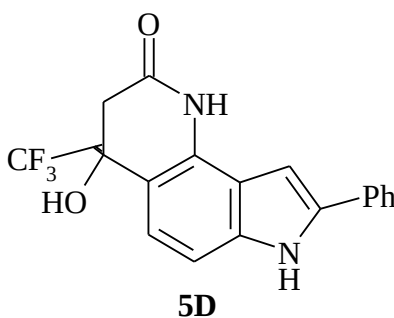
2.1.3. Названия (№-лабораторный шифр) и структура исследуемых соединений

1. Производные замещенного 4-амино-2-фенилиндола:

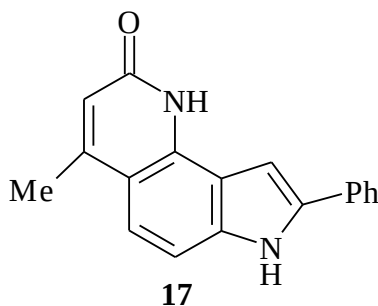
3-оксо-*N*-(2-фенил-1*H*-индол-4-ил)бутанамид (**16-6D**)



4-гидрокси-8-фенил-4-(трифторметил)-1,3,4,7-тетрагидро-2*H*-пирроло[2,3-*h*]хинолин-2-он (**18-5D**)

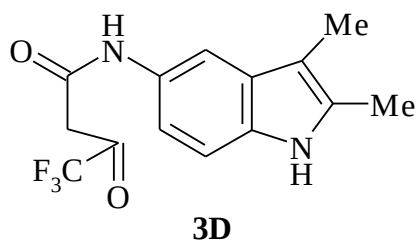


4-метил-8-фенил-1,7-дигидро-2*H*-пирроло[2,3-*h*]хинолин-2-он (**17-17**)

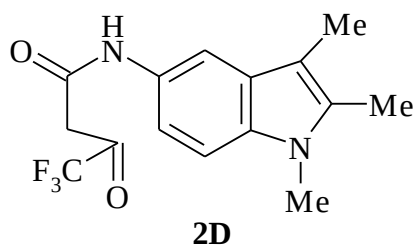


2. Производные замещенных 5-аминоиндолов:

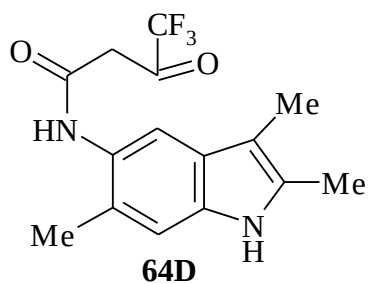
N-(2,3-диметил-1*H*-индол-5-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (**19-3D**)



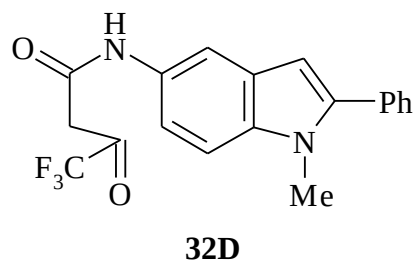
4,4,4-трифтор-3-оксо-*N*-(1,2,3-триметил-1*H*-индол-5-ил)бутанамид (**20-2D**)



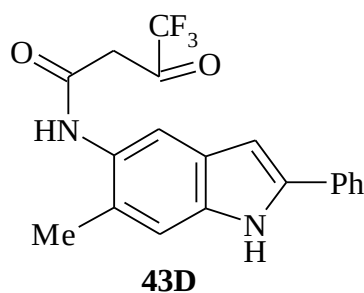
4,4,4-трифтор-*N*-(1-метил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (**21-64D**)



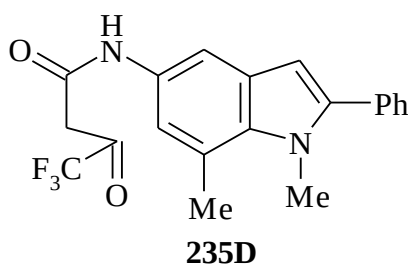
4,4,4-трифтор-3-оксо-*N*-(2,3,6-триметил-1*H*-индол-5-ил)бутанамид (**22-32D**)



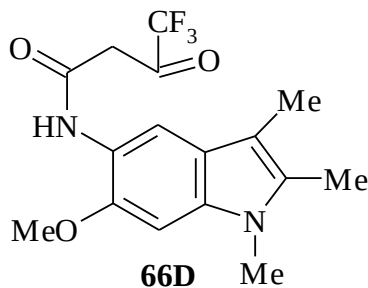
4,4,4-трифтор-*N*-(6-метил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (**23-43D**)



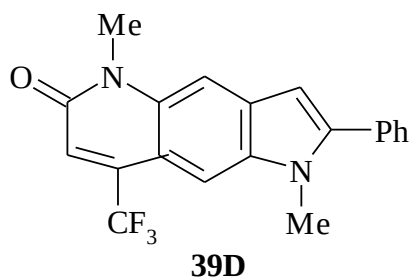
N-(1,7-диметил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (**24-235D**)



4,4,4-трифтор-*N*-(6-метокси-1,2,3-триметил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (**25-66D**)

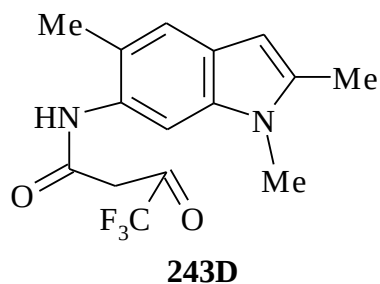


1,5-диметил-2-фенил-8-(трифторметил)-1,5-дигидро-6*H*-пирроло-[2,3-*g*]хинолин-6-он (**26-39D**)

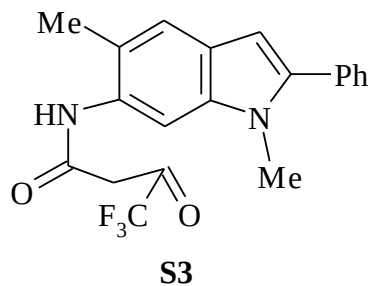


3. Производные замещенных 6-аминоиндолов:

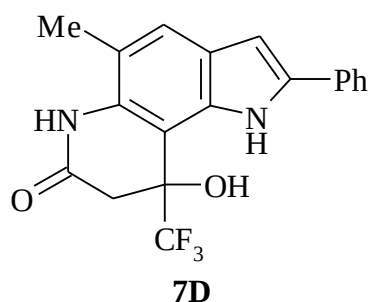
4,4,4-трифтор-3-оксо-*N*-(1,2,5-триметил-1*H*-индол-6-ил)бутанамид (**27-243D**)



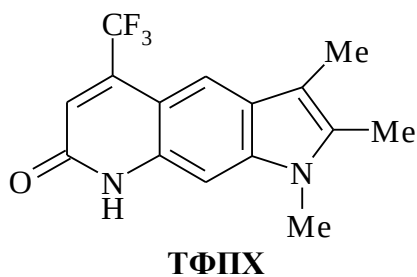
N-(1,5-диметил-2-фенил-1*H*-индол-6-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (**28-S3**)



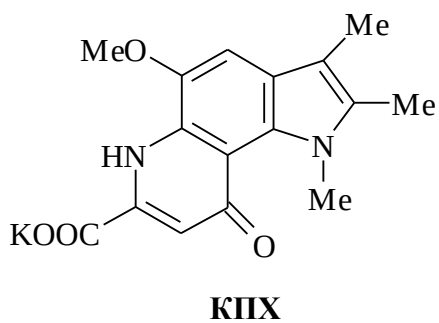
9-гидрокси-5-метил-2-фенил-9-(трифторметил)-1,6,8,9-тетрагидро-7*H*-пирроло[2,3-*f*]хинолин-7-он (**30-7D**)



1,2,3-Триметил-5-(трифторметил)-1,8-дигидро-7*H*-пирроло[3,2-*g*]хинолин-7-он (**19-ТФПХ**)

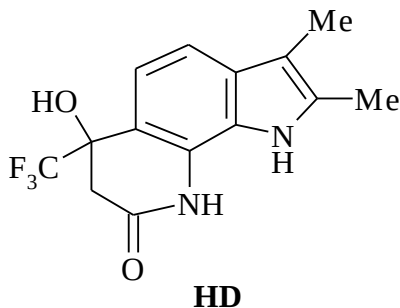


Калиевая соль 5-метокси-1,2,3-триметил-9-оксо-6,9-дигидро-1*H*-пирроло[2,3-*f*]хинолин-7-карбоновой кислоты (**31-КПХ**)

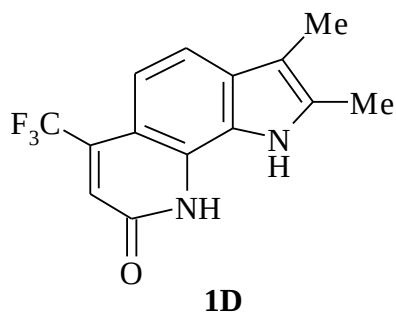


4. Производные замещенных 7-аминоиндолов:

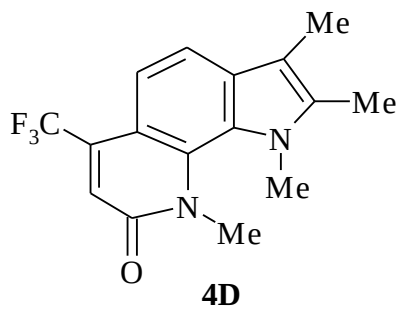
6-гидрокси-2,3-диметил-6-(трифторметил)-1,6,7,9-тетрагидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]хинолина-8-он (**32-HD**)



2,3-диметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]хинолин-8-он (**34-1D**)



1,2,3,9-тетраметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]хинолин-8-он (**36-4D**)



2.1.4. Препараты сравнения и растворитель

В качестве препаратов сравнения использовались синтетические противомикробные препараты диоксидин, нитрофурантоин, фосфомицин и мирамистин.

Диоксидин (производное ди-*N*-оксихиноксалина), широко применяемый в лечебной практике. Этот препарат обладает высокой химиотерапевтической активностью *in vivo* на модельных инфекциях, близких по патогенезу к патологическим процессам у человека (гнойные менингиты, пиелонефриты, септикопиемии) и вызванных штаммами анаэробных бактерий, устойчивых (в том, числе полирезистентных) к препаратам других классов, включая штаммы синегнойной палочки и метициллинустойчивых стафилококков. Диоксидин характеризуется широким спектром антибактериального действия с бактерицидным действием, активен также в отношении грамположительных и грамотрицательных аэробных условно-патогенных бактерий. Показана активность диоксида в отношении микобактерий туберкулеза. Для препарата сравнения диоксида МПК относительно штаммов *Staphylococcus spp.* составляет 125,0-1000,0 мкг/мл, *Escherichia coli* 8,0-250,0 мкг/мл, *Pseudomonas spp.* 125,0-1000,0 мкг/мл, *Streptococcus spp.* 64,0-1000,0 мкг/мл [85; 95].

Нитрофурантоин – синтетический противомикробный препарат (производное нитрофурана). Противомикробное средство широкого спектра из группы нитрофуранов, прежде всего для лечения инфекций мочевыводящих путей. Нарушает синтез ДНК и РНК, белков, в бактериях и проницаемость клеточной мембраны. Эффективен в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*) [10; 98].

Фосфомицин, в настоящее время получают путем химического синтеза. Является структурным аналогом фосфоэнола пирувата, вступает в конкурентное взаимодействие с ферментом *N*-ацетил-*D*-глюкозамино-3-о-энолпирувил-

трансферазой. В результате происходит специфическое, избирательное и необратимое ингибирование этого фермента, что обеспечивает отсутствие перекрестной резистентности с другими классами антибиотиков и возможность синергизма с другими антибиотиками (*in vitro* отмечают синергизм с амоксициллином, цефалексином, пипемидиевой кислотой). Активен *in vitro* в отношении большинства грамположительных микроорганизмов: *Enterococcus spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus spp.*; грамотрицательных микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas spp.*, *Serratia spp.* *In vitro* фосфомицин снижает адгезию ряда бактерий на эпителии мочевыводящих путей [10; 98].

Мирамистин – бензилдиметил[3-(миристоил-амино)пропил]аммоний хлорид моногидрат – препарат из группы катионных поверхностно-активных веществ (КПАВ). Обладает выраженным антимикробным действием в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов, сложных вирусов, простейших, аэробной, анаэробной флоры, находящейся в виде монокультур и микробных ассоциаций, включая штаммы полирезистентные к лекарственным препаратам [28].

Ампициллин (порошок для приготовления раствора для в/м и в/в введения ОАО «Биохимик») [10; 98].

Цефазолин (порошок для приготовления раствора для в/м и в/в введения ОАО «ЛЕККО») [10; 98].

Азитромицин (порошок для приготовления суспензии для приема внутрь АО «АВВА РУС») [10; 98].

Линкомицин (раствор для в/в и в/м введения ОАО «Синтез») [10; 98].

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

2.1.5. Характеристика микроорганизмов, используемых в работе

***Shigella sonnei* «S-форм»** ФБУН «ГНЦ ПМБ» («ГКПМ – Оболенск»).

Морфологические признаки: прямые неподвижные без капсул грамотрицательные палочки с закругленными концами (0,7-1,0×1,0-3,0 мкм). На плотной питательной среде (ГРМ-агар) образуют полупрозрачные бесцветные круглые выпуклые блестящие колонии с ровным краем диаметром 1,5±0,5 мм. Биохимические особенности: биологическую идентификацию микроорганизма проводили с помощью тест-системы ENTEROtest-24 (Erba LaChema s.r.o., Karasek, Brno, CZ). Штамм определен до вида с вероятностью 99,95%, индекс типичности – 1,00. Биохимические свойства: типичные. Условия культивирования: жидкие или плотные питательные среды на основе панкреатического гидролизата рыбной муки (ГРМ-бульон, ГРМ-агар, среды производства ФБУН «ГНЦ ПМБ»), 37 °С, 24 часа, факультативный анаэроб.

***Shigella sonnei* «S form»** ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Культурально-морфологические и тинкториальные свойства: Грамотрицательные неподвижные палочковидные бактерии; факультативные анаэробы: патогенны для человека; на плотной питательной среде колонии круглые, ровные, в косо проходящем свете: голубовато-розовое свечение; в бульоне равномерное помутнение. Условия культивирования: Рост на простых по составу питательных средах (МПА, МПБ) в диапазоне от 10 до 45 °С в течение 18-24 часов. Оптимальная температура культивирования 37 °С. Серологическая характеристика: Реакция агглютинации с гомологичной сывороткой к *Shigella sonnei* – на 3/4 креста. Биохимические свойства: типичные.

***Escherichia coli* M-17** ФБУН «ГНЦ ПМБ» («ГКПМ – Оболенск»).

Морфологические признаки: небольшие (2,5-3×0,5-0,8 мкм) грамотрицательные подвижные полиморфные палочки с закругленными концами. На среде АГАР Эндо-ГРМ рост круглых колоний малинового цвета с

металлическим блеском. Биохимические особенности: биологическую идентификацию микроорганизма проводили с помощью тест-системы ENTEROtest-24 (Erba LaChema s.r.o., Karasek, Brno, CZ). Штамм определен до вида с вероятностью 100,00%, индекс типичности – 1,00. Биохимические свойства: типичные. Условия культивирования: плотные и жидкие питательные среды на основе мясо-пептонного перевара, панкреатического гидролизата рыбной муки и панкреатического гидролизата казеина с добавлением дрожжевого экстракта и глюкозы (МПА, МПБ, ГРМ-бульон, среда №1 ГРМ производства ФБУН «ГНЦ ПМБ»), 37 °С, 24 часа, факультативный анаэроб.

Escherichia coli ATCC 25922 ФБУН «ГНЦ ПМБ» («ГКПМ – Оболенск»).

Морфологические признаки: небольшие (2,5-3×0,5-0,8 мкм) полиморфные подвижные полиморфные палочки с закругленными концами. На среде АГАР Эндо-ГРМ рост круглых колоний малинового цвета с металлическим блеском. Биохимические особенности: биологическую идентификацию микроорганизма проводили с помощью тест-системы ENTEROtest-24 (Erba LaChema s.r.o., Karasek, Brno, CZ). Штамм определен до вида с вероятностью 100,00%, индекс типичности – 1,00. Биохимические свойства: типичные. Условия культивирования: плотные и жидкие питательные среды на основе мясо-пептонного перевара, панкреатического гидролизата рыбной муки и панкреатического гидролизата казеина с добавлением дрожжевого экстракта и глюкозы (МПА, МПБ, ГРМ-бульон, среда №1 ГРМ производства ФБУН «ГНЦ ПМБ»), 37 °С, 24 часа, факультативный анаэроб.

Pseudomonas aeruginosa № 453 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Условия культивирования: мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон, агар Хоттингера, бульон Хоттингера. Оптимальная температура культивирования 20-37 °С; длительность инкубации 18-24 ч. Культурально-морфологические и тинкториальные свойства: грамотрицательные, тонкие палочки, располагаются хаотично, парами, подвижные, спор не образуют. При культивировании на МПА

(агар Хоттингера) – колонии средней величины, круглые, выпуклые, с неровными краями; в МПБ (бульон Хоттингера) – растет неравномерно, образует пленку на поверхности, осадка нет. Биохимические свойства: типичные. Штамм продуцирует растворимый пигмент зеленого цвета.

***Pseudomonas aeruginosa 453* ФБУН «ГНЦ ПМБ» («ГКПМ – Оболенск»).**

Морфологические признаки: грамотрицательные подвижные прямые или слегка изогнутые палочки с закругленными концами, 0,5-0,7×1-3 мкм. В мазках располагаются одиночно, парами или короткими цепочками. На ГРМ №1 непрозрачные, выпуклые колонии диаметром 3 мм, край неровный узорчатый прозрачный. Характерное свойство: появление к концу первых суток зелёного окрашивания культуры с последующим проникновением пигмента (пиоцианина) в питательную среду (ГРМ №1, МПА). Имеет специфический запах жасмина. Биохимические особенности: видовая принадлежность определена с помощью Bruker Daltonic MALDI Biotyper (Германия). Score Value 2.308. Биохимическую идентификацию микроорганизма проводили с помощью тест-системы NEFERtest-24 (Erba LaChema s.r.o., Karasek, Brno, CZ). Штамм определен до вида с вероятностью 99,89%, индекс типичности – 0,89. Биохимические свойства: типичные. Условия культивирования: плотная и жидкая питательная среда на основе панкреатического гидролизата рыбной муки и панкреатического гидролизата казеина с Д-глюкозой и дрожжевым экстрактом (ГРМ-бульон, среда ГРМ №1 производства ФБУН «ГНЦ ПМБ»), МПА, МПБ. Температура оптимальная 37 °С. Аэроб.

***Staphylococcus aureus № 906* ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.**

Условия культивирования: мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон. Оптимальная температура культивирования 20-37 °С; длительность инкубации 18-24 ч. Культурально-морфологические и тинкториальные свойства: грамположительные, неподвижные, неспорообразующие кокки; располагаются в виде гроздей винограда, коротких цепочек, парами и поодиночке. При

культивировании на МПА (агар Хоттингера) – колонии средней величины, круглые, выпуклые, с ровными краями; в МПБ (бульон Хоттингера) – растет равномерно, диффузное помутнение, осадка нет. Биохимические свойства: типичные. Особенности штамма: продуцирует пигмент желтого цвета, коагулазу, ДНК-азу, лецитиназу; термоустойчив к 60 °С – 70-75 мин; фенолустойчивость 1:70 – 20-25 мин; хлораминустойчивость к 0,02 % – 20-25 мин.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 ФБУН «ГНЦ ПМБ» («ГКПМ – Оболенск»).

Морфологические признаки: грамположительные неподвижные правильной геометрической формы шаровидные клетки диаметром 0,5-1,5 мкм, располагающиеся обычно в виде гроздьев. Биохимические особенности: видовая принадлежность определена с помощью Bruker Daltonic MALDI Biotyper (Германия). Score Value 2.225. Штамм обладает гемолитической активностью. Биохимическую идентификацию микроорганизма проводили с помощью тест-системы STAPHYtest-24 (Erba LaChema s.r.o., Karasek, Brno, CZ). Штамм определен до вида с вероятностью 100,00%, индекс типичности – 0,62. Биохимические свойства: типичные. Условия культивирования: СТАФОЛОКОККАГАР, плотная и жидкая питательная среда на основе панкреатического гидролизата рыбной муки и панкреатического гидролизата казеина с Д-глюкозой и дрожжевым экстрактом (ГРМ-бульон, среда №1 ГРМ производства ФБУН «ГНЦ ПМБ»), МПА, МПБ, 37 °С, 24 часа, факультативный анаэроб.

Bacillus cereus var. anthracoides 96 ФБУН «ГНЦ ПМБ» («ГКПМ – Оболенск»).

Морфологические признаки: грамположительные, не образующие капсулы толстые палочки размером 4-6×2 мкм, одиночные или соединены в нити; слабо подвижны. Споры овальные, довольно крупные, 3,0×1,5 мкм. На ГРМ-агаре №1 колонии круглые с ровным светлым краем и темной серединой, поверхность

колонии волнистая; на МПБ равномерное помутнение и легко разбивающийся осадок; через 24 часа инкубирования при 37 °С на Potato Dextrose Agar HIMEDIA India и голодном агаре колонии круглые с бахромчатым краем и волнистой поверхностью. Биохимические особенности. При посеве уколом в столбик 10-12%-го мясо-пептонного желатина: вдоль укола узловатые утолщения, не отростки; желатин разжижается в виде воронки. Молоко пептонизирует, крахмал разлагает. На МПА с кровью образуется зона гемолиза. Обладает лецитиназной и фосфатазной активностью. Видовая принадлежность определена с помощью Bruker Daltonic MALDI Biotyper (Германия). Score Value 2.13. Генетическая характеристика: принадлежность штамма к виду *B.cereus биовар anthracoides* определялась методом ПЦР в реальном времени с использованием праймеров Bcer1F b Bcer1MR. Отношение к гомо- и гетерологичным фагам (профаги): не лизируется сибиреязвенными фагами (бактериофаг диагностический сибиреязвенный Гамма А-26, ФКУЗ «Ставропольский НИПЧИ», серия № 2-14; бактериофаг Fah – ВНИИВВиМ сибиреязвенный диагностический, серия № 01-08). Условия культивирования: плотные и жидкие питательные среды на основе мясо-пептонного перевара, панкреатического гидролизата рыбной муки и панкреатического гидролизата казеина с добавлением дрожжевого экстракта и глюкозы (МПА, МПБ, ГРМ-бульон, среда №1 ГРМ производства ФБУН «ГНЦ ПМБ»), Potato Dextrose Agar HIMEDIA India, Potato Glucose Agar (Dehydrated Culture Media) CULTIMED Espana, 37 °С, 24 часа, факультативный анаэроб.

Staphylococcus aureus ATCC 6538-P ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Условия культивирования: мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон. Оптимальная температура культивирования 20-37 °С; длительность инкубации 18-24 ч. Культурально-морфологические и тинкториальные свойства: грамположительные, неподвижные, неспорообразующие кокки; располагаются в виде гроздей винограда, коротких цепочек, парами и поодиночке. При культивировании на МПА (агар Хоттингера) – колонии средней величины,

круглые, выпуклые, с ровными краями; в МПБ (бульон Хоттингера) – растет равномерно, диффузное помутнение, осадка нет. Биохимические свойства: типичные. Особенности штамма: продуцирует пигмент желтого-оранжевого цвета, α -гемолизин, коагулазу, ДНК-азу, лецитиназу.

Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae № 13883 ATCC ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Культурально-морфологические и тинкториальные свойства: Грамотрицательные неподвижные палочковидные бактерии; факультативные анаэробы: условно патогенны для человека; на плотной питательной среде колонии слизистые, выпуклые с ровными краями, при росте в жидких питательных средах – равномерное помутнение. Условия культивирования: Рост на простых по составу питательных средах (МПА, МПБ) в диапазоне от 12 до 43 °С в течение 18-24 часов. Оптимальная температура культивирования от 35 до 37 °С. Биохимические свойства: типичные.

Salmonella enteritidis № 5765 ATCC ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Культурально-морфологические и тинкториальные свойства: Грамотрицательные палочковидные подвижные бактерии; факультативные анаэробы; спор и капсул не образуют; патогенны для человека. На плотной среде колонии круглые, полупрозрачные, блестящие с ровным или слегка волнистым краем. При косом освещении колонии голубовато-золотистые, гомогенные. В бульоне – равномерное помутнение. Условия культивирования: Растут на простых по составу питательных средах (МПА, МПБ) в течение 18-24 часов. Оптимальная температура культивирования от 35 до 37 °С, оптимум pH 6,5-7,5. Серологическая характеристика O9:O12:Hg,m. Биохимические свойства: типичные.

***Proteus vulgaris* «Цветков»** ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Культурально-морфологические и тинкториальные свойства: Грамотрицательные палочковидные подвижные бактерии; факультативные анаэробы; капсулу не образуют; патогенны для человека. На плотной среде колонии круглые, полупрозрачные, с ровным или слегка волнистым краем, рост в виде «роения». В бульоне – равномерное помутнение. Условия культивирования: Растут на простых по составу питательных средах (МПА, МПБ) в течение 18-24 часов. Оптимальная температура культивирования от 35 до 37 °С. Биохимические свойства: типичные.

***Enterococcus faecalis* ATCC 19433** ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Условия культивирования: МПА с 0,2% глюкозы (pH 7,2-7,4), МПБ с 0,2% глюкозы (pH 7,2-7,4). Оптимальная температура культивирования 37 °С; длительность инкубации 18-24 ч. Культурально-морфологические и тинкториальные свойства: грамположительные, неподвижные, неспорообразующие кокки; располагаются в виде диплококков, небольшими скоплениями, одиночными кокками и короткими цепочками. При культивировании на МПА с 0,2% глюкозы (pH 7,2-7,4) – колонии мелкие, круглые, выпуклые, с ровными краями; в МПБ с 0,2% глюкозы (pH 7,2-7,4) – растет равномерно, диффузное помутнение, осадка нет. Биохимические свойства: типичные.

***Citrobacter freundii* 101/57** ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича

Морфология клеток в мазках: грамотрицательные прямые палочки располагаются одиночно или парами; подвижные при 37 °С. Особенности роста на питательных средах: на агаре Хоттингера – круглые, прозрачные, выпуклые, с ровным краем; на бульоне Хоттингера – равномерное помутнение бульона; температурный оптимум для роста 37 °С, оптимальная pH 7,2-7,3. Биохимические свойства: ферментирует глюкозу, арабинозу, ксилозу, мальтозу, рамнозу,

сахарозу, сорбит до кислоты и газа; не ферментирует лактозу; оксидазоотрицательные; каталазоположительные.

***Pseudomonas aeruginosa 27853 ATCC* ФГУН «ГИСК им. Л. А. Тарасевича»**

Морфология клеток в мазках: одиночные палочки либо короткие цепочки с хорошо выраженной грамотрицательной окраской. Особенности роста на питательных средах: при росте на плотной питательной среде: условия для выращивания – МПА, МПБ; pH 7,2-7,4, $t=36\pm 1^{\circ}\text{C}$, 18-20 часов. Колонии широкие, расплывчатые, прозрачные, с неровным краем. При росте на жидкой питательной среде: условия для выращивания – МПБ, pH 7,2-7,4, 18-20 часов. Рост в виде равномерного помутнения, толстой пленки; среда может приобретать желтовато-зеленую окраску. Биохимические свойства: типичные.

***Streptococcus pyogenes 1238 ATCC* ФГУН «ГИСК им. Л. А. Тарасевича»**

Морфология клеток в мазках: кокки неправильной округлой формы, располагающиеся в виде цепочек или попарно, размеры 0,5-2,0 мкм. Особенности роста на питательных средах: при росте на плотной питательной среде: условия для выращивания среда – сывороточный агар, $t=36\pm 1^{\circ}\text{C}$, 18-20 часов. Колонии мелкие блестящие. Биохимические свойства: типичные.

***Staphylococcus aureus MRSA ATCC 43300* Becton Dickinson France S.A.A**

Характеристика тестерного штамма «Microtrol»: грамположительные кокки; каталаза-положительный; оксидаза-отрицательный; рост на хромогенном агаре – положительный; ДНКаз-положительный; коагулаза Protein A – положительный; антибиотикочувствительность – метициллин: устойчивый.

***Streptococcus pyogenes ATCC 19615* Becton Dickinson France S.A.A**

Характеристика тестерного штамма «Microtrol»: биохимический контроль API 20 STREP: удовлетворительный результат; грамположительные кокки; каталаза-отрицательный; оксидаза-отрицательный; группа по Ленсфильду –

группа А; ДНК-аза-положительный; антибиотикочувствительность – бацитрацин: чувствительный.

***Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619** Becton Dickinson France S.A.A

Характеристика тестерного штамма «Microtrol»: грамположительные диплококки; каталаза-отрицательный; оксидаза-отрицательный; устойчивость к желчи – положительный; антибиотикочувствительность – оптохин: чувствительный.

***Salmonella typhimurium* TA100** Коллекция микроорганизмов кафедры генетики ФГБОУ ВО «МГУ им. М. В. Ломоносова»

Генотип: *hisG46, rfa, uvr-, pkm101, bio-*, ревертирование к прототрофности происходит путем замены пар оснований.

***Escherichia coli* PQ 37** НИОХ СО РАН, Новосибирск

Генотип: *F- thr leu his-4 pyrD thi galE galK lacΔU169 srl300::Th10 rpoB rpsL uvrA rfa trp::Muc+ sfi A::Mud(Ap, lac)cts*.

Таблица 2.1 – Характеристика клинических штаммов микроорганизмов

Штамм микроорганизма	Материала исследования, из которого выделен патоген	Количество штаммов
1	2	3
<i>Staphylococcus spp.:</i>	Слизь из зева, носа,	
<i>S.aureus</i>	носоглотки, моча, фекалии,	518
<i>S.epidermidis</i>	раневое отделяемое,	168
<i>S.warneri</i>	секционный материал	43
<i>S.saprophyticus</i>		35
<i>S.haemolyticus</i>		81
<i>S.hominis</i>		20

1	2	3
<i>Streptococcus spp.:</i>	Слизь из зева, носа,	
<i>S.pyogenes</i>	носоглотки, мокрота, моча,	123
<i>S.pneumonia</i>	фекалии, секционный	91
<i>S.salivarius</i>	материал	129
<i>S.uberis</i>		162
<i>S.mitis</i>		207
<i>S.agalactia</i>		71
<i>S.sanguinis</i>		115
<i>S.mutans</i>		83
<i>S.bovis</i>		100
<i>S.dys. ss equisimilis</i>		41
<i>S.con. ss constellatus</i>		6
<i>Enterococcus spp.:</i>	Слизь из зева, носа,	
<i>E.faecalis</i>	носоглотки, мокрота, моча,	182
<i>E.faecium</i>	фекалии, секционный	88
	материал	
<i>Escherichia coli</i>	Слизь из зева, носа,	268
<i>Klebsiella spp.:</i>	носоглотки, моча, раневое	
<i>K.pneumoniae ss ozaenae</i>	отделяемое, фекалии,	28
<i>K.pneumoniae ss pneumoniae</i>	секционный материал	98
<i>K.oxytoca</i>		21
<i>Salmonella spp.:</i>		
<i>S.enteritidis</i>		23
<i>S.typhimurium</i>		4
<i>Shigella sonnei</i>		3
<i>Enterobacter spp.:</i>		
<i>E.cloacae</i>		53
<i>E.aerogenes</i>		46

1	2	3
<i>E.gergoviae</i>		4
<i>E.amnigenes</i>		14
<i>Proteus spp.:</i>	Слизь из зева, носа,	
<i>P.vulgaris</i>	носоглотки, моча, раневое	36
<i>P.mirabilis</i>	отделяемое, фекалии,	28
<i>P.agglomerans</i>	секционный материал	8
<i>Serratia proteamaculans</i>		5
<i>Morganella morganii</i>		3
<i>Citrobacter spp.:</i>		
<i>C.freundii</i>		49
<i>C.amalonaticus</i>		14
<i>Hafnia alvei</i>		2
<i>Acinetobacter spp.:</i>	Фекалии, секционный	
<i>A.baumani</i>	материал	12
<i>A.lwoffii</i>		16
<i>Pseudomonas spp.:</i>	Слизь из зева, носа,	
<i>P.aeruginosa</i>	носоглотки, моча, фекалии,	94
<i>P.pituda</i>	секционный материал	4
<i>P.alcaligenes</i>		2
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (<i>Pseudomonas paucimobilis</i>)	Слизь из носа, носоглотки, моча, фекалии, секционный материал	9
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (<i>Pseudomonas maltophilia</i>)	Слизь из носа, носоглотки, моча, фекалии, секционный материал	11
<i>Bacillus cereus</i>	Фекалии, секционный материал	32

2.1.6. Характеристика питательных сред, используемых в работе

В исследовании использовались следующие питательные среды:

Среда № 1. Мясопептонный агар (МПА) ЗАО «НИЦФ»

Состав	г/л
Пептон	10,0
Натрия хлорид	5,0
Вода мясная	1000,0 мл
Агар-агар	2,0-20,0
Конечное значение pH (при 25 °C)	7,3±0,2

Используется для выращивания неприхотливых микроорганизмов, для приготовления специальных сред.

Среда № 2. Питательный агар (M001) HiMedia Laboratories Pvt.Limited

Состав	г/л
Пептон	5,0
Натрия хлорид	5,0
Экстракт говяжий	1,5
Экстракт дрожжевой	1,5
Агар-агар	15,0
Дистиллированная вода	1000,0 мл
Конечное значение pH (при 25 °C)	7,4±0,2

Используется для выращивания неприхотливых микроорганизмов.

Среда № 3. Мясопептонный бульон (МПБ) ЗАО «НИЦФ»

Состав	г/л
Пептон	10,0
Натрия хлорид	5,0
Вода мясная	1000,0 мл
Конечное значение pH (при 25 °C)	7,3±0,2

Используется для выращивания неприхотливых микроорганизмов, для приготовления специальных сред.

Среда № 4. Среда Эндо (коммерческая) ФС 42-350498 ЗАО «НИЦФ»

Состав	г/л
Панкреатический гидролизат кильки	11,5
Экстракт кормовых дрожжей	0,86
Лактоза	12,9
Фуксин основной	0,22
Сульфат натрия двузамещенный	0,48
Сульфит натрия	0,83
Хлорид натрия	3,6
Карбонат натрия	0,01
Агар-агар	9,6
Дистиллированная вода	1000,0 мл
Конечное значение pH (при 25 °C)	7,3±0,2

Микроорганизмы способные расщеплять лактозу (лактозопозитивные) образуют колонии ярко-розового или красно-малинового цвета, нередко с металлическим блеском. Лактозонегативные микробы дают рост в виде бесцветных или слабо розовых колоний.

Среда № 5. Среда Эндо (M029R) HiMedia Laboratories Pvt.Limited

Состав	г/л
Пептический перевар животной ткани	10,0
Лактоза	10,0
Калия гидрофосфат	3,5
Натрия сульфит	2,5
Фуксин основной	0,5
Агар-агар	0,5
Дистиллированная вода	1000,0 мл
Конечное значение pH (при 25 °C) 7,5±0,2	

Сульфит натрия и основной фуксин обладают подавляющим эффектом на грамположительные микроорганизмы. Лактоза разлагается микроорганизмами до альдегида и кислоты. Альдегид в свою очередь освобождает фуксин из фуксин-сульфитного комплекса, усиливая красное окрашивание колоний. У кишечных палочек эта реакция очень выражена и сопровождается кристаллизацией фуксина, что проявляется зеленоватым металлическим блеском (фуксиновый глянец) колоний.

Среда № 6. Основа колумбийского кровяного агара (M144) HiMedia Laboratories Pvt.Limited

Состав	г/л
Пептон (специальный)	23,0
Крахмал кукурузный	1,0
Натрия хлорид	5,0
Агар-агар	10,0
Дистиллированная вода	1000,0 мл
Конечное значение pH (при 25 °C) 7,3±0,2	

Для приготовления кровяного агара асептично вносят стерильную дефибринированную кровь барана (до 5 % об.). Тщательно перемешать.

Присутствие специального пептона обеспечивает быстрый и обильный рост даже прихотливых микроорганизмов. Кукурузный крахмал служит источником энергии и одновременно нейтрализует токсические метаболиты. Баранья кровь позволяет оценить способность микробов к гемолизу и обеспечивает их гемином (Х-фактором), который необходим для роста многих бактерий.

Среда № 7. Сывороточный агар ЗАО «НИЦФ»

В качестве основы используют 1,2-1,5% агар (рН 7,4), приготовленный на бульоне из рыбного гидролизата, бульоне из перевара Хоттингера (аминный азот в бульоне 150-180 мг/мл) или на сухом питательном агаре специального назначения. К 80 мл расплавленного и остуженного до температуры 50 °С агара добавляют 20 мл инаktivированной при температуре 56 °С в течение 30 минут сыворотки.

Среда № 8. Агар Мюллера-Хинтона (M173) HiMedia Laboratories Pvt.Limited

Состав	г/л
Вытяжка говядины	300,0
Кислотный гидролизат казеина	17,0
Крахмал	1,5
Агар-агар	17,0
Дистиллированная вода	1000,0 мл
Конечное значение рН (при 25 °С) 7,3±0,2	

Для приготовления кровяного агара асептично вносят стерильную дефибринированную кровь барана (до 5 % об.). Тщательно перемешать.

Поддерживает рост многих микроорганизмов. Крахмал служит «защитным коллоидом» против токсичных веществ, вырабатываемых в процессе роста.

Среда № 9. Бульон Мюллера-Хинтона (M391) HiMedia Laboratories Pvt.Limited

Состав	г/л
Вытяжка говядины	300,0
Кислотный гидролизат казеина	17,0
Крахмал	1,5
Дистиллированная вода	1000,0 мл
Конечное значение рН (при 25 °С)	7,4±0,2

Для приготовления кровяного бульона асептично вносят стерильную дефибринированную кровь барана (до 5% об.). Тщательно перемешать.

Поддерживает рост многих микроорганизмов. Крахмал служит «защитным коллоидом» против токсичных веществ, вырабатываемых в процессе роста.

Среда № 10. Желточно-солевой агар

В качестве основы используют элективный солевой агар для стафилококков или МПА с 10% раствором поваренной соли. По прописи готовят 1,8-2,0% агар, рН 7,2-7,4. К расплавленному и охлажденному до 45 °С агару, соблюдая правила асептики, добавляют 20 % желточной взвеси (1 желток на 200 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия).

Один из компонентов яичного желтка – лецитовителлин, который является субстратом для фермента лецитовителлазы – лецитиназы, относящейся к группе липаз и продуцируемой некоторыми стафилококками. При расщеплении лецитовителлина вокруг лецитиназоположительных колоний на поверхности среды образуется радужный венчик. Добавление в среду молока стимулирует образование стафилококками золотистого или лимонно-желтого пигмента, относящегося к группе каротиноидов.

Среда № 11. Висмут-сульфит-агар ЗАО «НИЦФ»

Состав	г/л
Говяжий экстракт	5,0
Пептон	10,0
Декстроза	5,0
Фосфат натрия (двузамещенный)	4,0
Сульфат железа	0,3
Индикатор сульфита висмута	8,0
Бриллиантовый зеленый	0,025
Агар-агар	20,0
Дистиллированная вода	1 000,0 мл

Основной сульфит висмута и бриллиантовый зеленый подавляют рост грамположительных микроорганизмов и многих энтеробактерий, в том числе и шигелл. Бактерии, образующие сероводород, формируют на среде черные и коричнево-черные, иногда с темно-зеленым оттенком, часто с металлическим блеском, колонии. Это происходит за счет того, что образуемый бактериями из сульфата железа сероводород вызывает почернение индикатора – бесцветного сульфита висмута вследствие перехода его в сульфид висмута – вещество черного цвета. При этом среда под колониями тоже окрашивается в черный цвет. Бактерии, не образующие сероводород, растут в виде мелких, бесцветных колоний.

Среда № 12. Среда Плоскирева ЗАО «НИЦФ»

Состав	г/л
Панкреатический гидролизат кильки	16,0
Натриевые соли желчных кислот	8,1
Лактоза	12,9
Фосфат натрия двузамещенный	2,25
Цитрат натрия	8,82
Тиосульфат натрия	6,86

Йод металлический	0,12
Карбонат натрия	1,42
Нейтральный красный	0,04
Бриллиантовый зеленый	0,02
Агар-агар	8,75
Дистиллированная вода	1 000,0 мл

Микроорганизмы, способные расщеплять лактозу (лактозопозитивные), образуют колонии темного красного цвета. Лактозонегативные микробы дают рост в виде бесцветных или слабо окрашенных колоний. Соли желчных кислот, бриллиантовый зеленый и йод полностью подавляют рост грамположительных бактерий, значительно задерживают (в первые 24 часа) развитие эшерихий и других колиформных бактерий, а также предотвращают роение протей. Свойства среды не могут обеспечить рост *S.dysenteriae* и некоторых других сальмонелл.

Среда № 13. Основа среды Левенштейна-Йенсена (M1542) без крахмала
HiMedia Laboratories Pvt.Limited

Состав	г/600 мл
L-Аспарагин	3,60
Калия дигидрофосфат	2,40
Магния сульфат	0,24
Магния цитрат	0,60
Малахитовый зеленый	0,40
Дистиллированная вода	600,0
(содержащая 12 мл глицерина)	
Яичная эмульсия	1000,0

Среда Левенштейна-Йенсена с добавлением яичной эмульсии используется для выращивания микобактерий, выделения чистой культуры и для оценки чувствительности к противотуберкулезным препаратам. Наилучшие условия роста достигаются при 35 °С в атмосфере 5-10 % углекислого газа. *M.tuberculosis* через 2-4 недели при 35 °С в атмосфере 5-10

% углекислого газа дают обильный рост, колонии гранулированные, неровные, бородавчатые, сухие, рыхлые.

2.1.7. Характеристика экспериментальных животных

В качестве экспериментальных животных использовались нелинейные белые мыши обоего пола (массой 18-22 г) и белые беспородные крысы обоего пола (массой 180-200 г). Экспериментальных животных содержали на обычном рационе вивария в боксированных помещениях при температуре окружающей среды 18-20°C. Проведение экспериментального исследования проводилось в соответствии со ст. 21 Конституции Российской Федерации, Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования», принятой на 18-й Генеральной Ассамблее ВМА (Финляндия, 1964 г., в пересмотре от 2013г.), Федеральным законом от 21 ноября 2011 г. N 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации», Национальным стандартом РФ ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика (Good Clinical Practice (GCP))» (утв. приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 сентября 2005 г. N 232-ст), Федеральным законом от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», «Правилами надлежащей клинической практики» (утв. приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 200н), «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (утв. приказом Минздравсоцразвития России от 23.08.2010 г. № 708н.), Федеральным законом от 27 июля 2006 г. № 152-ФЗ «О персональных данных», Приказом Минздравсоцразвития России от 26 августа 2010 г. N 748н «Об утверждении порядка выдачи разрешения на проведение клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения», Рекомендациями ВАК РФ «О порядке проведения биомедицинских исследований у человека (опубликованными в Бюллетене ВАК Минобразования РФ (№3, 2002 г.)) и иными нормативно-правовыми документами,

регламентирующими проведение биомедицинских исследований с участием человека и животных, а также действующим законодательством Российской Федерации и Республики Мордовия. Протоколы экспериментальных исследований настоящей работы прошли биоэтическую экспертизу на заседании ЛЭК Медицинского института ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева» (протокол №45, декабрь 2016 года).

2.2. Основные этапы проведения тестирования чувствительности микроорганизмов к исследуемым соединениям

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), *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*.

В качестве опытных исследовались штаммы микроорганизмов изолированных 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 [99]. Окончательную идентификацию и определение чувствительности микроорганизмов к традиционным антимикробным препаратам проводили с помощью автоматической бактериальной системы «Sensititre» (UK).

Для изучения противомикробной активности исследуемые соединения использовали в виде раствора.

Для определения антимикробной активности исследуемых соединений использовали два метода [80; 81]: метод серийных разведений в бульоне (макрометодом «пробирочным») и диско-диффузионный метод (ДДМ). Но, так

как в работе исследовались новые соединения, нам пришлось внести некоторые модификации в традиционно применяемые, для известных препаратов, методы.

Для культивирования микроорганизмов, хранения и оценки чувствительности использовали специально предназначенные для этих целей среды, разрешенные к применению в Российской Федерации в установленном порядке и по своим характеристикам удовлетворяющие требованиям [80; 81; 117]. Внутрिलाбораторный контроль качества среды проводили при использовании всех сред, разрешенных к применению в Российской Федерации в установленном порядке.

Метод серийных разведений в бульоне (макрометодом «пробирочным»). Бактериальную суспензию готовили из агаровых культур. Для приготовления инокулюма использовали чистую суточную культуру микроорганизмов, выросших на плотных питательных средах. Отбирали несколько однотипных, четко изолированных колоний, выросших на неселективных плотных питательных средах. Петлей переносили незначительное количество материала с верхушек колоний в пробирку со стерильным физиологическим раствором, доводя плотность инокулюма точно до 0,5 по стандарту Мак-Фарланда, в работе использовали коммерческий стандарт мутности. Инокулюм использовали в течение 15 мин после приготовления.

Для взвешивания субстанций использовали электронные лабораторные весы с точностью до 4 знака, для измерения объемов – калиброванные дозаторы и пипетки. Основные растворы исследуемых соединений готовили в концентрации 1,0 мг/мл. Навески исследуемых соединений для приготовления базовых растворов готовили с учетом их активности. Основные растворы были использованы для приготовления рабочих растворов. Из рабочих растворов готовили двукратные разведения исследуемых соединений. При расчетах за основу бралась конечная концентрация исследуемого соединения в питательной среде, равная 0,25 мг/мл и более низкие концентрации – 0,125; 0,062; 0,031 и т.д.

Тестирование проводили в объеме 1 мл каждого разведения исследуемого соединения с конечной концентрацией исследуемого микроорганизма примерно

5×10^5 КОЕ/мл.

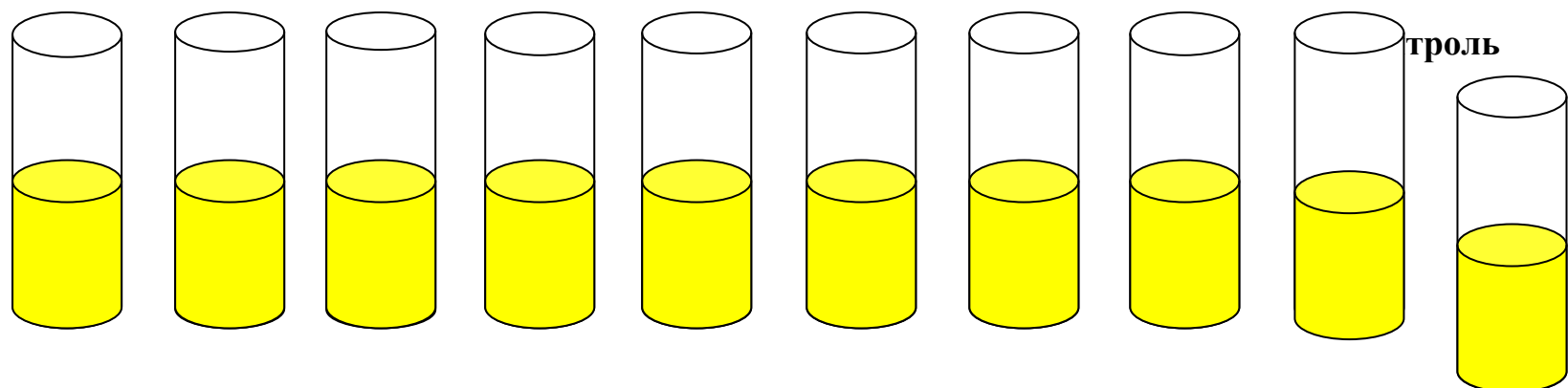
Мюллер-Хинтон бульон (МХБ) (для стрептококков с содержанием крови) для определения чувствительности разливали по 0,5 мл в каждую пробирку. Количество пробирок составило девять штук плюс одна для постановки «отрицательного» контроля, т.е. десять. Рабочий раствор исследуемого соединения готовили из основного раствора с использованием жидкой питательной среды - МХБ. Затем рабочий раствор в количестве 0,5 мл при помощи микропипетки со стерильным наконечником вносили в первую пробирку, содержащую 0,5 мл бульона. Тщательно перемешивали и новым стерильным наконечником переносили 0,5 мл раствора исследуемого соединения в бульоне во вторую пробирку, содержащую первоначально 0,5 мл бульона. Эту процедуру повторяли, пока не был приготовлен весь необходимый ряд разведений. Из последней пробирки 0,5 мл бульона удаляли (рисунок 2.1). Таким образом, получали ряд пробирок с растворами исследуемого соединения, концентрации которых отличались в соседних пробирках в 2 раза. Затем засеивали культурой исследуемого микроорганизма и после инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста. Конечная концентрация микроорганизм в каждой пробирке составляла примерно 5×10^5 КОЕ/мл. Все пробирки, кроме пробирки «отрицательный» контроль, инкубировали в обычной атмосфере при температуре 37 °С в течение 16-20 или 20-24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма). Пробирку «отрицательный» контроль помещали в холодильник при 4 °С, где хранили до учета результатов. Для определения наличия роста микроорганизма пробирки с посевами просматривали в проходящем свете. Рост культуры в присутствии исследуемого соединения сравнивали с референтной пробиркой («отрицательный» контроль), содержащей исходный инокулюм и хранившейся в холодильнике. МПК определяли по наименьшей концентрации исследуемого соединения, которая подавляет видимый рост микроорганизма.

В ДДМ в качестве носителя исследуемого вещества использовали бумажные диски (стандартизированные диски НД-ПМП-1 из картона технического фильтровального ГОСТ 6722-75 (ФГУН «Санкт-Петербургский

научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Л.Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека). Непосредственно перед применением диски пропитывали исследуемым соединением и диоксидином с помощью микродозатора. В качестве контроля использовали диски, пропитанные дистиллированной водой.

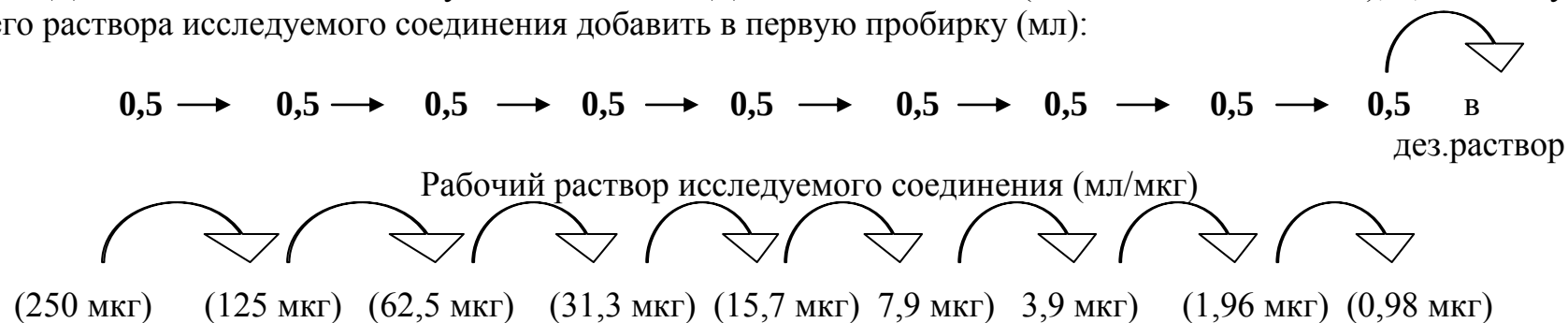
Диско-диффузионный метод. Для определения чувствительности ДДМ использовали стандартный инокулюм, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту Мак-Фарланда и содержащий примерно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл.

Для инокуляции приготовленных чашек с агаром использовали стерильные ватные тампоны промышленного производства (палочка-тампон (пластик-хлопок) CITOSWAB стерильный в индивидуальной упаковке). Тампон погружали в стандартную суспензию микроорганизма, затем избыток инокулюма удаляли, отжав тампон о стенки пробирки. Инокуляцию проводили штриховыми движениями в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60°. Зоны подавления роста, исследуемого штамма микроорганизма, образовавшиеся в результате диффузии исследуемого вещества из носителя в Мюллер-Хинтон агар (МХА), определяли с помощью линейки-лекало (HiMedia Laboratories Pvt.Limited). Степень активности к исследуемым соединениям определялась в крестах по следующей схеме [80]: «+++» высокая активность - диаметр зоны задержки роста более 25 мм; «++» активное - диаметр зоны задержки роста 16-25 мм; «+» малоактивное - диаметр зоны задержки роста 10-15 мм; «+/-, 0» - неактивное - диаметр зоны задержки роста менее 10 мм и полное отсутствие. Содержание препаратов в диске соответствовало МПК×2 соединения.



1. МХБ (мл): 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5

2. В 1 мл ДМСО внести 5 мг исследуемого вещества. Добавить 4 мл МХБ (в 5 мл – 5 мг вещества), 0,5 мл полученного рабочего раствора исследуемого соединения добавить в первую пробирку (мл):



3. В 1 мл физиологического раствора внести микроорганизмы в соответствии со стандартом мутности 0,5 по Мак-Фарланду. 0,1 мл приготовленного раствора с микроорганизмами внести в 10 мл МХБ. 0,5 мл МХБ с микроорганизмами внести в каждую пробирку.

0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5 0,5

Инокулом исследуемого микроорганизма (мл)

Рисунок. 2.1 – Схема определения МПК исследуемых соединений

2.3. Определение чувствительности микобактерий к исследуемым соединениям

В соответствии с законодательством РФ [120; 143; 97] к работе с материалом, зараженным туберкулезными и нетуберкулезными микобактериями (III-IV группы), допускаются лаборатории, имеющие специальное разрешение Центра Государственного санитарно-эпидемиологического надзора и нормирования Минздрава РФ. Поэтому все работы по исследованию чувствительности микобактерий к исследуемым соединениям проводились в ГКУЗ РМ «Республиканский противотуберкулезный диспансер», г. Саранск.

В нашей стране получило распространение определение лекарственной устойчивости методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена.

В питательную среду Левенштейна-Йенсена, не содержащую крахмал (крахмал адсорбирует лекарственные препараты), непосредственно перед свертыванием добавляли рабочие разведения исследуемые соединения.

Для исследования использовали штамм многократно проверенной культуры *Mycobacterium tuberculosis*, чувствительный ко всем испытуемым противотуберкулезным препаратам.

Выросшую на плотной питательной среде культуру (обязательно несколько колоний) снимали платиновой лопаточкой и помещали в стерильную фарфоровую ступку или толстостенную стеклянную пробирку. Тщательно растирали пестиком или стеклянной палочкой, постепенно добавляли по каплям стерильный физиологический раствор. Полученную суспензию отсасывали пастеровской пипеткой и переносили в стерильную пробирку, диаметр которой соответствовал диаметру пробирки с оптическим стандартом мутности. Суспензию культуры стандартизировали по оптическому стандарту Мак-Фарланда по плотности 0,5.

Затем разводили в 10 раз стерильным физиологическим раствором. Для этого заранее приготовленный ряд пробирок по числу исследуемых культур микобактерий и подписывали на них номера исследуемых культур. В каждую

пробирку наливали по 9 мл стерильного физиологического раствора. После приготовления суспензий всех взятых в опыт культур микобактерий в каждую из приготовленных пробирок вносили стерильной пипеткой по 1 мл приготовленной по стандарту 0,5 суспензии микобактерий. Посев на среды с исследуемыми соединениями производили из этих суспензий (суспензия, приготовленная по стандарту 0,5 и разведенная в 10 раз).

Результат исследования учитывали на 21 день после посева. При скудном росте в контрольной пробирке все пробирки с препаратами оставляли еще на 1-2 недели в термостате до получения выраженного роста в контроле, после чего давали окончательный ответ. Культуру считали чувствительной к данной концентрации соединения, если в пробирке со средой, содержащей препарат, выросло менее 20 колоний при обильном росте в контрольной пробирке. Культуру считали устойчивой к той концентрации соединений, которая содержала в данной пробирке, если в пробирке со средой выросло более 20 колоний.

2.4. Изучение острой токсичности исследуемых соединений

В работе изучали действие исследуемых соединений, проявляющееся после их однократного применения [117]. Основные параметры острой токсичности изучаемых соединений среднелетальные дозы LD_{50} , LD_{16} , LD_{84} вычислялись с помощью метода Литчфилда и Уилкоксона.

Исследуемые соединения использовали в виде растворов, для внутрибрюшинного введения и накожного нанесения в качестве растворителя использовали ДМСО и раствор хлорида натрия 0,9% (изотонический). Для перорального введения использовали раствор хлорида натрия 0,9% (изотонический). В эксперименте участвовали белые беспородные мыши (массой 18-20 г) и белые беспородные крысы (массой 180-200 г) обоего пола. Для определения клинически здоровых животных, мышей и крыс распределяли

случайным образом на контрольные и опытные группы после предварительного 5-ти дневного карантина и осмотра.

Исследуемые соединения вводили однократно в максимально возможных объемах. Перорально исследуемые соединения вводили мышам и крысам через желудочный зонд (в дозах от 100 до 2000 мкг/мл). Внутривентрикулярно исследуемые соединения вводили мышам и крысам с помощью одноразовых шприцев (в дозах от 100 до 2000 мкг/мл) однократно.

Предварительно на ночь лишив животных корма, оставляя при этом доступ к питьевой воде. По истечению периода голодания животных взвешивали и вводили тестируемые соединения. После введения соединения животных также лишали корма на 3-4 часа.

Для изучения накожной токсичности соединения наносили на участок кожи крыс размером 5х5 см (в дозах от 2000 до 5000 мкг/кг). За сутки до нанесения изучаемого соединения у животных выстригали в области спины и боков шерстный покров размером 5х5 см. Соединение наносили однократно, равномерно распределив их по всей поверхности участка и слегка втирая в кожу.

В качестве контроля использовали ДМСО и раствор хлорида натрия 0,9% (изотонический) (в аналогичных дозах).

В эксперименте использовались животные одного возраста (2,5 мес.), которые распределялись по группам так, чтобы их индивидуальная масса не отличалась более, чем на 10 % от средней массы животных одного пола. За каждым животным наблюдение проводили отдельно, в течение первых 24 часов непрерывно. Особенное внимание уделялось первым 8 часам после введения соединения. Начиная со второго дня, на протяжении 14 суток, продолжали вести наблюдение за животными в утренние и вечерние часы с учетом картины интоксикации. Наблюдение общего здоровья, выявление признаков токсичности, тяжелого состояния, смертности проводилось во всех группах в течении всего периода наблюдения два раза в день. Осмотр осуществлялся в клетках, на руках, на открытой поверхности. Суточное потребление корма и воды фиксировали до введения соединений, а также после введения ежедневно, визуалью. Массу тела

животных определяли перед введением препаратов. А затем ежедневно в течение всего периода наблюдения. Животных, павших в ходе эксперимента, вскрывали. По окончании эксперимента проводили эвтаназию и патологоанатомическое вскрытие всех выживших животных.

Оценку общего состояния животных после введения исследуемых соединений проводили с учетом изменения поведенческих реакций (двигательная активность, груминг, акт приема корма, воды, акт дефекации). Наравне с этим, для оценки общего состояния, учитывали нервно-мышечную возбудимость, некоторые вегетативные функции.

2.5. Определение типа 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. Для исследования готовили растворы исследуемых соединений различной концентрации в физиологическом растворе (из расчета, что в работе использовали нихромовую петлю объемом 0,8 мм³) и разливали по пробиркам (по 1 мл). Контрольные пробирки не содержали исследуемых соединений. Одновременно готовили взвесь бактерий в физиологическом растворе в соответствии со стандартом мутности 0,5 по Мак-Фарланду и добавляли по 1 мл в пробирки с различными разведениями исследуемых соединений. Отмечали время, а затем через 5, 10, 15 и 30 мин, 1, 2 и 4 ч с помощью нихромовой петли делали высеvy в пробирки, содержащие 1 мл МХБ. Пробирки помещали в термостат при 37 °С и наблюдали в течение 5 сут. Для определения наличия роста микроорганизма пробирки с посевами просматривали в проходящем свете. В контрольных пробирках быстро появляется рост. Также быстро обычно появляется рост и при посевах из пробирок, содержащих не бактерицидные концентрации исследуемого соединения. Запоздалый рост тоже свидетельствует

об отсутствии бактерицидного действия. В этом случае, можно говорить только о задержке роста и размножения микроорганизмов и бактериостатическом типе действия соединения [87]. В ходе работы возникла необходимость в модификации метода. Дополнительно рост микроорганизмов фиксировали по изменению оптической плотности культуральной жидкости фотоэлектроколориметрически с использованием ФЭК Ареl «АР-101». Исследования проводили в объеме 1 мл в стерильных кюветах при длине волны 600 нм. Зависимость оптической плотности исследуемого соединения с культурой микроорганизмов обнуляли по показателям оптической плотности исследуемого вещества. Полученную оптическую плотность микроорганизмов, культивируемых в присутствии противомикробного соединения, сравнивали с оптической плотностью микроорганизмов, культивируемых без противомикробного соединения.

2.6. Определение цитотоксичности исследуемых соединений *in vitro*

Для оценки цитотоксического действия исследуемых соединений на эукариотические клетки использовался скрининговый метод определения выживаемости клеток – МТТ-тест [379]. 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 [367; 212].

Линия опухолевых клеток HeLa (ATCC® CCL-2™), используемая в работе, получена из коллекции банка глубокозамороженных клеточных культур ГУ «НИИВ им. Д. И. Ивановского РАМН» и представляет собой эпителиальные

клетки аденокарциномы шейки матки человека, прилипающие к подложке (рисунок 2.2).

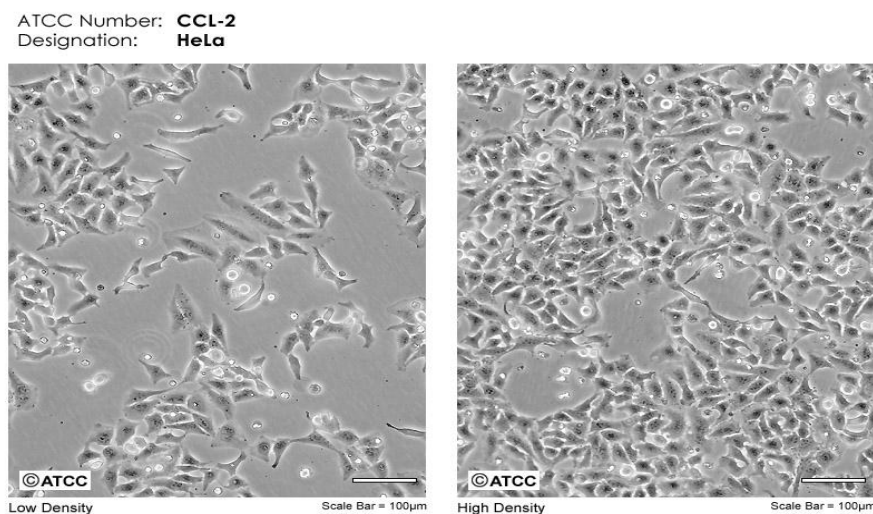


Рисунок 2.2 – Эпителиальные клетки аденокарциномы шейки матки человека (HeLa ATCC ® CCL-2™)

Культивирование опухолевых клеток осуществляется в среде RPMI-1640 (разработана Roswell Park Memorial Institute; изготовитель НПП «ПанЭко», Россия) в пластиковых флаконах (Corning, США) при 37 °С, 100% влажности и 5% содержании углекислого газа в окружающем воздухе. Пересев клеточной культуры производится каждые 3 дня. Во время пассажа клетки снимаются с поверхности пластикового флакона смесью ЭДТА в физиологическом (раствор Версена; НПП «ПанЭко», Россия) и 0,25% раствора трипсина (ПанЭко, Россия) (в соотношении 1:1) в течение 3-5 мин при 37 °С. После «ошпаривания» клеток и открепления их от дна флакона, трипсин инактивируется добавлением питательной культуральной среды с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (НПП «ПанЭко», Россия) [6].

Для определения способности исследуемых соединений оказывать цитотоксическое действие рассев клеточной культуры осуществляется в лунки 96-луночного плоскодонного планшета, концентрация $1-2 \times 10^4$ клеток/лунка. Культивирование требует 37 °С, 100% влажности и 5% содержания углекислого

газа в окружающем воздухе. Исследуемые соединения в концентрациях 50 мкг/мл, 500 мкг/мл, 1000 мкг/мл вносят после формирования монослоя и замены культуральной среды. Длительность инкубирования с исследуемыми соединениями составляет 48 ч. За 4 ч до окончания инкубирования в каждую лунку вносится 20 мкл раствора МТТ (5 мг/мл) (НПП «ПанЭко», Россия) и инкубирование продолжается оставшиеся 4 ч. По окончании инкубирования среда удаляется и в каждую лунку добавляется по 200 мкл ДМСО. Осадок ресуспензируется и растворяется в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Оптическая плотность раствора определяется на микропланшетном ИФА-фотометре (Immunochem 2100 «High Technology Inc.», США) при длине волны 492 нм. Долю жизнеспособных клеток рассчитывают в процентах по отношению к контролю. Исследуемое соединение оказывает цитотоксическое действие, если его процентный показатель оптической плотности меньше 70 %. Если показатель оптической плотности превышает 70 %, то данное соединение не оказывает цитотоксического действия на культуру клеток [1; 34].

2.7. Изучение генотоксичности исследуемых соединений *in vitro*

Тест Эймса *Salmonella*/микросомы получил широкое распространение при первичном выявлении генетической активности агентов различной природы [68]. Это тест-система, была разработана в 60-е годы XX века Брюсом Эймсом. Американский исследователь длительное время изучал природу мутационных изменений в генах мутантов *Salmonella typhimurium* [186]. В тесте Эймса используются ауксотрофные по гистидину штаммы *Salmonella typhimurium*, которые под действием мутагенов способны ревертировать к прототрофности. Некоторые мутантные штаммы содержат мутации типа замены пар оснований (*his G46*), а другие – мутации типа сдвига рамки считывания (*his 3052*). Со временем возникла необходимость в совершенствовании теста Эймса, поэтому наряду с хорошо изученными мутациями потребности в гистидине, в геном сальмонеллы введена делеция по одному из генов репарации (*uvrB-bio*), что повышает

чувствительность бактерий к мутагенам. Также в геном тестерных штаммов введена *rfa*-мутация, блокирующая синтез липополисахаридной капсулы, для повышения проницаемости клеток. Некоторые тестерные штаммы *Salmonella typhimurium* содержат плазмиду рКМ 101, содержащую гены, повышающую чувствительность клеток к агентам, усиливающим рекомбинацию ДНК и индуцирующим SOS-мутагенез. Также, благодаря данной плазмиде, клетки тест-штаммов резистентны к ампициллину, что используется как маркер присутствия плазмиды [355; 377]. Тест Эймса впервые позволил изучить мутагенный потенциал огромного числа химических соединений – это пепел сигарет, пищевые консерванты, средства для окрашивания волос, образцов природных комплексов (вода, почва) и т.д. [40; 377].

Принцип теста Эймса базируется на культивировании тест-штаммов *Salmonella typhimurium* 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. Мутационные реверсии такого рода без внешних воздействий наблюдаются с низкой частотой. Если засеять безгистидиновую среду ауксотрофным штаммом *Salmonella typhimurium* и добавить химический мутаген, то по числу колоний, выросших на данной селективной среде, определяется частота мутаций, которая значительно увеличивается. Следует отметить, что теста Эймса имеет определенные ограничения, так как тестирование образцов, содержащих свободный гистидин, является невозможным.

2.7.1. Тест на токсичность по отношению к *Salmonella typhimurium*

Данный тест проводится с целью подбора оптимальных (нетоксичных для тестерного микроорганизма) концентраций исследуемого соединения для их дальнейшего использования в тесте по оценке мутагенной активности (тест

Эймса). В исследовании на токсичность в качестве тест-штамма был использован *Salmonella typhimurium* TA100.

Чистая культура тест-штамма *Salmonella typhimurium* TA100 со скошенного агара (LB-среда агаризованная) переносится в 5 мл LB-бульона и культивируется при температуре 37 °С 12 ч. Затем 12-ти часовая культура микроорганизмов разводится в изотоническом растворе и по 0,1 мл бактериальной суспензии вносится в пробирки с 3 мл растопленного 0,6 % LB-среды агаризованной (конечная концентрация 10^{-7} КОЕ/мл) и 0,1 мл раствора исследуемого соединения в различных концентрациях. Полученный раствор перемешивается и наслаивается на 2% LB-среду агаризованную в чашки Петри. Для негативного контроля вместо исследуемого соединения добавляется 0,1 мл растворителя (ДМСО). Посевы инкубируются в течение 24 ч при 37 °С. Затем подсчитывается число колоний выросших (КОЕ) на опытных и контрольных чашках Петри. Для оценки токсичности исследуемых соединений используется критерий «выживаемость» формула (1):

$$\text{Выживаемость (\%)} = \frac{\text{Число КОЕ/чашка в опыте}}{\text{Число КОЕ/чашка в контроле}} \times 100, \quad (1)$$

Известно, что исследуемые образцы считаются нетоксичными, если выживаемость бактерий при их воздействии составляет $\geq 50\%$ [355].

2.7.2. Полуколичественный метод учета генных мутаций (тест Эймса)

Тест Эймса позволяет оценить мутагенный потенциал исследуемых факторов по индукции генных мутаций в специальных тест-штаммах. Все исследованные Эймсом тест-штаммы получены из *S.typhimurium* дикого типа LT2 [355]. В настоящей работе использовались ауксотрофные по гистидину, за счет точечной мутации в гистидиновом опероне, штаммы *Salmonella typhimurium*,

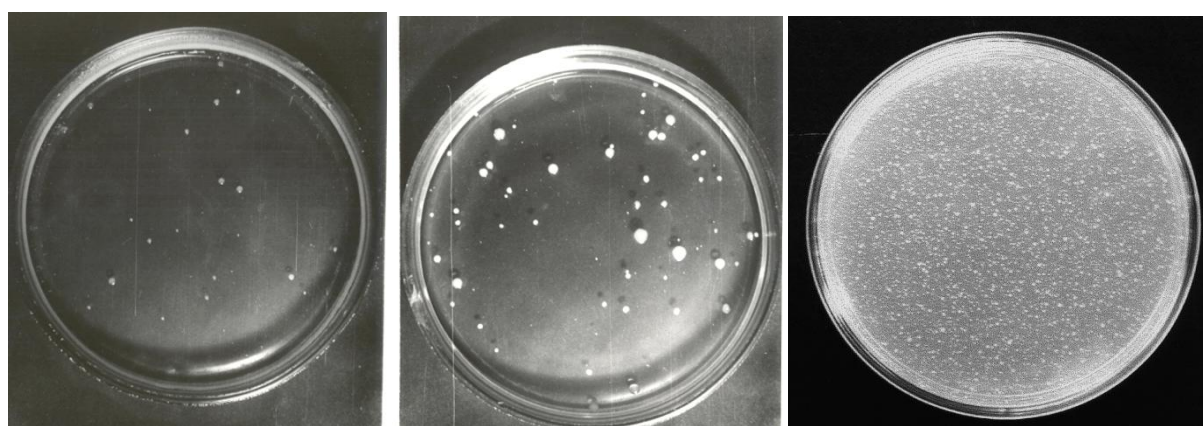
которые под действием мутагенов способны ревертировать к прототрофности путем замены пар оснований. Мутационные реверсии гена *uvr* В приводит к нарушениям в процессе эксцизионной репарации. При *rfa* мутации происходят нарушения в синтезе липополисахаридов, что приводит к повышению проницаемости клеточной стенки и облегчению проникновения мутагена. Тест-штамм также имеет плазмиду устойчивости к ампицилину рКМ 101, имеющую в своем составе ген *umi* С, что увеличивает вклад ошибочной репарации в процесс мутагенеза и, следовательно, чувствительность штамма [186].

В тесте используются избирательные среды, на которых способны расти только прототрофные по гистидину мутанты данных штаммов. Мутационные изменения без внешних воздействий происходят достаточно редко. Добавление же в селективную среду мутагена увеличивает частоту возникновения мутаций, что регистрируется по увеличению числа колоний мутантов (His^+ ревертантов), выросших на используемой избирательной среде.

Чистая культура тест-штамма *Salmonella typhimurium* TA100 со скошенного агара (LB-среда агаризованная) переносится в 5 мл LB-бульона с ампициллином (50 мкг/мл) и культивируется при 37 °С 24 часа. В день проведения исследования 5 мл «ночной» культуры переносится в 20 мл свежего LB-бульона с ампициллином (50 мкг/мл) и культивируется при 37 °С в течение 2-2,5 ч до достижения экспоненциальной фазы роста (плотность суспензии $1-2 \times 10^9$ КОЕ/мл). Затем культуру переносится в стерильные центрифужные пробирки и центрифугируется 20 мин при 5000 об/мин. Полученный осадок ресуспендируется в растворе солевого концентрата, разведенного 1:4. По 3 мл 0,6 % верхнего агара с микродобавками биотина и гистидина разливается в пробирки и ставится на водяную баню при температуре 45 °С. В стерильные чашки Петри разливается нижний агар. В верхний агар вносятся по 0,1 мл бактериальной суспензии и 0,1 мл раствора исследуемого соединения разной концентрации, все перемешивается, и наслаивается на нижний избирательный агар. Для негативного контроля в слой верхнего агара добавляется 0,1 мл растворителя (ДМСО). В позитивный контроль вносится 0,1 мл раствора мутагена – азида натрия (10 мкг/чашка).

Чашки с посевами, после полного застывания агара, инкубируются при 37 °С. Учет результатов проводится через 48 ч инкубирования по индукции обратных мутаций к гистидиновой прототрофности. Подсчитывали и сравнивается число колоний (КОЕHis⁺ревертанты/чашка), выросших в присутствии исследуемых соединений и в негативном контроле (рисунок 2.3).

Согласно рекомендациям по проведению теста Эймса, исследуемые соединения расцениваются как мутагенные, если число колоний-ревертантов, выросших в их присутствии, достоверно превышает число колоний-ревертантов в негативном контроле более чем в 2 раза [377].



А

Б

В

Рисунок 2.3 – Колонии ревертантов *Salmonella typhimurium* TA 100 в негативном контроле (А), в опытном варианте (Б) и в позитивном контроле (азид натрия, 2,5 мкг/чашку) (В)

В работе использовалась следующая система оценки соединений на наличие мутагенной активности [147]:

- отсутствие мутагенной активности – КОЕ His⁺ревертантов/чашка, выросших в присутствии исследуемого соединения, и в негативном контроле достоверно различается менее чем в 2,5 раза;

- слабая мутагенная активность – КОЕ His⁺ревертантов/чашка, выросших в присутствии исследуемого соединения, от 2,5 до 10 раз превышает число колоний-ревертантов в негативном контроле;

- средняя мутагенная активность – КОЕ His⁺ревертантов/чашка, выросших в присутствии исследуемого соединения, от 10 до 100 раз превышает число колоний-ревертантов в негативном контроле;

- сильная мутагенная активность – КОЕ His⁺ревертантов/чашка, выросших в присутствии исследуемого соединения превышает спонтанный фон мутирования (негативный контроль) более чем в 100 раз.

2.8. SOS-хромотест

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 [117].

В настоящей работе для оценки SOS-индуцирующей активности соединений использован SOS-хромотест, предложенный в 1982 г. Philippe Quillardet с коллегами. В процессе исследования использовалась тест-система, в которой индукцию SOS-оперонов в присутствии различных концентраций исследуемого вещества оценивают по абсолютному значению активности β -галактозидазы [407].

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 активность β -галактозидазы, которая оценивается относительно активности конститутивного фермента

микроорганизмов – щелочной фосфатазы, что позволяет контролировать также токсический эффект исследуемых соединений на клетки бактерий [407].

Этапы культивирования тест-штамма:

- культура тест-штамма *E.coli* PQ37 со скошенного агара переносится бактериологической петлей в пробирку, содержащую 5 мл LB-бульона с ампициллином (20 мкг/мл), и культивируется 12 ч при 37 °С;
- 12-часовая «ночную» культура тест-штамма *E.coli* PQ37 разводится в отношении 1/3 свежим LB-бульоном с ампициллином (20 мкг/мл) и подращивается при 37 °С с аэрацией (это необходимо для достижения экспоненциальной фазы роста (оптическая плотность суспензии должна соответствовать 0,4 ед. при 600 нм);
- бактериальная суспензия разливается по 0,9 мл в пробирки, содержащие 100 мкл раствора исследуемого соединения в разных концентрациях;
- бактериальная суспензия разливается по 0,9 мл в пробирки, содержащие ДМСО («негативный контроль»);
- бактериальная суспензия разливается по 0,9 мл в пробирки, содержащие раствора мутагена митомицин С (10 мкг/мл) (заведомо известный индуктор SOS-ответа клетки, «позитивный контроль»);
- пробы инкубируются при 37 °С 24ч;
- определяется активность ферментов щелочная фосфатаза и β -галактозидаза.

2.8.1. Определение щелочной фосфатазы

Активность щелочной фосфатазы определяет влияние исследуемого соединения на выживаемость клеток.

Этапы определения активности фермента щелочная фосфатаза:

- бактериальная суспензия в объеме 300 мл смешивается с 2,7 мл Т-буфера;
- измеряется оптическую плотность раствора при длине волны 600 нм (спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Japan);

- в пробирки (для разрушения клеток) добавляется 0,15 мл хлороформа и 0,1 мл 0.1% SDS (додецилсульфат натрия);
- полученная смесь инкубируется на водяной бане 5 мин при 28 °С;
- в пробирки с лизатами клеток добавляется 600 мкл раствор *p*-нитрофенилфосфата (4 мг/мл в Т-буфере);
- полученная смесь инкубируют 30 мин при комнатной температуре;
- к смеси добавляется 1 мл 2М HCl (для остановки реакции);
- через 5 мин добавляется 1 мл 2М Tris (для стабилизации окраски)
- измеряется оптическая плотность каждой смеси при длинах волн 420 и 550 нм (спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Japan)).

Активность фермента щелочная фосфатаза рассчитывается по формуле (2) [72].

$$A = \frac{D_{420} - 1.75 \times D_{550}}{t \times V \times D_{600}} \times 1000 \quad (2)$$

где, 1.75 – поправочный коэффициент;

D_{420} , D_{550} , D_{600} – соответствующие значения оптической плотности для реакционной смеси;

t – время реакции (мин);

V – объем культуры, взятой для определения (мл).

2.8.2. Определение активности β -галактозидазы

Этапы определения активности фермента β -галактозидаза:

- бактериальная суспензия в объеме 300 мл смешивается с 2,7 мл Т-буфера;
- измеряется оптическую плотность раствора при длине волны 600 нм (спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Japan));
- в пробирки (для разрушения клеток) добавляется 0,15 мл хлороформа и 0,1 мл 0,1% SDS (додецилсульфат натрия);

- полученная смесь инкубируется на водяной бане 5 мин при 28 °С;
- пробирки со смесями сильно встряхивают;
- в пробирки с лизатами клеток добавляется *o*-нитрофенил-галактопиранозид (4 мг/мл в Z-буфере);
- полученная смесь инкубируют 30 мин при комнатной температуре;
- к смеси добавляется 2 мл 1М Na₂CO₃ (для остановки реакции);
- измеряется оптическая плотность каждой смеси при длинах волн 420 и 550 нм (спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Japan)).

Активность фермента β-галактозидаза рассчитывается по формуле (2) [72].

Для количественной оценки SOS-ответа используют показатель IF (фактор индукции SOS-ответа клетки), который определяется по формуле (3) [408]:

$$IF = \frac{R(O)}{R(C)} \quad (3)$$

где,

$$R(O) = \frac{\text{Активность } \beta - \text{галактозидазы в опыте}}{\text{Активность щелочной фосфатазы в опыте}}$$

$$R(C) = \frac{\text{Активность } \beta - \text{галактозидазы в контроле}}{\text{Активность щелочной фосфатазы в контроле}}$$

Фактор индукции SOS-ответа клетки $IF > 2$ свидетельствует о том, что исследуемое соединение обладает способностью повреждать ДНК или ингибировать репликации [366].

2.9. Модель экспериментальной хирургической раневой инфекции *in vivo*

Экспериментальные животные. В качестве экспериментальных животных использовались нелинейные белые мыши обоего пола (массой 18-22 г).

Экспериментальных животных содержали на обычном рационе вивария в боксированных помещениях при температуре окружающей среды 18-20 °С.

Исследуемые микроорганизмы. Бактериальную суспензию *S.aureus* ATCC 43300 и *P.aeruginosa* ATCC 27853 готовили из агаровых культур. Для приготовления инокулюма использовали чистую суточную культуру микроорганизмов, выросших на плотных питательных средах. Отбирали несколько однотипных, четко изолированных колоний, выросших на неселективных плотных питательных средах. Петлей переносили незначительное количество материала с верхушек колоний в пробирку со стерильным физиологическим раствором, доводя плотность инокулюма точно до 0,5 по стандарту Мак-Фарланда (в работе использовали коммерческий стандарт мутности). Инокулюм использовали в течение 15 мин после приготовления.

Экспериментальная рана и инфицирование. За один день до заражения мышей анестезировали внутрибрюшинно инъекцией пентобарбитала натрия (30 мг/кг). Спины мышей тщательно выбривали электрическим триммером с мелким зубцом. В день заражения поверхностные хирургические раны были сделаны на спинах реанестезированных животных посредством продольного срединного разреза $2,3 \pm 0,2$ см в длину и простирающийся до *panniculus carnosus*. Кожа с обеих сторон разреза была разведена, и раны были заражены прямым посевом. После инокуляции микроорганизма раны были временно закрыты небольшими пластырными полосками (Steri-strip, E4541, США), чтобы гарантировать, что раны остаются закрытыми в течение первых 24 часов после инфицирования. Рана в конечном итоге покрывала ≈ 6 % общей поверхности тела мыши [243; 187].

Терапия инфицированных ран. Исследуемые соединения, растворенные в глицерине, и препараты сравнения наносили через 24 ч после инфицирования дважды в день (9.00 и 20.00). После применения вещества осторожно распределяли по поверхности раны пальцем в перчатках.

Количественное определение микроорганизмов. Количественное определение микроорганизмов в ранах проводилось методом поверхностных смывов. В первые, 2-е, 3-е, 4-е, 7-е сутки после инфицирования мышей

подвергали эвтаназии и с помощью стерильных пробирок, содержащих 5 мл стерильной дистиллированной воды, плотно закрывали рану, таким образом, чтобы 90 % ее поверхности было закрыто краями пробирки. Мышь и пробирку в перевернутом виде, удерживаемые в вертикальном положении, встряхивали 25 раз, чтобы удалить имеющиеся микроорганизмы с поверхности раны. Полученную суспензию разбавляли соответствующим образом, а затем высевали на селективные среды, во избежание роста иных микроорганизмов, желточно-солевой агар (молочно-солевой) для *S.aureus*, агар Эндо (агар Клиглера) для *P.aeruginosa*. Высевы инкубировались в течение 24-48 часов при 37 °C после чего проводился подсчет колоний (КОЕ/рана).

Количество микроорганизмов определяли путем гомогенизации инфицированных ран. В первые, 2-е, 3-е, 4-е, 7-е сутки после инфицирования, раны и прилежащие ткани размером 2×2 см вокруг вырезали, и лоскут кожи помещали в питательный бульон и гомогенизировали в течение 3 минут в многофункциональной центрифуге в пробирках для гомогенизации (Хеликон, Москва), для экстрагирования бактерий из зараженной кожи. Супернатант разбавлялся и объемом 0,02 мл с помощью микропипетки инокулировали на вышеуказанные питательные среды. Высевы инкубировались в течение 24-48 часов при 37 °C после чего проводился подсчет колоний (КОЕ/г).

Одной из проблем, с которыми иногда сталкивается модельная инфекция, загрязнение. Как и следовало ожидать, открытые раны иногда загрязнялись грамотрицательными и грамположительными организмами с кожи, шерсти и фекалий. Чтобы исключить потенциальные проблемы при подсчете колоний, которые могли быть вызваны загрязняющими микроорганизмами, использовали селективные среды.

Инфицированные раны часто приводят к генерализации инфекции. С целью оценки системной инфекции животных подвергали эвтаназии. Внутренние органы, такие как печень, селезенку, почки асептически удаляли, промывали в физиологическом растворе, измельчали и инкубировали в питательном бульоне в течение 24-48 часов при 37 °C, а затем рассевали на селективные среды. Высевы

инкубировались в течение 24-48 часов при 37 °С после чего проводился определение наличия тестируемых микроорганизмов. Кровь забирали путем сердечной пункции и высевали непосредственно после забора в питательный бульон, а затем рассеивали на селективные среды. Высевы инкубировались в течение 24-48 часов при 37 °С после чего проводился определение наличия тестируемых микроорганизмов.

Для инаktivации остаточного количества исследуемых соединений и препарата сравнения, питательный бульон разбавляли до такой степени, чтобы концентрации изучаемых противомикробных агентов не ингибировали рост испытуемых микроорганизмов.

После каждого посева проводили определение чувствительности полученных микроорганизмов к исследуемым соединениям методом серийных разведений.

Все культуры *S.aureus* и *P.aeruginosa*, выделенные из крови и органов мышей, были исследованы с помощью бактериологического анализатора, чтобы гарантировать, что выделенные организмы имеют те же свойства, что и используемый для инфицирования штамм.

3.0. Статистическая обработка полученных результатов

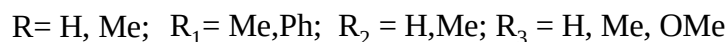
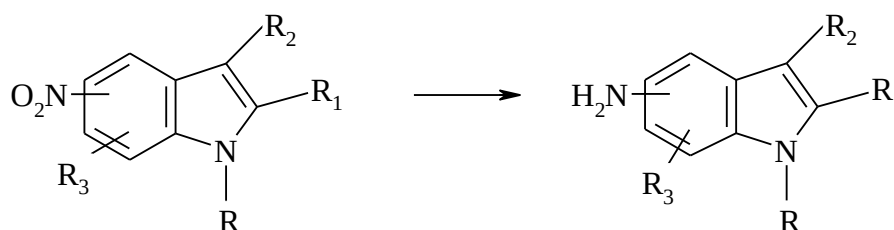
Статистическую обработку полученных результатов проводили методами вариационной статистики, достоверность результатов оценивали с помощью метода определения t-критерия Стьюдента [117; 42]. Данные обрабатывали статистически на Intel Atom N570, применяя программу Stat 6.0. В работе использовали персональный компьютер и стандартный набор программ по статистике.

ГЛАВА 3. СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ЗАМЕЩЕННЫХ 4-АМИНОИНДОЛОВ

3.1. Синтез замещенных индолов, нитроиндолов, аминоиндолов

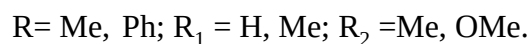
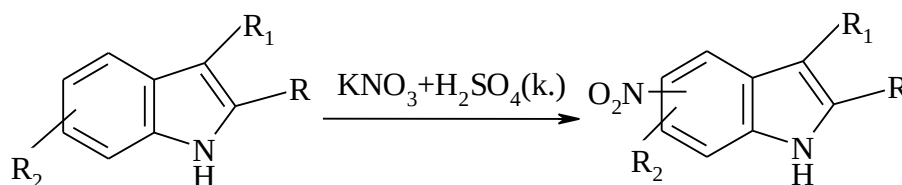
Исходные аминоиндолы получали восстановлением гидразингидратом на активной Ni-Ренея соответствующих нитроиндолов (схема 3.1) [3; 185].

Схема 3.1



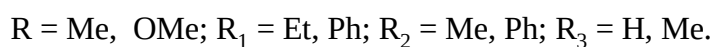
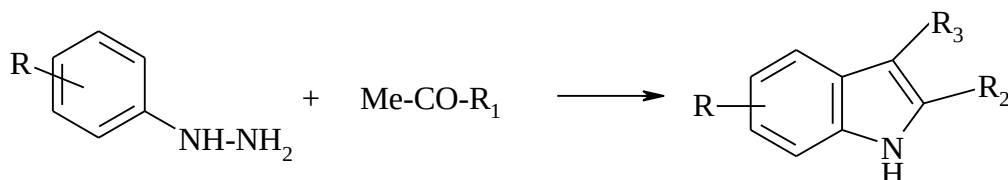
5-,6-Нитроиндолы синтезировали прямым введением нитрогруппы в условиях электрофильного замещения в бензольное кольцо соответствующих индолов (схема 3.2) [3; 185].

Схема 3.2



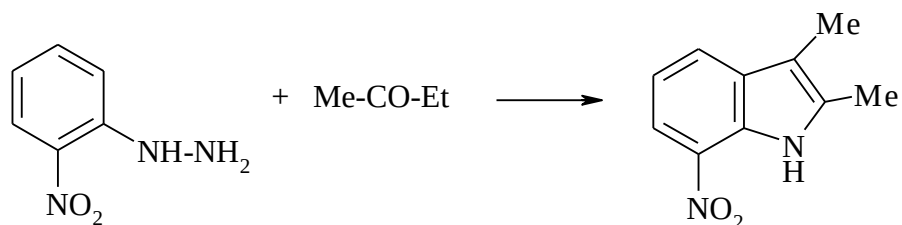
Индолы получали индолизацией по Фишеру фенилгидразина и его производных (схема 3.3).

Схема 3.3



Аналогично из *орто*-нитрофенилгидразина и метилэтилкетона, минуя стадию получения 2,3-диметилиндола, синтезировали 2,3-диметил-7-нитроиндол (схема 3.4).

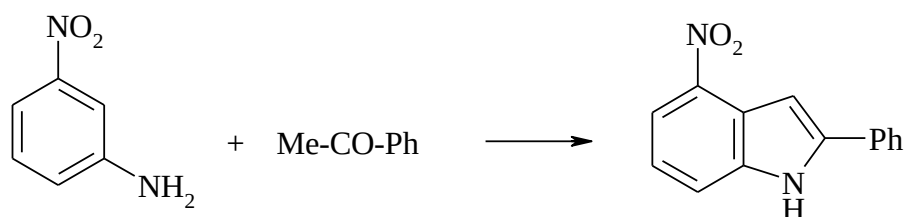
Схема 3.4



Способы синтеза 4-нитроиндолов, основанные на прямом введении в ядро индола нитрогруппы в условиях электрофильной реакции, для достижения поставленной цели оказались не пригодными. Поэтому в работе использовали реакции нуклеофильной замены водорода ($\text{S}_\text{N}^\text{H}$) в арильных системах. Способ основан на введении остатков различных нуклеофильных групп с дальнейшей гетероциклизацией в конденсированное гетероциклическое соединение с заданным заместителем.

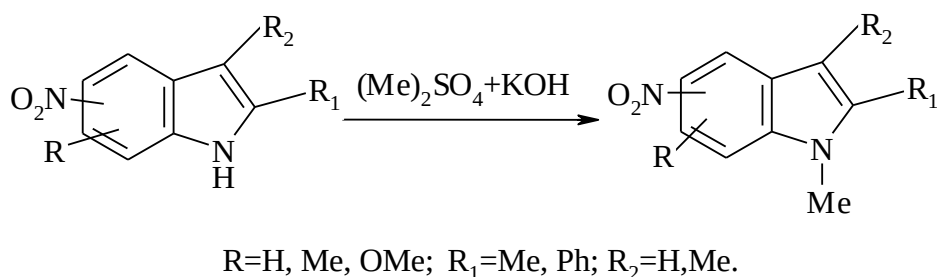
Данный метод был использован нами для получения 4-нитро-2-фенилиндола реакцией взаимодействия *m*-нитроанилина с ацетофеноном в присутствии трет-бутилата калия (сильное основание) (схема 3.5).

Схема 3.5



Метилирование полученных нитроиндолов диметилсульфатом в щелочной среде с хорошим выходом приводило к соответствующим 1-метилнитроиндолам (схема 3.6).

Схема 3.6



Синтезированные в работе аминокислоты (рисунок 3.1) исследовались в реакциях с β -дикетонными соединениями.

При этом в зависимости от структуры аминов и условий проведения реакций были получены определенные соединения: циклические и нециклические амиды, замещенные пирролохинолоны. Структура, биологическая активность исследуемых веществ рассматривалась по признаку подобия в строении исходных аминокислот.

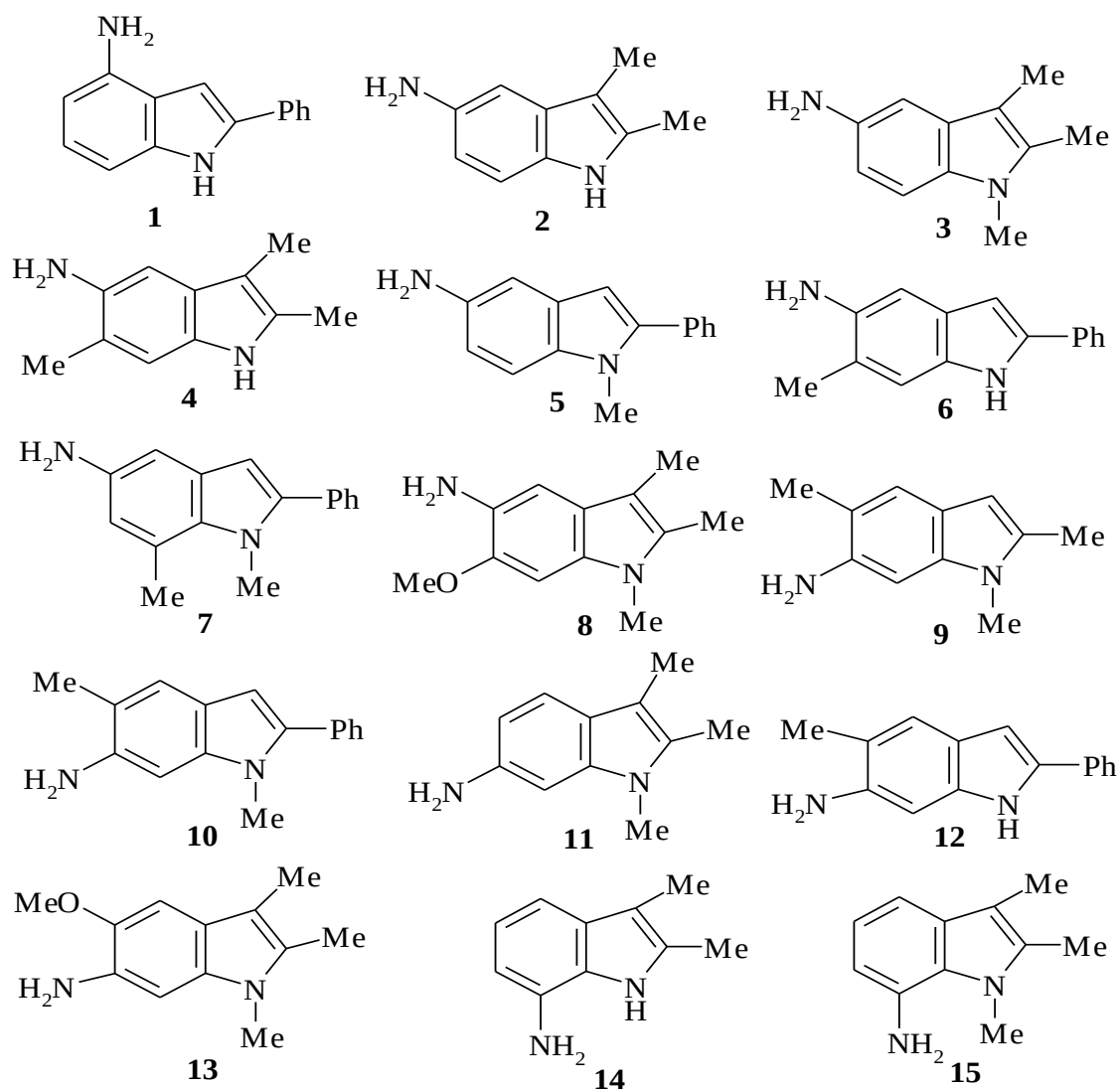
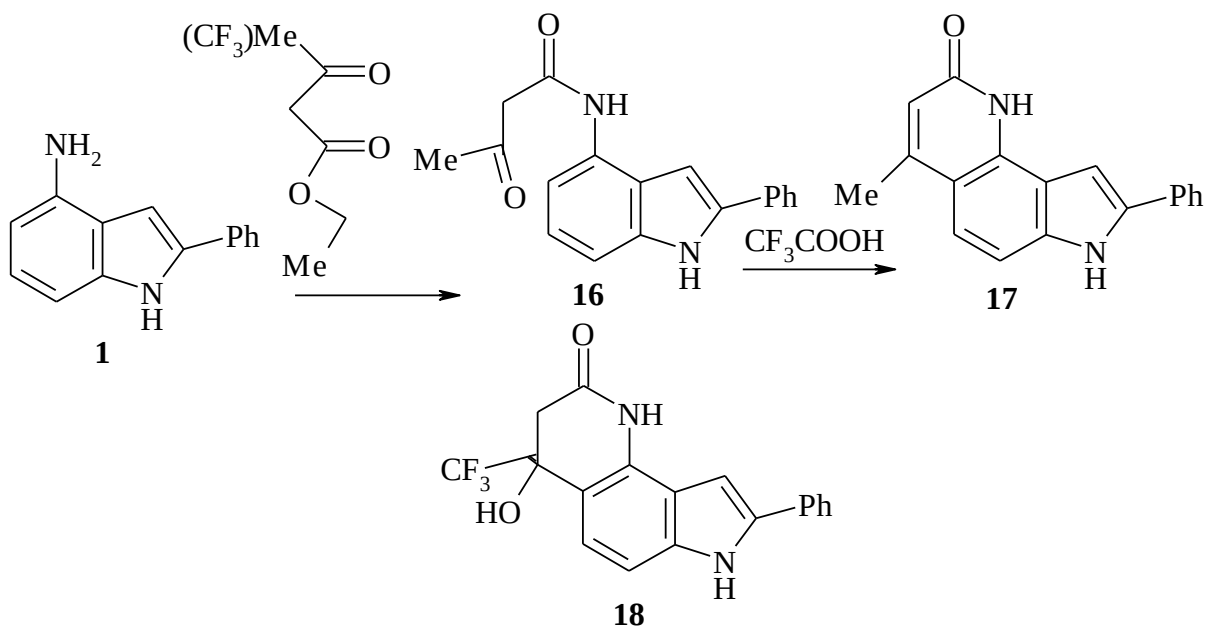


Рисунок 3.1 – Синтезированные исходные амининдолы

3.2. Синтез и биологическая активность соединений на основе 4-амино-2-фенилиндола

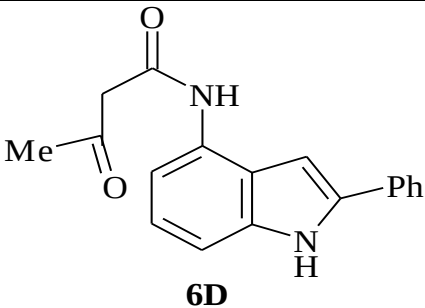
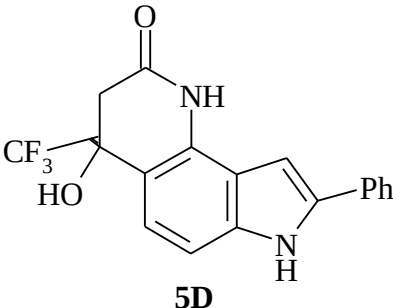
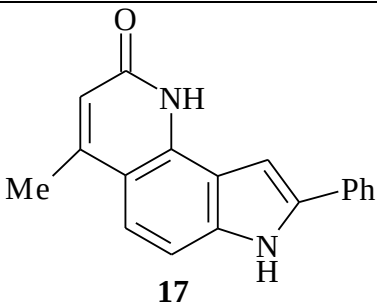
В ходе настоящей работы были исследованы реакции 4-амино-2-фенилиндола (**1**) с β -кетозэфирами (этиловым эфиром ацетоуксусной кислоты, этиловым эфиром трифторацето-уксусной кислоты). При этом были получены новые соединения нециклический амид **16**, пирролохинолон **17**, дигидропирролохинолон **18** (схема 3.7) [3; 185].



На следующем этапе был рассчитан прогноз потенциальной фармакологической активности и токсичности (таблица 3.1). Для прогноза наличия (*Pa*) или отсутствия (*Pi*) активности использовалась компьютерная система прогнозирования биологической активности веществ PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) на основе анализа так называемых обучающих выборок, содержащих десятки тысяч молекул органических веществ различных химических классов, проявляющих множество видов биологической активности [145; 495; 146]. В своей работе мы использовали версию 9.1, зарегистрированную в 2007 году.

Для дальнейшего экспериментального изучения отбирались вещества с вероятностью наличия противомикробной активности в фармакологическом спектре более 50%, т.е. *Pa* более 0,500 вне зависимости от вероятности и прогнозной степени токсичности.

Таблица 3.1 – Внеэкспериментальный прогноз противомикробной активности в ряду производных замещенного 4-амино-2-фенилиндола

Соединение	Структурная формула	<i>Pa</i>
3-Оксо- <i>N</i> -(2-фенил-1 <i>H</i> -индол-4-ил)бутанамид (16-6D)	 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)	 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)	 17	0,611

Проведено исследование противомикробной активности новых соединений 3-оксо-*N*-(2-фенил-1*H*-индол-4-ил)бутанамид (**16**, лабораторный шифр **6D**), 4-гидрокси-8-фенил-4-(трифторметил)-1,3,4,7-тетрагидро-2*H*-пирроло[2,3-*h*]-хинолин-2-он (**18**, лабораторный шифр **5D**) и 4-метил-8-фенил-1,7-дигидро-2*H*-пирроло[2,3-*h*]-хинолин-2-он (**17**, лабораторный шифр **17**) [465].

Относительно тест-штаммов микроорганизмов при исследовании методом серийных разведений в МХБ соединение с лабораторным шифром **17** проявило следующую активность: для *S.aureus* 25923 ATCC, *E.coli* 25922 ATCC,

P.aeruginosa 27853 ATCC, *S.pyogenes* 1238 ATCC, *B.cereus* 96 МПК исследуемого соединения составили более 250 мкг/мл (таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению 17 (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	++	++	++	++	++
	125,0	++	++	++	++	++
	62,5	+++	+++	+++	++	++
	31,3	+++	+++	+++	+++	+++
	15,7	+++	+++	+++	+++	+++
	7,9	+++	+++	+++	+++	+++
	3,9	+++	+++	+++	+++	+++
	1,96	+++	+++	+++	+++	+++
	0,98	+++	+++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

При нагрузке 500 мкг/диск в ДДМ исследуемое соединение **17** значимой задержки роста не вызывало в отношении исследуемых тест-штаммов, как грамположительных (*S.aureus* 906, *S.aureus* 43300 ATCC, *S.pyogenes* 19615 ATCC, *S.pneumoniae* 49619 ATCC, *E.faecalis* 19433 ATCC), так и грамотрицательных микроорганизмов (*E.coli* M-17, *S.enteritidis* 5765 ATCC, *S.sonnei* S-форма,

C.freundii 101/57, *K.pneumoniae* 13883, *P.vulgaris* «Цветков», *P.aeruginosa* 453) (таблица 3.3).

Таблица 3.3 – Антибактериальная активность соединения 17 относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения 17
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	14	малоактивно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	13	малоактивно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	14	малоактивно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	14	малоактивно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433 ATCC	12	малоактивно
<i>Escherichia coli</i> M-17	13	малоактивно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	11	малоактивно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма	11	малоактивно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	12	малоактивно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 ATCC	11	малоактивно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	11	малоактивно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	13	малоактивно

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

Это свидетельствует о том, что соединение с лабораторным шифром 17 малоактивно в отношении исследованных грамположительных и грамотрицательных тест-штаммов микроорганизмов *in vitro*.

По отношению к тест-штаммам микроорганизмов амид с лабораторным шифром 6D проявил следующую активность: для *S.aureus* 25922 ATCC, *E.coli* 25922 ATCC, *P.aeruginosa* 27853 ATCC, *S.pyogenes* 1238 ATCC, *B.cereus* 96 МПК исследуемого соединения составили более 250 мкг/мл (таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению 6D (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	++	++	++	++	++
	125,0	+++	+++	+++	++	++
	62,5	+++	+++	+++	+++	+++
	31,3	+++	+++	+++	+++	+++
	15,7	+++	+++	+++	+++	+++
	7,9	+++	+++	+++	+++	+++
	3,9	+++	+++	+++	+++	+++
	1,96	+++	+++	+++	+++	+++
	0,98	+++	+++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

При нагрузке 500 мкг/диск в ДДМ исследуемое соединение **6D** значимой задержки роста не вызывало, как в отношении грамположительных (*S.aureus* 906, *S.aureus* 43300 ATCC, *S.pyogenes* 19615 ATCC, *S.pneumoniae* 49619 ATCC, *E.faecalis* 19433 ATCC), так и грамотрицательных исследуемых тест-штаммов микроорганизмов (*E. coli* M-17, *S.enteritidis* 5765 ATCC, *S.sonnei* S-форма, *C.freundii* 101/57, *K.pneumoniae* 13883 ATCC, *P.vulgaris* «Цветков», *P.aeruginosa* 453) (таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Антибактериальная активность соединения 6D относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста	Активность соединения 6D
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	14	малоактивно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	13	малоактивно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	15	малоактивно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	13	малоактивно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433 ATCC	12	малоактивно
<i>Escherichia coli</i> M-17	14	малоактивно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	13	малоактивно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма	12	малоактивно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	12	малоактивно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 ATCC	13	малоактивно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	11	малоактивно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	13	малоактивно

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

Из проведенного исследования следует, что соединение с лабораторным шифром **6D** малоактивно в отношении исследованных грамположительных и грамотрицательных тест-штаммов микроорганизмов *in vitro*.

Относительно тест-штаммов микроорганизмов циклический амид с лабораторным шифром **5D** проявил следующую активность: для *S.aureus* 225922 ATCC МПК исследуемого соединения составила 7,8 мкг/мл, для *E.coli* 25922 ATCC – 125 мкг/мл, для *P.aeruginosa* 27853 ATCC – более 250 мкг/мл, для *S.pyogenes* 1238 ATCC – 31,25 мкг/мл, *B.cereus* 96 – 62,5 мкг/мл (таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению 5D (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	0	+/-	++	+/-	+/-
	125,0	+/-	+/- ¹	+++	+/-	+/-
	62,5	+/-	+	+++	+/-	+/- ¹
	31,3	+/-	+	+++	+/- ¹	+
	15,7	+/-	++	+++	+	+
	7,9	+/- ¹	++	+++	+	++
	3,9	+	+++	+++	++	++
	1,96	++	+++	+++	++	+++
	0,98	++	+++	+++	++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

Изучаемое соединение при нагрузке 16 мкг/диск вызывало задержку роста исследуемого грамположительного тест-штамма *S.aureus* 906 и метициллинрезистентного штамма *S.aureus* 43300 ATCC. При содержании 62,5 мкг/диск задерживало рост исследуемых грамположительных тест-штаммов *E.faecalis* в диаметре 16 мм, *S.pyogenes* 19615 ATCC до 16 мм и *S.pneumoniae* 49619 ATCC до 18 мм. При нагрузке исследуемого соединения 250 мкг/диск наблюдалась задержка роста тест-штамма *E.coli* в диаметре 16 мм. Значимой задержки роста тест-штаммов *S.enteritidis*, *S.sonnei*, *K.pneumoniae*, *C.freundii*, *P.vulgaris*, *P.aeruginosa* не наблюдалось (таблица 3.7).

Таблица 3.7 – Антибактериальная активность соединения 5D относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения 5D
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	18	активно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	16	активно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	16	активно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	18	активно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433 ATCC	16	активно
<i>Escherichia coli</i> M-17	16	активно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	13	малоактивно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма	14	малоактивно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	13	малоактивно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 ATCC	15	малоактивно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	13	малоактивно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	14	малоактивно

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

Опытные штаммы микроорганизмов оказались более чувствительны к исследуемому препарату. Циклический амид 5D оказался активен относительно опытных штаммов *Staphylococcus spp.* (n=19 из 23 исследованных), *Streptococcus spp.* (n=54 из 65 исследованных), проявил способность задерживать рост опытных штаммов *Enterococcus spp.* (n=11 из 16 исследованных). Значимую чувствительность к данному соединению показали опытные штаммы *B.cereus* (n=5 из 6 исследованных). Опытные штаммы *E.coli* (n=9 из 11 исследованных), *S.enteritidis* (n=4 из 6 исследованных), *Enterobacter spp.* (n=12 из 15 исследованных) при нагрузке 250 мкг/диск исследуемого соединения давали задержку роста от 17 до 19 мм в диаметре. Опытные штаммы грамотрицательных

микроорганизмов *Proteus spp.* (n=14), *P.aeruginosa* (n=7) оказались малочувствительны к изучаемому амиду (таблица 3.8).

Таблица 3.8 – Антибактериальная активность соединения 5D относительно опытных штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Штамм микроорганизма	Зона задержки роста / Количество штаммов микроорганизмов			
	≤ 10 мм	11-15 мм	16-25 мм	≥ 25 мм
<i>Streptococcus mitis</i> (n=13)	-	3	8	2
<i>Streptococcus agalactiae</i> (n=9)	-	2	6	1
<i>Streptococcus uberis</i> (n=10)	-	1	8	1
<i>Streptococcus salivarius</i> (n=9)	-	2	6	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=11)	-	2	7	2
<i>Streptococcus pyogenes</i> (n=13)	-	1	9	3
Штаммов <i>Streptococcus spp.</i> (n=65)	-	11	44	10
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=15)	-	2	11	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=8)	-	2	6	-
Штаммов <i>Staphylococcus spp.</i> (n=23)	-	4	17	2
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=8)	-	1	7	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=7)	-	2	5	-
Штаммов <i>Enterobacter spp.</i> (n=15)	-	3	12	-
<i>Enterococcus faecium</i> (n=9)	-	3	6	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=7)	-	2	5	-
Штаммов <i>Enterococcus spp.</i> (n=16)	-	5	11	-
<i>Proteus vulgaris</i> (n=8)	3	5	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> (n=6)	2	4	-	-
Штаммов <i>Proteus spp.</i> (n=14)	5	9	-	-
<i>Bacillus cereus</i> (n=6)	-	1	4	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=7)	-	2	5	-
<i>Salmonella enteritidis</i> (n=6)	-	2	4	-
<i>Escherichia coli</i> (n=11)	-	2	9	-
<i>Citrobacter freundii</i> (n=10)	-	3	7	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=7)	2	5	-	-

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

Полученные данные свидетельствуют о способности подавлять рост исследуемых микроорганизмов *in vitro* и о наличии высокой антибактериальной активности соединения **5D** в отношении изученных тест-штаммов и опытных штаммов грамположительных микроорганизмов, а так же способности вызывать задержку роста грамотрицательных микроорганизмов, в частности *E.coli*, *S.enteritidis*, *C.freundii*, *E.cloaceae*, *E.aerogenes*, *K.pneumoniae*.

МПК соединения **5D** для опытных штаммов *S.aureus* составило 3,9-500 мкг/мл, *E.coli* – 62,5-1000 мкг/мл, *S.pyogenes* – 31,25-750 мкг/мл, *B.cereus* – 62,5-1000 мкг/мл (таблица 3.9).

Таблица 3.9 – Показатели МПК соединения 5D для опытных штаммов микроорганизмов (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Штамм микроорганизма	МПК (мкг/мл)									
	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125,0	250,0	500,0	750,0	1000,0
<i>S.pyogenes</i> (n=33)	0	0	0	3	19	5	5	0	1	0
<i>S.mitis</i> (n=25)	0	0	0	0	13	4	7	1	0	0
<i>S.agalactiae</i> (n=31)	0	0	0	1	9	10	6	4	1	0
<i>S.bovis</i> (n=20)	0	0	0	0	5	7	3	5	0	0
<i>S.uberis</i> (n=28)	0	0	0	1	10	8	5	3	1	0
<i>S.salivarius</i> (n=26)	0	0	0	0	8	11	6	1	0	0
<i>S.sanguinis</i> (n=30)	0	0	0	1	7	15	4	2	1	0
<i>S.mutans</i> (n=27)	0	0	0	0	9	10	4	3	1	0
<i>S.pneumoniae</i> (n=25)	0	0	0	2	8	11	2	2	0	0
Штаммов <i>Streptococcus spp.</i> (n=245)	0	0	0	8	88	81	42	21	5	0
<i>S.aureus</i> (n=52)	4	27	7	6	6	0	1	1	0	0
<i>S.epidermidis</i> (n=37)	3	18	7	4	3	1	1	0	0	0
<i>S.haemolyticus</i> (n=32)	0	11	9	5	4	0	2	1	0	0
Штаммов <i>Staphylococcus spp.</i> (n=121)	7	56	23	15	13	1	4	2	0	0
<i>B.cereus</i> (n=16)	0	0	0	0	9	3	1	1	1	1
<i>E.coli</i> (n=32)	0	0	0	0	3	17	4	6	1	1

Опытные штаммы микроорганизмов оказались более чувствительны к исследуемому препарату. 7 штаммов из 121 *Staphylococcus spp.* были чувствительны к циклическому амиду **5D** в дозе 3,9 мкг/мл. 3 штамма из 32 *E.coli* также оказался чувствителен к изучаемому амиду **5D** в дозе 62,5 мкг/мл. Наибольшее число штаммов *Staphylococcus spp.* были чувствительны к исследуемому соединению в дозах 7,8 (n=56) и 15,6 мкг/мл (n=23), штаммы *Streptococcus spp.* в дозе 31,25 мкг/мл (n=8), 62,5 мкг/мл (n=88) и 125,0 мкг/мл (n=81), штаммы *E.coli* (n=17 из 32 исследованных) в дозе 125,0 мкг/мл, *B.cereus* (n=9 из 16 исследованных) – 62,5 мкг/мл. В исследовании участвовали штаммы *S.aureus* устойчивые к азтреонаму (n=1 с МПК 16 мкг/мл, n=1 с МПК 64 мкг/мл), амоксициллин/клавуланату (n=3 с МПК 16 мкг/мл), ампициллину (n=19 с МПК 16 мкг/мл, n=8 с МПК 32 мкг/мл), ванкомицину (n=16 с МПК 16 мкг/мл, n=5 с МПК 32 мкг/мл, n=5 с МПК 64 мкг/мл), гентамицину (n=10 с МПК 16 мкг/мл, n=7 с МПК 32 мкг/мл), нитрофурантоину (n=5 с МПК 128 мкг/мл), хлорамфениколу (n=12 с МПК 32 мкг/мл, n=4 с МПК 64 мкг/мл), цефазолину (n=7 с МПК 32 мкг/мл), цефепиму (n=3 с МПК 16 мкг/мл), цефтриаксону (n=9 с МПК 16 мкг/мл, n=1 с МПК 32 мкг/мл, n=1 с МПК 64 мкг/мл), эртапенему (n=4 с МПК 32 мкг/мл). Изучаемый циклический амид **5D** был активен в отношении этих штаммов в дозах 7,8 и 15,6 мкг/мл. В исследовании участвовали штаммы *S.epidermidis* устойчивые к амикацину (n=1 с МПК 32 мкг/мл), амоксициллин/клавуланату (n=2 с МПК 32 мкг/мл), ампициллину (n=9 с МПК 16 мкг/мл, n=1 с МПК 32 мкг/мл), ванкомицину (n=13 с МПК 8 мкг/мл, n=3 с МПК 64 мкг/мл), гентамицину (n=5 с МПК 16 мкг/мл, n=9 с МПК 32 мкг/мл), левофлоксацину (n=9 с МПК 16 мкг/мл), линезолиду (n=7 с МПК 16 мкг/мл), нитрофурантоину (n=3 с МПК 128 мкг/мл), пенициллину (n=11 с МПК 16 мкг/мл, n=9 с МПК 32 мкг/мл), хлорамфениколу (n=8 с МПК 32 мкг/мл, n=3 с МПК 64 мкг/мл), цефепиму (n=3 с МПК 16 мкг/мл), цефтриаксону (n=9 с МПК 16 мкг/мл), эртапенему (n=6 с МПК 32 мкг/мл). Изучаемый циклический амид **5D** был активен в отношении этих штаммов в дозах 7,8 и 15,6 мкг/мл. Также в исследовании участвовали штаммы *E.coli* устойчивые к пиперациллину (n=17 с МПК 128 мкг/мл), пиперациллин/тазобактаму (n=4 с МПК

128 мкг/мл, n=7 с МПК 256 мкг/мл), тикарциллин/клавуланату (n=14 с МПК 128 мкг/мл, n=1 с МПК 256 мкг/мл), цефтриаксону (n=9 с МПК 128 мкг/мл), нитрофурантоину (n=9 с МПК 128 мкг/мл, n=2 с МПК 256 мкг/мл). Изучаемый циклический амид **5D** был активен в отношении этих штаммов в дозах 62,5 и 125,0 мкг/мл. Изучалась чувствительность опытных штаммов *B.cereus* устойчивых к пиперациллину (n=1 с МПК 128 мкг/мл), пиперациллин/тазобактаму (n=2 с МПК 256 мкг/мл), тикарциллин/клавуланату (n=4 с МПК 128 мкг/мл), нитрофурантоину (n=5 с МПК 128 мкг/мл). Амид с лабораторным шифром **5D** подавлял рост и размножение вышеуказанных штаммов *B.cereus* в дозах 62,5 и 125 мкг/мл.

4-Гидрокси-8-фенил-4-(трифторметил)-1,3,4,7-тетрагидро-2H-пирроло-[2,3-h]хинолин-2-он (**5D**) обладает широким спектром противомикробной активности и выраженной антибактериальной активностью в отношении изученных штаммов грамположительных микроорганизмов *in vitro*, а также противомикробной активностью в отношении изученных грамотрицательных микроорганизмов *in vitro*, за исключением синегнойной палочки. *Staphylococcus aureus* 43300 ATCC (MRSA) чувствителен к исследуемому соединению.

Исследуемый циклический амид **5D** способен замедлять или подавлять рост и размножение клинических штаммов *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.pyogenes*, *S.pneumoniae*, *S.salivarius*, *S.uberis*, *S.mitis*, *S.agalactiae*, *E. faecalis*, *E.faecium*, *B.cereus*, *E.coli*, *S.enteritidis*, *C.freundii*, *E.cloacae*, *E.aerogenes*, *K.pneumoniae*.

В результате исследования группы соединений, полученных на основе замещенного 4-амино-фенилиндола оказалось, что соединение с лабораторным шифром **5D** (циклический амид), является наиболее активным в данной группе. Обладает выраженной активностью в отношении грамположительных кокков, представителей родов *Staphylococcus*, в том числе MRSA штаммов, *Streptococcus*, *Enterococcus*, подавляет рост грамотрицательных микроорганизмов, представителей рода семейства *Enterobacteriaceae* родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* и *Klebsiella*, но малоактивно в отношении *P.vulgaris*, *P.mirabilis* и *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*. Соединение с лабораторным шифром **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.

В рамках дальнейшего исследования биологических свойств была исследована острая токсичность 4-гидрокси-8-фенил-4-(трифторметил)-1,3,4,7-тетрагидро-2*H*-пирроло[2,3-*h*]хинолин-2-она (лабораторный шифр **5D**).

При внутрибрюшинном введении соединения с лабораторным шифром **5D** для самцов мышей LD₅₀ составила 964 (796÷1166) мг/кг, LD₁₆ – 716 мг/кг, LD₈₄ – 1234 мг/кг, для самок мышей LD₅₀ – 859 (709÷1039) мг/кг, LD₁₆ – 658 мг/кг, LD₈₄ – 1197 мг/кг. Для самцов крыс LD₅₀ составила 721 (605÷857) мг/кг, LD₁₆ – 565 мг/кг, LD₈₄ – 899 мг/кг, для самок мышей LD₅₀ – 690 (580÷800) мг/кг, LD₁₆ – 510 мг/кг, LD₈₄ – 897 мг/кг.

Перед гибелью животных, через 15-20 мин после введения исследуемого соединения, наблюдалось общее угнетенное состояние животных, снижение двигательной активности, дыхание становилось частым и поверхностным, затем глубоким и судорожным. Животные забивались в угол. Иногда наблюдалось повышение рефлекторной возбудимости. Затем симптомы интоксикации нарастали, появлялся тремор, подергивание конечностей, одышка. После приступа тонических судорог животные погибали, принимая боковое положение. При патологоанатомическом вскрытии животных, павших после введения соединения выявлены неспецифические изменения паренхиматозных органов, характеризующие картину острого токсикоза. Точечные кровоизлияния в тканях сердца и легких, увеличение печени, дряблость почек.

При внутривенном введении мышам LD₅₀ для самцов составила 1106 (945÷1294) мг/кг, LD₁₆ – 893 мг/кг, LD₈₄ – 1401 мг/кг, для самок мышей LD₅₀ – 1152 (985÷1348) мг/кг, LD₁₆ – 821 мг/кг, LD₈₄ – 1445 мг/кг. Перед гибелью

животных, через 25-40 мин после введения, наблюдалась сходная картина острого токсикоза. При патологоанатомическом вскрытии регистрировалась гиперемия стенок желудка, двенадцатиперстной кишки и тонкого кишечника, точечные кровоизлияния в тканях печени и почек, капсула почек легко снимается.

При внутрижелудочном введении крысам в дозах от 100 до 2000 мкг/мл соединение **5D** не вызывало гибель экспериментальных животных, вследствие чего определение средней смертельной дозы не представлялось возможным. После введения препарата наблюдалось общее угнетенное состояние, снижение двигательной активности, на звуковые раздражители отмечалось вздрагивание и подпрыгивание на месте. В течении 30-40 мин симптомы повторялись, иногда появлялся тремор, одышка. Затем наблюдалось постепенное восстановление жизненных функций организма животного. По истечении 6-12 часов симптомы исчезали. В течении последующих суток наблюдалось полное восстановление функций. Животные внешне выглядели вполне здоровыми, активно совершали груминг, функционирование органов дыхания становилось полноценным, количество дыхательных движений укладывалось в пределы физиологической нормы. Животные активно потребляли корм и воду. Физиологические отправления без отклонений от нормы. В течении первых двух суток отмечалось некоторое снижение массы, но затем животные прибавляли в весе. Достоверного отличия прибавки в весе животных в контрольной группе и опытной группе не наблюдалось. Патологоанатомическая картина вскрытия выживших экспериментальных животных не отличалась от таковой, у контрольных животных. Макроскопических признаков, свидетельствующих о повреждении желудка, гиперемии, нарушения целостности слизистой оболочки не наблюдалось.

При накожном нанесении исследуемого соединения в дозах от 2000 до 5000 мкг/кг циклический амид **5D** не вызывал гибель животных, вследствие чего определение LD₅₀ при накожном нанесении не представлялось возможным. После нанесения соединения наблюдалось снижение двигательной активности, в первые часы – снижение аппетита. Через 4-5 часов указанные симптомы исчезали.

Отмечалась нормальная координация движений. Животные активно потребляли корм и воду. Физиологические отправления без отклонений от нормы. При патологоанатомическом вскрытии видимых изменений в макроскопической картине не выявлено.

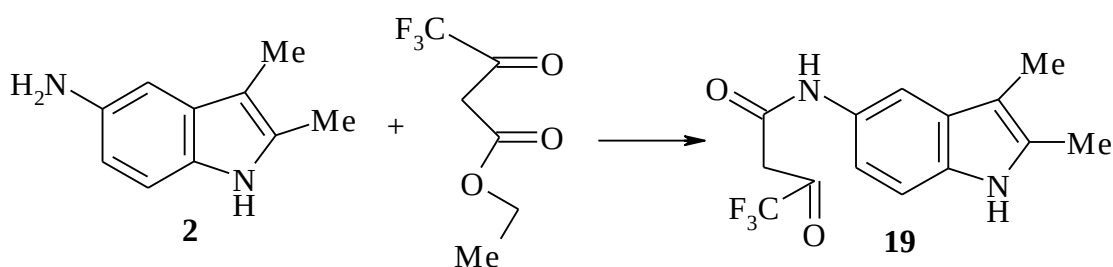
По классификации токсичности веществ [79] изучаемое соединение относится к практически нетоксичным соединениям.

ГЛАВА 4. СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ 5-АМИНОИНДОЛОВ

Реакции различно замещенных 5-аминоиндолов с 4,4,4-трифторацетоуксусным эфиром в термических условиях проходили преимущественно с участием сложноэфирной группы кетоэфира. При этом образовывались соответствующие амиды нециклического строения.

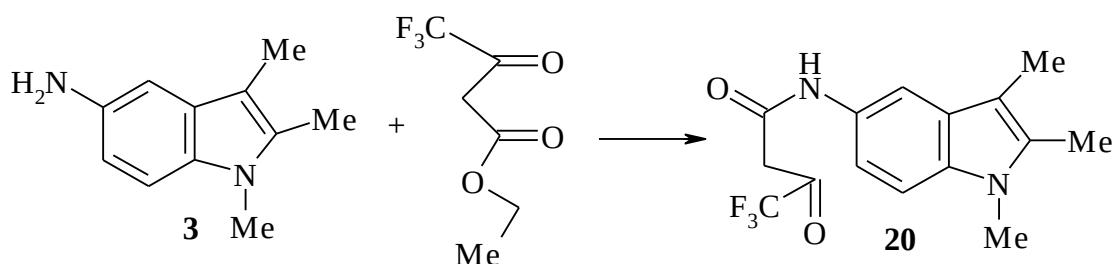
Так, 5-амино-2,3-диметил-индол (**2**) давал в качестве продукта реакции амид **19** – 4,4,4-трифтор-3-оксо-*N*-(2,3-диметил-1*H*-индол-5-ил)бутанамид (лабораторный шифр **3D**) (схема 4.1) [169].

Схема 4.1



Введение метильной группы к пиррольному азоту исходного аминокиндола не изменяло направления превращения, в результате 5-амино-1,2,3-триметилиндола (**3**) превращался в амид **20** – 4,4,4-трифтор-3-оксо-*N*-(1,2,3-триметил-1*H*-индол-5-ил)бутанамид (лабораторный шифр **2D**) (схема 4.2).

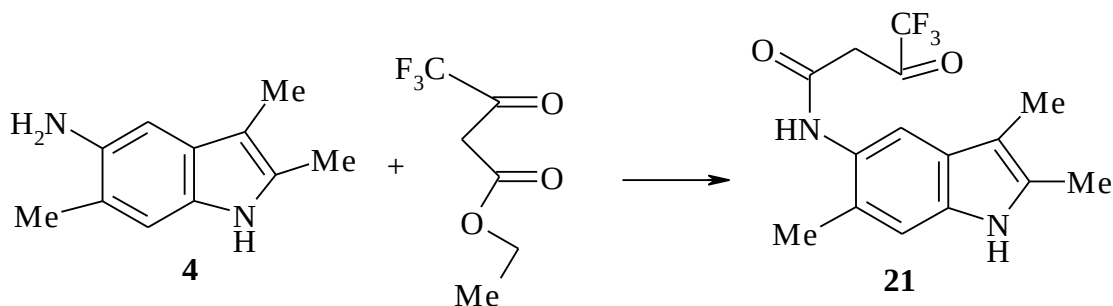
Схема 4.2



Аминокиндол (**4**) с дополнительным метильным заместителем в бензольном кольце при нагревании с трифторукусным эфиром также образовывал

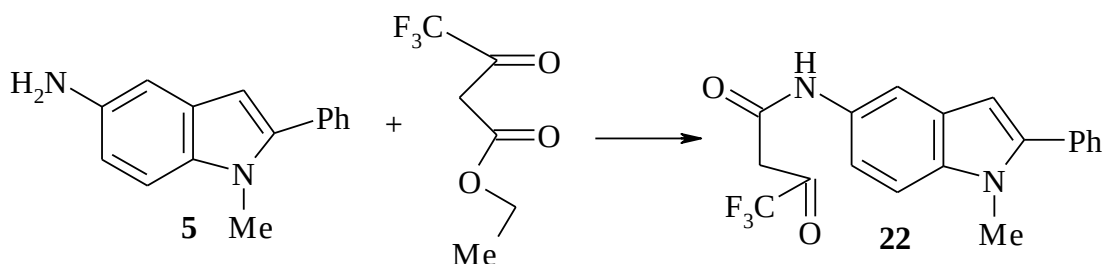
соответствующий амид **21** – 4,4,4-трифтор-*N*-(1-метил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (лабораторный шифр **64D**) (схема 4.3).

Схема 4.3

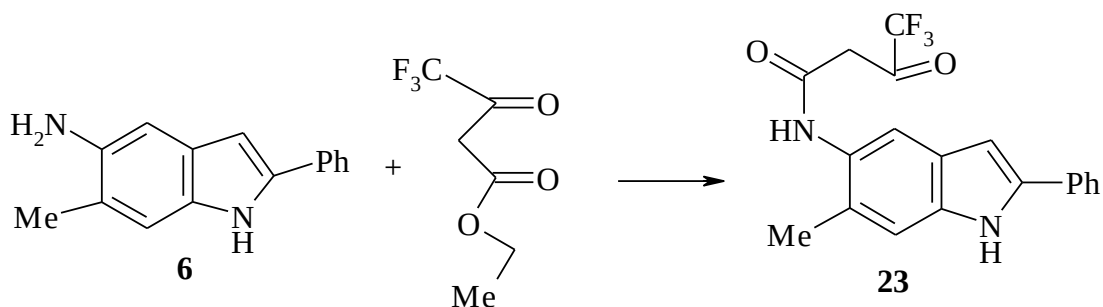


Изменения замещения у пиррольных атомов углерода не влияли на ход реакции. Аминоиндол **5** в этих же условиях превращался в амид **22** – 4,4,4-трифтор-3-оксо-*N*-(2,3,6-триметил-1*H*-индол-5-ил)бутанамид (лабораторный шифр **32D**) (схема 5.4) [172].

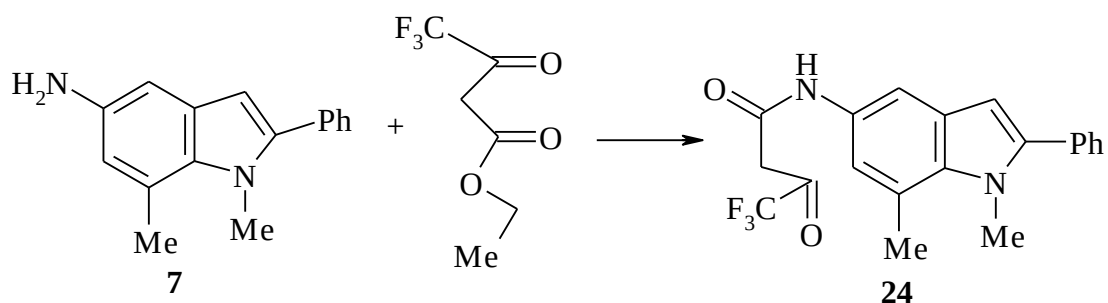
Схема 4.4



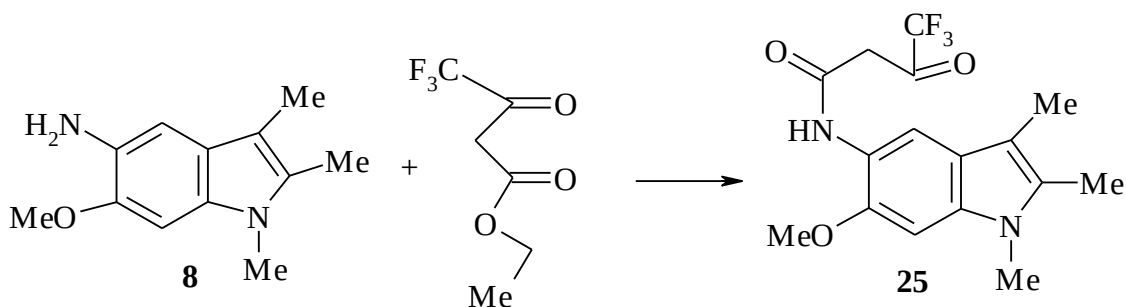
Аналогично 5-амино-6-метил-2-фенилиндол (**6**) в тех же условиях проведения превращения образовывал амид **23** – 4,4,4-трифтор-*N*-(6-метил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (лабораторный шифр **43D**) (схема 4.5).



Изменение места расположения метильной группы в бензольном кольце молекулы амина не влияло на направление реакции. Из 5-амино-7-метил-2-фенилиндолола (**7**) по аналогичной методике был получен амид **24** – *N*-(1,7-диметил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (лабораторный шифр **235D**) (схема 4.6).



Характер заместителя в бензольной части молекулы аминоида также не препятствовал образованию амида **25** – 4,4,4-трифтор-*N*-(6-метокси-1,2,3-триметил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (лабораторный шифр **66D**) из 5-амино-6-метокси-1,2,3-триметилиндолола (**8**) и трифторацетоуксусного эфира (схема 4.7).



В результате исследования обнаружилось, что наряду с образованием нециклических амидов, на основе замещенных 5-аминоиндолов, как основных продуктов реакции, происходит образование побочных соединений – енаминов за счет реализации взаимодействия карбонильной функции кетозфира с аминогруппой индола. Но используя различие в растворимости в неполярных растворителях и хроматографической подвижности, индолиламида легко очищались от примесей индолиленаминов. В ходе химического эксперимента образование циклических амидов из 5-аминоиндолов не зафиксировано.

Замыкание цикла с одновременной ароматизацией наблюдалось лишь для амида **22** в трифторуксусной кислоте. При этом был выделен 1-метил-2-фенил-8-(трифторметил)-1,5-дигидро-6H-пирроло-[2,3-*g*]хинолин-6-он, который под действием диметилсульфата легко превращался в 1,5-диметил-2-фенил-8-трифторметил-1,5-дигидро-6H-пирроло-[2,3-*g*]хинолин-6-он (**26**) – лабораторный шифр **39D** (схема 4.8) [172].

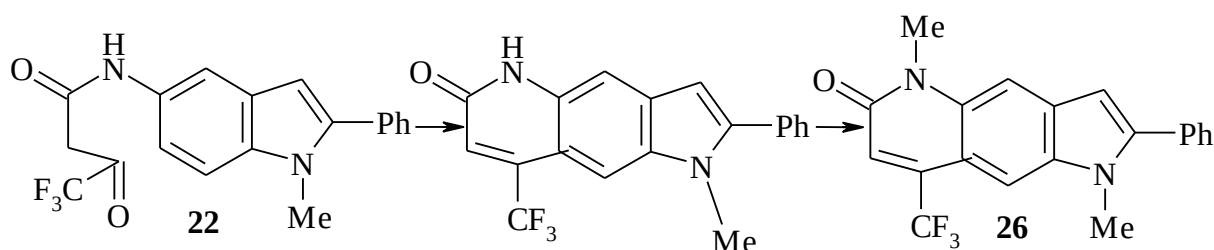
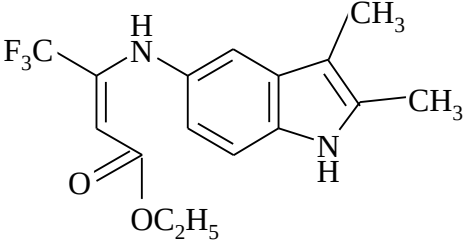
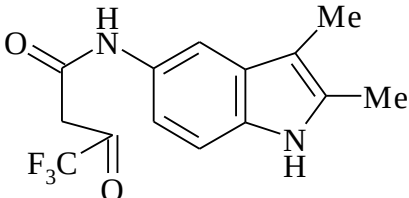
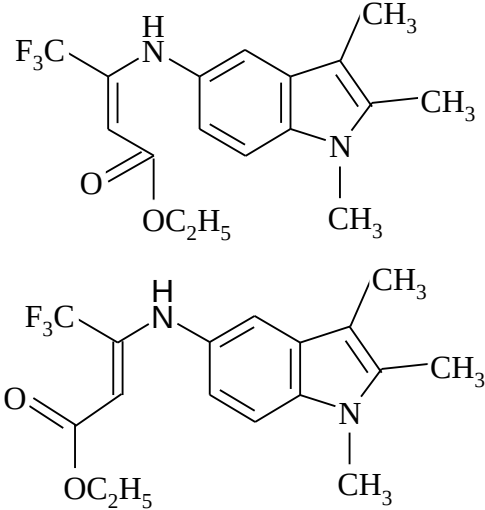
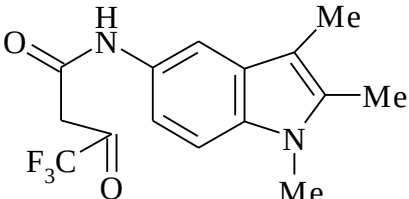
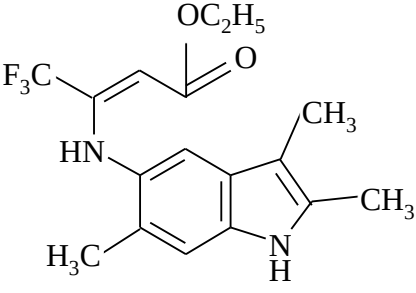
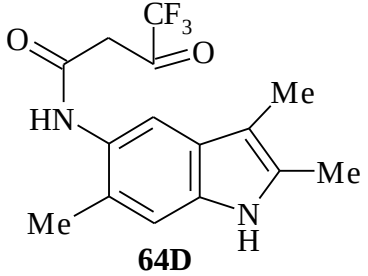
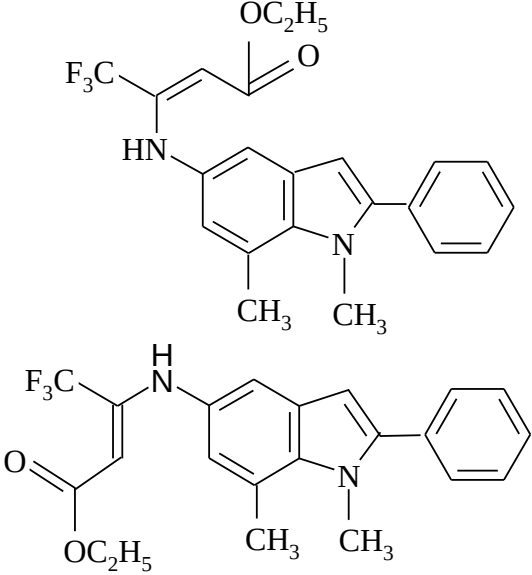
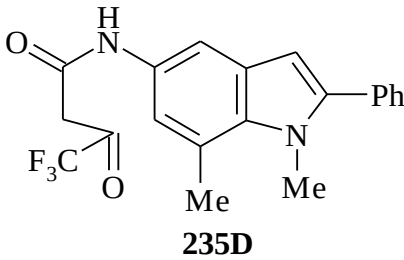
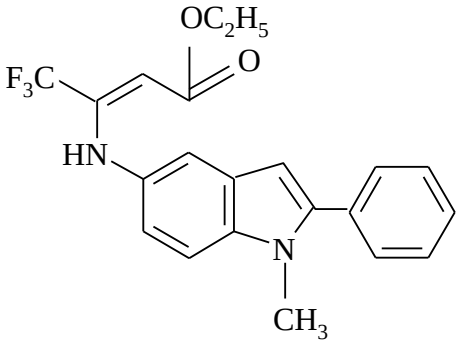
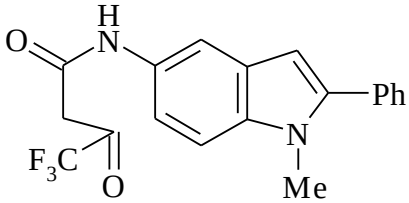
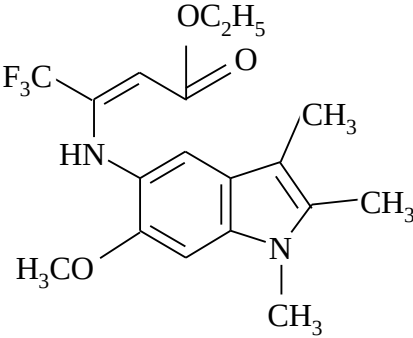
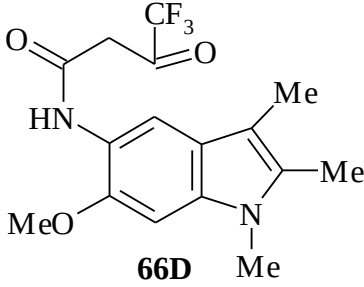
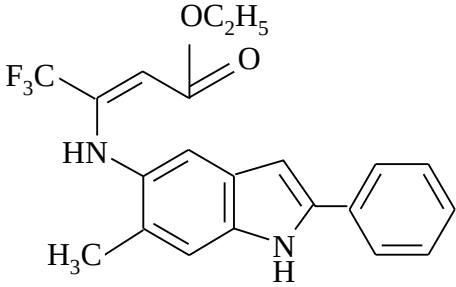
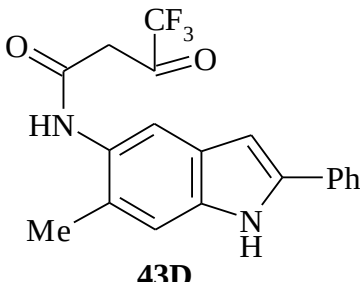
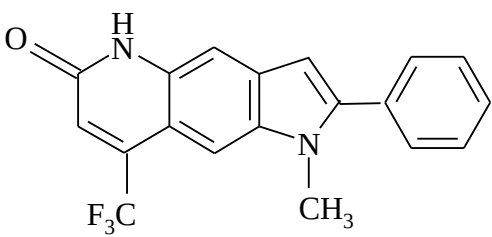
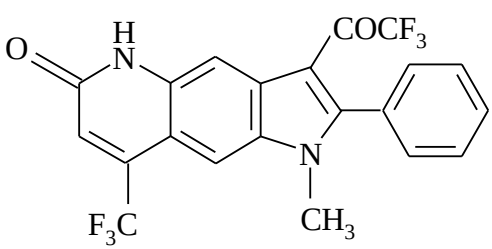
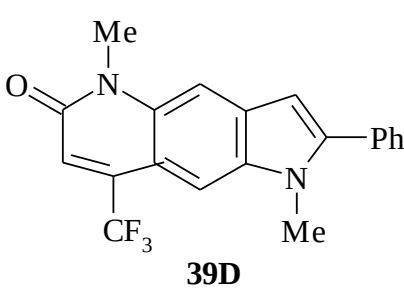


Таблица 4.1 – Внеэкспериментальный прогноз противомикробной активности в ряду производных замещенных 5-аминоиндолов

Соединение	Структурная формула	<i>Pa</i>
1	2	3
Этиловый эфир (<i>Z</i>)-4,4,4-трифтор-3-[(2,3-диметил-1 <i>H</i> -индолил-5)амино]-2-бутеновой кислоты (1с)		0,424
N-(2,3-диметил-1 <i>H</i> -индол-5-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (2с) (19-3D)	 3D	0,624
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 (1d)		0,452
4,4,4-трифтор-3-оксо-N-(1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индол-5-ил)бутанамид (2d) (20-2D)	 2D	0,553

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

1	2	3
Этиловый эфир (Z)-4,4,4-трифтор-3-[(1-метил-2-фенил-1<i>H</i>-индолил-5)-амино]-2-бутеновой кислоты (1h)		0,335
<i>N</i>-(1-метил-2-фенил-1<i>H</i>-индол-5-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (2h) (22-32D)	 32D	0,536
Этиловый эфир (Z)-4,4,4-трифтор-3-[(6-метокси-1,2,3-триметил-1<i>H</i>-индолил-5)-амино]-2-бутеновой кислоты (1i)		0,437
4,4,4-трифтор-<i>N</i>-(6-метокси-1,2,3-триметил-1<i>H</i>-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (2i) (25-66D)	 66D	0,762
Этиловый эфир (Z)-4,4,4-трифтор-3-[(6-метил-2-фенил-1<i>H</i>-индолил-5)-амино]-2-бутеновой кислоты (1k)		0,407

1	2	3
4,4,4-трифтор- <i>N</i> -(6-метил-2-фенил-1 <i>H</i> -индол-5-ил)-3-оксобутанамид (2k) (23-43D)	 43D	0,770
1-Метил-2-фенил-8-(трифторметил)-1,5-дигидро-6 <i>H</i> -пирроло-[2,3- <i>g</i>]хинолин-6-он (1l)		0,228
1-метил-2-фенил-3-трифторацетил-8-(трифторметил)-1,5-дигидро-6 <i>H</i> -пирроло-[2,3- <i>g</i>]хинолин-6-он (2l)		0,374
1,5-Диметил-2-фенил-8-(трифторметил)-1,5-дигидро-6 <i>H</i> -пирроло-[2,3- <i>g</i>]хинолин-6-он (26-39D)	 39D	0,576

Проведено исследование противомикробной активности новых соединений, производных замещенных 5-аминоиндолов, 4,4,4-трифтор-3-оксо-*N*-(2,3-диметил-1*H*-индол-5-ил)бутанамида (**19**, лабораторный шифр **3D**), 4,4,4-трифтор-3-оксо-*N*-(1,2,3-триметил-1*H*-индол-5-ил)бутанамида (**20**, лабораторный шифр **2D**), 4,4,4-трифтор-*N*-(1-метил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамида (**21**,

лабораторный шифр **64D**), 4,4,4-трифтор-3-оксо-*N*-(2,3,6-триметил-1*H*-индол-5-ил)бутанамида (**22**, лабораторный шифр **32D**), 4,4,4-трифтор-*N*-(6-метил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамида (**23**, лабораторный шифр **43D**), *N*-(1,7-диметил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамида (**24**, лабораторный шифр **235D**), 4,4,4-трифтор-*N*-(6-метокси-1,2,3-триметил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамида (**25**, лабораторный шифр **66D**), 1,5-диметил-2-фенил-8-трифторметил-1,5-дигидро-6*H*-пирроло-[2,3-*g*]хинолин-6-она (**26**, лабораторный шифр **39D**) [465].

Соединение с лабораторным шифром **3D** относительно тест-штаммов микроорганизмов проявило следующую активность: для *S.aureus* 25923 ATCC, *E.coli* 25922 ATCC, *P.aeruginosa* 27853 ATCC, *S.pyogenes* 1238 ATCC, *B.cereus* 96 МПК исследуемого соединения составили более 250 мкг/мл (таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению 3D (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	++	++	++	++	++
	125,0	++	++	++	++	++
	62,5	+++	+++	+++	++	++
	31,3	+++	+++	+++	+++	+++
	15,7	+++	+++	+++	+++	+++
	7,9	+++	+++	+++	+++	+++
	3,9	+++	+++	+++	+++	+++
	1,96	+++	+++	+++	+++	+++
	0,98	+++	+++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

Изучаемый амид **3D** в дозе 500 мкг/диск оказался мало активным в отношении исследуемых тест-штаммов микроорганизмов (таблица 4.3).

Таблица 4.3 – Антибактериальная активность соединения 3D относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения 3D
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	14	малоактивно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	13	малоактивно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	14	малоактивно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	12	малоактивно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433 ATCC	13	малоактивно
<i>Escherichia coli</i> M-17	15	малоактивно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	13	малоактивно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма	11	малоактивно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	12	малоактивно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 ATCC	11	малоактивно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	13	малоактивно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	12	малоактивно

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

Таким образом, соединение с лабораторным шифром **3D** малоактивно в отношении исследованных грамположительных и грамотрицательных тест-штаммов *in vitro*.

Амид с лабораторным шифром **2D** относительно тест-штаммов микроорганизмов проявил следующую активность: для *S.aureus* 25923 ATCC, *E.coli* 25922 ATCC, *P.aeruginosa* 27853 ATCC, *S.pyogenes* 1238 ATCC, *B.cereus* 96 МПК исследуемого соединения составили более 250 мкг/мл (таблица 4.4).

Таблица 4.4 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению 2D (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	++	++	++	++	++
	125,0	++	++	++	++	++
	62,5	+++	+++	+++	++	++
	31,3	+++	+++	+++	+++	+++
	15,7	+++	+++	+++	+++	+++
	7,9	+++	+++	+++	+++	+++
	3,9	+++	+++	+++	+++	+++
	1,96	+++	+++	+++	+++	+++
	0,98	+++	+++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

Соединение **2D** при нагрузке 500 мкг/диск оказалось малоактивным относительно тест-штаммов исследуемых микроорганизмов (таблица 4.5). Из проведенного исследования следует, что амид с лабораторным шифром **2D**

малоактивен в отношении исследованных грамположительных и грамотрицательных тест-штаммов *in vitro*.

Таблица 4.5 – Антибактериальная активность соединения 2D относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения 2D
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	13	малоактивно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	12	малоактивно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	15	малоактивно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	14	малоактивно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433 ATCC	14	малоактивно
<i>Escherichia coli</i> M-17	13	малоактивно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	11	малоактивно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма	12	малоактивно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	12	малоактивно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 ATCC	13	малоактивно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	11	малоактивно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	12	малоактивно

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

Соединение с лабораторным шифром **64D** относительно тест-штаммов микроорганизмов проявило следующую активность: для *S.aureus* 25923 ATCC, *E.coli* 25922 ATCC, *P.aeruginosa* 27853 ATCC, *S.pyogenes* 1238 ATCC, *B.cereus* 96 МПК исследуемого соединения составили более 250 мкг/мл (таблица 4.6).

Таблица 4.6 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению 64D (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	++	++	++	++	++
	125,0	++	++	++	++	++
	62,5	+++	+++	+++	++	++
	31,3	+++	+++	+++	+++	+++
	15,7	+++	+++	+++	+++	+++
	7,9	+++	+++	+++	+++	+++
	3,9	+++	+++	+++	+++	+++
	1,96	+++	+++	+++	+++	+++
	0,98	+++	+++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

При нагрузке исследуемого амида 500 мкг/диск значимой задержки роста не наблюдалось, как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных исследуемых тест-штаммов микроорганизмов (таблица 4.7).

Таблица 4.7 – Антибактериальная активность соединения 64D относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения 64D
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	15	малоактивно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	14	малоактивно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	12	малоактивно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	13	малоактивно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433 ATCC	12	малоактивно
<i>Escherichia coli</i> M-17	14	малоактивно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	13	малоактивно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма	12	малоактивно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	12	малоактивно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 ATCC	13	малоактивно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	11	малоактивно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	13	малоактивно

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

Таким образом, соединение с лабораторным шифром **64D** не проявило значимого противомикробного эффекта на исследуемые грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы *in vitro*.

Амид с лабораторным шифром **32D** относительно тест-штаммов микроорганизмов проявил следующую активность: для *S.aureus* 25923 ATCC, *E.coli* 25922 ATCC, *P.aeruginosa* 27853 ATCC, *S.pyogenes* 1238 ATCC, *B.cereus* 96 МПК исследуемого соединения составили более 250 мкг/мл (таблица 4.8).

Таблица 4.8 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению 32D (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	++	++	++	++	++
	125,0	++	++	++	++	++
	62,5	+++	+++	+++	++	++
	31,3	+++	+++	+++	+++	+++
	15,7	+++	+++	+++	+++	+++
	7,9	+++	+++	+++	+++	+++
	3,9	+++	+++	+++	+++	+++
	1,96	+++	+++	+++	+++	+++
	0,98	+++	+++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

Изучаемое соединение в дозе 500 мкг/диск оказалось малоактивным в отношении исследуемых тест-штаммов микроорганизмов (таблица 4.9).

Из проведенного исследования следует, что соединение **32D** малоактивно в отношении исследованных грамположительных и грамотрицательных штаммов микроорганизмов *in vitro*.

Таблица 4.9 – Антибактериальная активность соединения 32D относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения 32D
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	14	малоактивно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	14	малоактивно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	15	малоактивно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	14	малоактивно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433 ATCC	12	малоактивно
<i>Escherichia coli</i> M-17	13	малоактивно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	12	малоактивно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма 20	13	малоактивно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	13	малоактивно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 ATCC	14	малоактивно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	13	малоактивно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	13	малоактивно

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

Относительно тест-штаммов микроорганизмов соединение с лабораторным шифром **43D** проявило следующую активность: для *S.aureus* 25923 ATCC – МПК исследуемого соединения составила 125 мкг/мл, для *E.coli* 25922 ATCC – более 250 мкг/мл, для *P.aeruginosa* 27853 ATCC – более 250 мкг/мл, для *S.pyogenes* 1238 ATCC – 62,5 мкг/мл, *B.cereus* 96 – 125 мкг/мл (таблица 4.10).

Таблица 4.10 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению 43D (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	+/-	++	++	+/-	+/-
	125,0	+/- ¹	+++	+++	+/-	+/- ¹
	62,5	+	+++	+++	+/- ¹	+
	31,3	+	+++	+++	+	+
	15,7	++	+++	+++	+	++
	7,9	++	+++	+++	++	++
	3,9	+++	+++	+++	++	+++
	1,96	+++	+++	+++	+++	+++
	0,98	+++	+++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

Амид **43D** в дозе 250 мкг/диск вызывает задержку роста исследуемых тест-штаммов грамположительных микроорганизмов *Staphylococcus aureus* 906 до 27 мм в диаметре, *Staphylococcus aureus* 43300 ATCC – 23 мм, *Enterococcus faecalis* 19433 ATCC до 23 мм в диаметре, *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC – 18 мм, *Streptococcus pneumoniae* 49619 ATCC – 16 мм в диаметре. При нагрузке 500 мкг/диск вызывает задержку роста исследуемых тест-штаммов грамотрицательных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* *Escherichia coli* M-17, *Salmonella enteritidis* 5765 ATCC, *Shigella sonnei* S-форма. *Citrobacter freundii* 101/57, *Klebsiella pneumoniae* 13883 ATCC, *Proteus vulgaris* «Цветков»,

Pseudomonas aeruginosa 453 малочувствительны к исследуемому соединению (таблица 4.11).

Таблица 4.11 – Антибактериальная активность соединения 43D относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения 43D
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	27	высокоактивно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433 ATCC	23	активно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	23	активно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	18	активно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	16	активно
<i>Escherichia coli</i> M-17	17	активно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	17	активно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма	16	активно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	13	малоактивно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 ATCC	14	малоактивно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	11	малоактивно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	11	малоактивно

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

Опытные штаммы *Streptococcus spp.* (n=80 из 94 исследованных), *Staphylococcus spp.* (n=26 из 31), *Bacillus cereus* (n=5) оказались чувствительны к изучаемому соединению. Опытные штаммы *Enterococcus spp.* (n=13), *Enterobacter spp.* (n=18 из 21 исследованного), *Klebsiella spp.* (n=17 из 18 исследованных), *Pseudomonas spp.* (n=13), *Citrobacter spp.* (n=10), *Proteus spp.* (n=13), *Escherichia coli* (n=5), *Morganella morganii* (n=3), *Serratia proteamaculans* (n=4 из 5) не давали значимой задержки роста при нагрузке 500 мкг/диск исследуемого соединения (таблица 4.12).

Таблица 4.12 – Антибактериальная активность соединения 43D относительно опытных штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Штамм микроорганизма	Зона задержки роста / Количество штаммов микроорганизмов			
	≤ 10 мм	11-15 мм	16-25 мм	≥ 25 мм
1	2	3	4	5
<i>Streptococcus mitis</i> (n=9)	1	1	7	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> (n=8)	-	2	6	-
<i>Streptococcus bovis</i> (n=9)	-	1	8	-
<i>Streptococcus uberis</i> (n=8)	-	1	7	-
<i>Streptococcus salivarius</i> (n=8)	1	1	6	-
<i>Streptococcus sanguinis</i> (n=10)	1	2	5	2
<i>Streptococcus mutans</i> (n=9)	-	1	8	-
<i>Streptococcus dys. ss equisimilis</i> (n=7)	-	-	4	3
<i>Streptococcus con.ss constellatus</i> (n=6)	-	-	6	-
<i>Streptococcus pneumonia</i> (n=8)	-	1	5	2
<i>Streptococcus pyogenes</i> (n=12)	-	1	7	4
Штаммов <i>Streptococcus spp.</i> (n=94)	3	11	69	11
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=9)	-	2	6	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=7)	-	1	5	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n=7)	-	-	6	1
<i>Staphylococcus hominis ss hominis</i> (n=8)	-	2	6	-
Штаммов <i>Staphylococcus spp.</i> (n=31)	-	5	23	3
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=6)	1	4	-	1
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=6)	1	4	1	-
<i>Enterobacter gergoviae</i> (n=5)	2	1	2	-
<i>Enterobacter amnigenus</i> (n=4)	1	3	-	-
Штаммов <i>Enterobacter spp.</i> (n=21)	5	12	3	1
<i>Klebsiella pneumonia ss pneumonia</i> (n=6)	2	3	1	-

1	2	3	4	5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ss <i>ozaenae</i> (n=6)	1	5	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=6)	1	5	-	-
Штаммов <i>Klebsiella</i> spp. (n=18)	4	13	1	-
<i>Salmonella enteritidis</i> (n=5)	2	3	-	-
<i>Salmonella</i> sp. <i>Potsdam</i> (n=1)	1	-	-	-
Штаммов <i>Salmonella</i> spp. (n=6)	4	7	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> (n=7)	1	6	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=6)	1	5	-	-
Штаммов <i>Enterococcus</i> spp. (n=13)	2	11	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=7)	2	5	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> (n=4)	-	4	-	-
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (n=2)	-	2	-	-
Штаммов <i>Pseudomonas</i> spp. (n=13)	2	11	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> (n=5)	1	4	-	-
<i>Citrobacter amalonaticus</i> (n=5)	-	5	-	-
Штаммов <i>Citrobacter</i> spp. (n=10)	1	9	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> (n=7)	5	2	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> (n=6)	3	3	-	-
Штаммов <i>Proteus</i> spp. (n=13)	8	5	-	-
<i>Bacillus cereus</i> (n=5)	-	-	3	2
<i>Escherichia coli</i> (n=5)	2	3	-	-
<i>Acinetobacter lwoffii</i> (n=5)	1	4	-	-
<i>Morganella morganii</i> (n=3)	2	1	-	-
<i>Serratia proteamaculans</i> (n=5)	-	4	1	-

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

МПК соединения **43D** для опытных штаммов *Streptococcus* spp. 62,5-1000 мкг/мл, *Staphylococcus* spp. 250-1000 мкг/мл, *B.cereus* 125-1000 мкг/мл (таблица 4.13).

Штаммы *Staphylococcus spp.* (n=48 из 85 исследованных) в большинстве случаев были чувствительны к амиду **43D** в дозе 250 мкг/мл. Представители рода *Streptococcus* (n=70 из 349 исследованных) проявляли чувствительность к исследуемому амиду в дозе 62,5 мкг/мл. Наибольшее число штаммов *Streptococcus spp.* были чувствительны к исследуемому соединению в дозах 125 мкг/мл (n=128) и 250 мкг/мл (n=86), *B.cereus* – 250 мкг/мл (n=7 из 32 исследованных) и 500 мкг/мл (n=15 из 32).

Таблица 4.13 – Показатели МПК соединения 43D для опытных штаммов микроорганизмов (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Штамм микроорганизма	МПК (мкг/мл)									
	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125,0	250,0	500,0	750,0	1000,0
<i>S.pyogenes</i> (n=34)	0	0	0	0	9	11	5	5	3	1
<i>S.mitis</i> (n=37)	0	0	0	0	3	14	17	2	1	0
<i>S.agalactiae</i> (n=34)	0	0	0	0	10	11	7	5	1	0
<i>S.bovis</i> (n=39)	0	0	0	0	4	12	13	6	4	0
<i>S.uberis</i> (n=42)	0	0	0	0	11	14	7	4	5	1
<i>S.salivarius</i> (n=40)	0	0	0	0	7	11	16	0	4	2
<i>S.sanguinis</i> (n=40)	0	0	0	0	9	21	5	4	1	0
<i>S.mutans</i> (n=37)	0	0	0	0	10	11	10	5	1	0
<i>S.pneumoniae</i> (n=46)	0	0	0	0	7	23	6	6	3	1
ШТАММОВ <i>Streptococcus spp.</i> (n=349)	0	0	0	0	70	128	86	37	23	5
<i>S.aureus</i> (n=36)	0	0	0	0	0	0	17	9	7	3
<i>S.epidermidis</i> (n=22)	0	0	0	0	0	0	13	7	1	1
<i>S.haemolyticus</i> (n=27)	0	0	0	0	0	0	18	6	2	1
ШТАММОВ <i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i> (n=85)	0	0	0	0	0	0	48	22	10	5
<i>B.cereus</i> (n=32)	0	0	0	0	0	5	7	15	2	3

Изучаемый амид **43D** обладает противомикробной активностью в отношении исследуемых тест-штаммов и опытных штаммов грамположительных микроорганизмов *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *B.cereus in vitro*. *Staphylococcus aureus 43300 ATCC* (MRSA) чувствителен к исследуемому соединению.

Относительно тест-штаммов микроорганизмов соединение с лабораторным шифром **235D** проявило следующую активность: для *S.aureus 25923 ATCC* – МПК исследуемого соединения составила 125 мкг/мл, для *E.coli 25922 ATCC* – 250 мкг/мл, для *P.aeruginosa 27853 ATCC* – 250 мкг/мл, для *S.pyogenes 1238 ATCC* – 62,5 мкг/мл, *B.cereus 96* – 62,5 мкг/мл (таблица 4.14).

Таблица 4.14 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению 235D (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	+/-	+/- ¹	+/- ¹	+/-	+/-
	125,0	+/- ¹	+	+	+/-	+/-
	62,5	+	+	+	+/- ¹	+/- ¹
	31,3	+	++	++	+	+
	15,7	++	++	++	+	+
	7,9	++	+++	+++	++	++
	3,9	+++	+++	+++	++	++
	1,96	+++	+++	+++	+++	+++
	0,98	+++	+++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения

МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

Изучаемое соединение при нагрузке 250 мкг/диск вызывает задержку роста *Staphylococcus aureus* 906, *Staphylococcus aureus* 43300 ATCC, *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC, *Streptococcus pneumoniae* 49619 ATCC и *Enterococcus faecalis* 19433ATCC. Грамотрицательные тест-штаммы давали задержку роста 18 ± 2 мм в диаметре и оказались чувствительны к исследуемому соединению при нагрузке 500 мкг/диск (таблица 4.15).

Таблица 4.15 – Антибактериальная активность соединения 235D относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения 235D
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	20	активно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	16	активно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	16	активно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	16	активно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433ATCC	19	активно
<i>Escherichia coli</i> M-17	20	активно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	17	активно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма	19	активно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	20	активно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883	18	активно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	16	активно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	16	активно

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

Исследуемые опытные штаммы грамположительных микроорганизмов *Streptococcus spp.* (n=84), *Enterococcus spp.* (n=13 из 16 исследуемых), *Staphylococcus spp.* (n=23 из 26 исследуемых), *B.cereus* (n=7) оказались чувствительны к амиду **235D**. Исследуемые штаммы опытных грамотрицательных микроорганизмов *Enterobacter spp.* (n=10 из 14 исследованных), *Klebsiella spp.* (n=15 из 19 исследованных), *Pseudomonas spp.* (n=11 из 13 исследованных), *Citrobacter spp.* (n=9 из 12 исследованных), *Proteus spp.* (n=5 из 8 исследованных), *Escherichia coli* (n=8 из 9 исследованных), *A.lwoffii* (n=5 из 6 исследованных), *S.proteamaculans* (n=4 из 5 исследованных) в большинстве случаев, давали задержку роста при нагрузке исследуемого соединения 500 мкг/диск до 17 ± 2 мм в диаметре (таблица 4.16).

Таблица 4.16 – Антибактериальная активность соединения 235D относительно опытных штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Штамм микроорганизма	Зона задержки роста / Количество штаммов микроорганизмов			
	≤ 10 мм	11-15 мм	16-25 мм	≥ 25 мм
1	2	3	4	5
<i>Streptococcus mitis</i> (n=9)	-	-	2	7
<i>Streptococcus agalactiae</i> (n=7)	-	-	5	2
<i>Streptococcus bovis</i> (n=5)	-	-	-	5
<i>Streptococcus uberis</i> (n=8)	-	-	6	2
<i>Streptococcus salivarius</i> (n=7)	-	-	2	5
<i>Streptococcus sanguinis</i> (n=9)	-	-	7	2
<i>Streptococcus mutans</i> (n=7)	-	-	6	1
<i>Streptococcus dys. ss equisimilis</i> (n=9)	-	-	4	5
<i>Streptococcus con.ss constellatus</i> (n=6)	-	-	2	4
<i>Streptococcus pneumonia</i> (n=9)	-	-	7	2
<i>Streptococcus pyogenes</i> (n=8)	-	-	5	3
Штаммов <i>Streptococcus spp.</i> (n=84)	-	-	46	38
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=11)	-	1	9	1

1	2	3	4	5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=7)	-	1	6	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n=8)	-	1	7	-
Штаммов <i>Staphylococcus spp.</i> (n=26)	-	3	22	1
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=8)	1	1	5	1
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=6)	1	1	4	-
Штаммов <i>Enterobacter spp.</i> (n=14)	2	2	9	1
<i>Klebsiella pneumonia</i> (n=8)	-	1	7	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=5)	1	1	3	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=6)	-	1	5	-
Штаммов <i>Klebsiella spp.</i> (n=19)	1	3	15	
<i>Enterococcus faecium</i> (n=8)	-	1	7	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=8)	-	2	6	-
Штаммов <i>Enterococcus spp.</i> (n=16)	-	3	13	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=8)	-	2	6	-
<i>Pseudomonas putida</i> (n=4)	-	-	4	-
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (n=1)	-	-	1	-
Штаммов <i>Pseudomonas spp.</i> (n=13)	-	2	11	-
<i>Citrobacter freundii</i> (n=7)	1	1	5	-
<i>Citrobacter amalonaticus</i> (n=5)	-	1	4	-
Штаммов <i>Citrobacter spp.</i> (n=12)	1	2	9	
<i>Proteus vulgaris</i> (n=7)	1	1	5	-
<i>Proteus penneri</i> (n=1)	-	1	-	-
Штаммов <i>Proteus spp.</i> (n=8)	1	2	5	-
<i>Escherichia coli</i> (n=9)	-	1	8	-
<i>Acinetobacter lwoffii</i> (n=6)	-	1	5	-
<i>Serratia proteamaculans</i> (n=5)	-	1	4	-
<i>Bacillus cereus</i> (n=7)	-	-	6	1

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

Исследуемое соединение **235D** обладает противомикробной активностью в отношении исследуемых тест-штаммов и опытных штаммов грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов *in vitro*.

МПК соединения **235D** для опытных штаммов *Streptococcus spp.* 62,5-500 мкг/мл, *Staphylococcus spp.* 125-1000 мкг/мл, *B.cereus* 62,5-750 мкг/мл. Для опытных штаммов исследуемых грамотрицательных микроорганизмов противомикробная активность оказалась менее выраженной, но исследуемое соединение способно подавлять рост исследуемых штаммов грамотрицательных микроорганизмов *in vitro* при МПК для *E.coli* 250-1000 мкг/мл, *P.aeruginosa* – 500-1500 мкг/мл (таблица 4.17).

Таблица 4.17 – Показатели МПК соединения 235D для опытных штаммов микроорганизмов (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Штамм микроорганизма	МПК (мкг/мл)									
	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125,0	250,0	500,0	750,0	1000,0
<i>S.pyogenes</i> (n=41)	0	0	0	0	9	15	11	6	0	0
<i>S.mitis</i> (n=37)	0	0	0	0	4	17	14	2	0	0
<i>S.agalactiae</i> (n=30)	0	0	0	0	11	9	7	3	0	0
<i>S.bovis</i> (n=33)	0	0	0	0	3	19	9	2	0	0
<i>S.uberis</i> (n=33)	0	0	0	0	3	21	8	1	0	0
<i>S.salivarius</i> (n=33)	0	0	0	0	16	9	6	2	0	0
<i>S.sanguinis</i> (n=27)	0	0	0	0	2	15	9	1	0	0
<i>S.mutans</i> (n=38)	0	0	0	0	9	17	11	1	0	0
<i>S.pneumoniae</i> (n=37)	0	0	0	0	7	23	5	2	0	0
Штаммов <i>Streptococcus spp.</i> (n=309)	0	0	0	0	64	145	80	20	0	0
<i>S.aureus</i> (n=34)	0	0	0	0	0	6	21	1	3	3
<i>S.epidermidis</i> (n=39)	0	0	0	0	0	5	14	17	2	1
<i>S.haemolyticus</i> (n=48)	0	0	0	0	0	6	19	13	8	2
Штаммов <i>Staphylococcus spp.</i> (n=121)	0	0	0	0	0	17	54	31	13	6

Штамм микроорганизма	МПК (мкг/мл)									
	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125,0	250,0	500,0	750,0	1000,0
<i>E.coli</i> (n=39)	0	0	0	0	0	0	11	16	9	3
<i>P.aeruginosa</i> (n=46)	0	0	0	0	0	0	0	19	17	10
<i>B.cereus</i> (n=27)	0	0	0	0	13	8	0	5	1	0

N-(1,7-диметил-2-фенил-1*H*-индол-5-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (**235D**) обладает противомикробной активностью в отношении исследуемых тест-штаммов и опытных штаммов грамположительных микроорганизмов *in vitro*. Проявляет противомикробную активностью в отношении изученных грамотрицательных микроорганизмов *in vitro*, и только в высоких концентрациях способен оказывать противомикробное действие на синегнойную палочку, но способно замедлять или подавлять рост и размножение клинических штаммов *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.saprophyticus*, *S.haemolyticus*, *S.pyogenes*, *S.pneumoniae*, *S.bovis*, *S.salivarius*, *S.uberis*, *S.mitis*, *S.agalactiae*, *S.sanguinis*, *S.mutans*, *S.dys.ss equisimilis*, *S.con.ss constellatus*, *E. faecalis*, *E.faecium*, *E.coli*, *C.freundii*, *E.cloaceae*, *E.aerogenes*, *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *P.vulgaris*, *A.lwoffii*, *P.aeruginosa*, *S.proteamaculans*.

Относительно тест-штаммов микроорганизмов соединение с лабораторным шифром **66D** проявило следующую активность: для *S.aureus* 25923 *ATCC* – МПК исследуемого соединения составила 125 мкг/мл, для *E.coli* 25922 *ATCC* – более 250 мкг/мл, для *P.aeruginosa* 27853 *ATCC* – более 250 мкг/мл, для *S.pyogenes* 1238 *ATCC* – 125 мкг/мл, *B.cereus* 96 – 250 мкг/мл (таблица 4.18).

Таблица 4.18 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению 66D (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	+/-	++	++	+/-	+/- ¹
	125,0	+/- ¹	+++	+++	+/- ¹	+
	62,5	+	+++	+++	+	+
	31,3	+	+++	+++	+	++
	15,7	++	+++	+++	++	++
	7,9	++	+++	+++	++	+++
	3,9	+++	+++	+++	+++	+++
	1,96	+++	+++	+++	+++	+++
	0,98	+++	+++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: – ¹ титр активности, «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

Амид **66D** при содержании 250 мкг/диск активно задерживает рост тест-штаммов *S.aureus* 906, *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC и *E.faecalis* 2919 ATCC, малоактивен в отношении других грамположительных тест-штаммов. При нагрузке 500 мкг/диск исследуемое соединение малоактивно в отношении тест-штаммов представителей семейства *Enterobacteriaceae* и *P.aeruginosa* (таблица 4.19).

Таблица 4.19 – Антибактериальная активность соединения 66D относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения 66D
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	16	активно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	14	малоактивно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	18	активно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	13	малоактивно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433 ATCC	17	активно
<i>Escherichia coli</i> M-17	15	малоактивно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	14	малоактивно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма	13	малоактивно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	14	малоактивно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883	14	малоактивно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	14	малоактивно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	13	малоактивно

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

Исследуемые опытные штаммы грамположительных микроорганизмов *Streptococcus spp.* (n=59 из 74 исследованных), *Enterococcus faecium* (n=5 из 7 исследованных), *Staphylococcus spp.* (n=18 из 21 исследованного), *B.cereus* (n=6 из 7 исследованных) при нагрузке 250 мкг/диск оказались чувствительны к изучаемому соединению. Для исследуемых штаммов опытных грамотрицательных микроорганизмов не наблюдалось значимой задержки роста в дозе 500 мкг/диск исследуемого соединения (таблица 4.20).

Таблица 4.20 – Антибактериальная активность соединения 66D относительно опытных штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Штамм микроорганизма	Зона задержки роста / Количество штаммов микроорганизмов			
	≤ 10 мм	11-15 мм	16-25 мм	≥ 25 мм
1	2	3	4	5
<i>Streptococcus mitis</i> (n=7)	-	2	5	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> (n=12)	1	2	9	-
<i>Streptococcus bovis</i> (n=6)	-	1	5	-
<i>Streptococcus uberis</i> (n=9)	-	2	7	-
<i>Streptococcus salivarius</i> (n=8)	-	2	6	-
<i>Streptococcus sanguinis</i> (n=6)	-	1	5	-
<i>Streptococcus mutans</i> (n=8)	-	1	7	-
<i>Streptococcus pneumonia</i> (n=8)	-	2	5	1
<i>Streptococcus pyogenes</i> (n=10)	-	1	7	2
Штаммов <i>Streptococcus spp.</i> (n=74)	1	14	56	3
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=9)	-	2	7	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=6)	-	-	5	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n=6)	-	1	5	-
Штаммов <i>Staphylococcus spp.</i> (n=21)		3	17	1
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=5)	2	3	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=5)	1	4	-	-
Штаммов <i>Enterobacter spp.</i> (n=10)	3	7	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i> (n=6)	2	4	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae ss ozaenae</i> (n=4)	-	4	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=7)	2	5	-	-
Штаммов <i>Klebsiella spp.</i> (n=17)	4	13	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=8)	2	6	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> (n=4)	2	2	-	-
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (n=2)	-	2	-	-

1	2	3	4	5
Штаммов <i>Pseudomonas</i> spp.(n=14)	4	10	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> (n=5)	1	3	1	-
<i>Proteus penneri</i> (n=2)	-	2	-	-
Штаммов <i>Proteus</i> spp.(n=7)	1	5	1	
<i>Citrobacter freundii</i> (n=5)	1	3	1	-
<i>Acinetobacter lwoffii</i> (n=5)	1	4	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> (n=7)	-	2	5	-
<i>Bacillus cereus</i> (n=7)	1	-	2	4
<i>Escherichia coli</i> (n=9)	1	7	1	-
<i>Serratia proteamaculans</i> (n=5)	-	5	-	-

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

Соединение с лабораторным шифром **66D** обладает противомикробной активностью в отношении исследуемых тест-штаммов и опытных штаммов грамположительных микроорганизмов *Streptococcus* spp., *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus* spp., *B.cereus in vitro*. МПК для опытных штаммов составили для *Streptococcus* spp. 125-1000 мкг/мл, *Staphylococcus* spp. 125-1000 мкг/мл, *B.cereus* 125-1000 мкг/мл (таблица 4.21).

Таблица 4.21 – Показатели МПК соединения 66D для опытных штаммов микроорганизмов (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Штамм микроорганизма	МПК (мкг/мл)									
	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125,0	250,0	500,0	750,0	1000,0
<i>S.pyogenes</i> (n=26)	0	0	0	0	0	6	7	4	4	5
<i>S.mitis</i> (n=35)	0	0	0	0	0	11	7	6	7	4
<i>S.agalactiae</i> (n=36)	0	0	0	0	0	9	8	9	4	6
<i>S.bovis</i> (n=32)	0	0	0	0	0	7	7	8	6	4
<i>S.uberis</i> (n=35)	0	0	0	0	0	6	8	8	8	5

Штамм микроорганизма	МПК (мкг/мл)									
	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125,0	250,0	500,0	750,0	1000,0
<i>S.salivarius</i> (n=28)	0	0	0	0	0	4	8	6	4	6
<i>S.sanguinis</i> (n=34)	0	0	0	0	0	8	9	9	6	2
<i>S.mutans</i> (n=34)	0	0	0	0	0	12	8	6	5	3
<i>S.pneumoniae</i> (n=24)	0	0	0	0	0	0	3	7	9	5
Штаммов <i>Streptococcus</i> <i>spp.</i> (n=284)	0	0	0	0	0	63	65	63	53	40
<i>S.aureus</i> (n=22)	0	0	0	0	0	5	4	5	4	4
<i>S.epidermidis</i> (n=28)	0	0	0	0	0	6	8	9	2	3
<i>S.haemolyticus</i> (n=26)	0	0	0	0	0	7	6	6	3	4
Штаммов <i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i> (n=76)	0	0	0	0	0	18	18	20	9	11
<i>B.cereus</i> (n=17)	0	0	0	0	0	4	3	3	4	3

4,4,4-Трифтор-*N*-(6-метокси-1,2,3-триметил-1*H*-индол-5-ил)-3-оксобутанамид (**66D**) обладает противомикробной активностью в отношении исследуемых тест-штаммов и опытных штаммов грамположительных микроорганизмов *in vitro*, но более выраженной по отношению к пиогенному стрептококку. Значимого эффекта в отношении изученных грамотрицательных микроорганизмов *in vitro* не наблюдается.

Исследуемый амид **66D** способен замедлять или подавлять рост и размножение клинических штаммов *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.pyogenes*, *S.pneumoniae*, *S.bovis*, *S.salivarius*, *S.uberis*, *S.mitis*, *S.agalactiae*, *S.sanguinis*, *S.mutans*, *E.faecium*, *B.cereus*.

Относительно тест-штаммов микроорганизмов пирролохинолон с лабораторным шифром **39D** проявил следующую активность: для *S.aureus* 25923 ATCC – МПК исследуемого соединения составила 31,25 мкг/мл, для *E.coli* 25922 ATCC – 250 мкг/мл, для *P.aeruginosa* 27853 ATCC – более 250 мкг/мл, для *S.pyogenes* 1238 ATCC – 31,25 мкг/мл, *B.cereus* 96 – 125 мкг/мл (таблица 4.22).

Таблица 4.22 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению 39D (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	0	+/- ¹	++	0	+/-
	125,0	+/-	+	+++	+/-	+/- ¹
	62,5	+/-	+	+++	+/-	+
	31,3	+/- ¹	++	+++	+/- ¹	+
	15,7	+	++	+++	+	++
	7,9	+	+++	+++	+	++
	3,9	++	+++	+++	++	+++
	1,96	++	+++	+++	++	+++
	0,98	++	+++	+++	++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: – ¹ титр активности, «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

Изучаемое соединение при нагрузке 62 мкг/диск вызывает задержку роста тест-штаммов *S.aureus* 906 в диаметре 20 мм, *Staphylococcus aureus* 43300 ATCC – 18 мм, *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC – 16 мм, *Streptococcus pneumoniae* 49619 ATCC – 16 мм, *E.faecalis* 19433 ATCC – 18 мм. При содержании 500 мкг/диск пирролохинолон **39D** активно подавляет рост тест-штаммов исследуемых грамотрицательных микроорганизмов *E.coli*, *S.enteritidis*, *S.sonnei*. Малоактивен в отношении *C.freundii*, *K.pneumonia*, *P.vulgaris* и *P.aeruginosa* (таблица 4.23).

Таблица 4.23 – Антибактериальная активность соединения 39D относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения 39D
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	20	высокоактивное
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	18	активное
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	16	активное
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	16	активное
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433 ATCC	18	активное
<i>Escherichia coli</i> M-17	23	активное
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	19	активное
<i>Shigella sonnei</i> S-форма	16	активное
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	12	малоактивное
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883	14	малоактивное
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	12	малоактивное
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	13	малоактивное

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

Опытные штаммы грамположительных микроорганизмов *Streptococcus spp.* (n=66 из 77 исследованных), в том числе штаммы *S.pyogenes* (n=10 из 12 исследованных) и *S.pneumoniae* (n=7 из 9 исследованных), *Staphylococcus spp.* (n=12 из 15 исследованных), *Enterococcus spp.* (n=15 из 18 исследованных), *Bacillus cereus* (n=8) оказались чувствительными к исследуемому соединению при нагрузке 62 мкг/диск. Опытные штаммы грамотрицательных микроорганизмов *E.coli* (n=9 из 11 исследованных), *Citrobacter freundii* (n=7 из 9), *Enterobacter spp.* (n=14 из 16), *Klebsiella spp.* (n=13 из 18), *Acinetobacter baumannii* (n=6 из 7), *Proteus vulgaris* (n=8 из 10), *S.enteritidis* (n=5 из 6), *S.typhimurium* (n=4), *S.sonnei* (n=3), *S.maltophilia* (n=8 из 10), *S.paucimobilis* (n=5) давали активную задержку роста при содержании исследуемого соединения 500 мкг/диск. *P.aeruginosa* (n=6

из 7) в большинстве случаев давала малозначимую задержку роста при содержании исследуемого соединения 500 мкг/диск (таблица 4.24).

Таблица 4.24 – Антибактериальная активность соединения 39D относительно опытных штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Штамм микроорганизма	Зона задержки роста / Количество штаммов микроорганизмов			
	≤10 мм	11-15 мм	16-25 мм	≥ 25 мм
1	2	3	4	5
<i>Streptococcus mitis</i> (n=15)	-	-	8	7
<i>Streptococcus agalactiae</i> (n=5)	-	-	5	-
<i>Streptococcus bovis</i> (n=9)	-	2	6	1
<i>Streptococcus uberis</i> (n=8)	-	2	5	1
<i>Streptococcus salivarius</i> (n=5)	-	-	5	-
<i>Streptococcus sanguinis</i> (n=7)	-	1	4	2
<i>Streptococcus mutans</i> (n=7)	1	1	4	1
<i>Streptococcus pneumonia</i> (n=9)	-	2	6	1
<i>Streptococcus pyogenes</i> (n=12)	-	2	8	2
ШТАММОВ <i>Streptococcus spp.</i> (n=77)	1	10	51	15
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=9)	-	2	5	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=6)	-	1	3	2
ШТАММОВ <i>Staphylococcus spp.</i> (n=15)	-	3	8	4
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=7)	-	1	5	1
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=9)	-	1	7	1
ШТАММОВ <i>Enterobacter spp.</i> (n=16)	-	2	12	2
<i>Klebsiella pneumonia</i> (n=11)	1	2	7	1
<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=7)	1	1	5	-
ШТАММОВ <i>Klebsiella spp.</i> (n=18)	2	3	12	1

1	2	3	4	5
<i>Salmonella enteritidis</i> (n=6)	-	1	5	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (n=4)	-	-	4	-
ШТАММОВ <i>Salmonella spp.</i> (n=10)	-	1	9	-
<i>Enterococcus faecium</i> (n=8)	-	1	7	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=10)	-	2	8	-
ШТАММОВ <i>Enterococcus spp.</i> (n=18)	-	3	15	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=7)	3	3	1	-
<i>Pseudomonas putida</i> (n=2)	1	1	-	-
ШТАММОВ <i>Pseudomonas spp.</i> (n=9)	4	4	1	-
<i>Shigella sonnei</i> (n=3)	-	-	3	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=7)	-	1	6	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (n=10)	-	2	8	-
<i>Bacillus cereus</i> (n=8)	-	-	4	4
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (n=5)	-	-	5	-
<i>Proteus vulgaris</i> (n=10)	-	2	8	-
<i>Escherichia coli</i> (n=11)	-	2	9	-
<i>Citrobacter freundii</i> (n=9)	-	2	7	-

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

Минимальные подавляющие концентрации исследуемого пирролохинолона в отношении опытных штаммов исследуемых микроорганизмов составили *Streptococcus spp.* 15,6-750 мкг/мл, *Staphylococcus spp.* 31,25-1000 мкг/мл, *B.cereus* 125-750 мкг/мл, *E.coli* 500-1500 мкг/мл (табл. 4.25).

Таблица 4.25 – Показатели МПК соединения 39D для опытных штаммов микроорганизмов (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Штамм микроорганизма	МПК (мкг/мл)									
	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125,0	250,0	500,0	750,0	1000,0
<i>S.pyogenes</i> (n=34)	0	0	1	13	9	5	5	0	1	0
<i>S.mitis</i> (n=23)	0	0	0	8	7	2	3	1	2	0
<i>S.agalactiae</i> (n=20)	0	0	0	6	6	3	2	3	0	0
<i>S.bovis</i> (n=22)	0	0	0	9	4	1	3	2	3	0
<i>S.uberis</i> (n=27)	0	0	0	12	5	2	4	2	2	0
<i>S.salivarius</i> (n=23)	0	0	0	10	3	4	1	4	1	0
<i>S.sanguinis</i> (n=17)	0	0	0	5	4	3	2	3	0	0
<i>S.mutans</i> (n=16)	0	0	0	4	5	2	4	1	0	0
<i>S.pneumoniae</i> (n=19)	0	0	1	12	2	1	1	1	1	0
Штаммов <i>Streptococcus</i> <i>spp.</i> (n=201)	0	0	2	79	45	23	25	17	10	0
<i>S.aureus</i> (n=24)	0	0	0	15	4	1	1	1	1	1
<i>S.epidermidis</i> (n=19)	0	0	0	11	3	3	1	0	0	1
<i>S.haemolyticus</i> (n=30)	0	0	0	9	8	6	3	2	1	1
Штаммов <i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i> (n=73)	0	0	0	35	15	10	5	3	2	3
<i>E.coli</i> (n=33)	0	0	0	0	0	0	0	13	15	5
<i>B.cereus</i> (n=10)	0	0	0	0	0	7	1	1	1	0

Опытные штаммы микроорганизмов *S.pyogenes* и *S.pneumoniae* оказались более чувствительны к исследуемому препарату, МПК для 2 штаммов составило 15,6 мкг/мл. Опытные штаммы *E.coli* оказались менее чувствительны к изучаемому пирролохинолону **39D**, для них МПК составила 500,0 мкг/мл. Наибольшее число штаммов *Staphylococcus spp.* были чувствительны к исследуемому соединению в дозах 31,25 мкг/мл (n=35 из 73 исследованных) и

62,5 мкг/мл (n=15 из 73), штаммы *Streptococcus spp.* в дозах 31,25 мкг/мл (n=79 из 201 исследованного) и 62,5 мкг/мл (n=45 из 201), *B.cereus* – 125,0 мкг/мл (n=7 из 10 исследованных). В исследовании участвовали штаммы *S.aureus* устойчивые к азтреонаму (n=1 с МПК 64 мкг/мл), ванкомицину (n=5 с МПК 64 мкг/мл), нитрофурантоину (n=5 с МПК 128 мкг/мл), хлорамфениколу (n=4 с МПК 64 мкг/мл), цефтриаксону (n=1 с МПК 64 мкг/мл). Изучаемый пирролохинолон **39D** был активен в отношении этих штаммов в дозе 31,25 мкг/мл. В исследовании участвовали штаммы *S.epidermidis* устойчивые к ванкомицину (n=3 с МПК 64 мкг/мл), нитрофурантоину (n=3 с МПК 128 мкг/мл), хлорамфениколу (n=3 с МПК 64 мкг/мл). Изучаемый пирролохинолон **39D** был активен в отношении этих штаммов в дозах 31,25 и 62,5 мкг/мл.

1,5-Диметил-2-фенил-8-(трифторметил)-1,5-дигидро-6*H*-пирроло-[2,3-*g*]хинолин-6-он (**39D**) обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении изученных штаммов грамположительных микроорганизмов *in vitro*, а в высоких концентрациях способен оказывать противомикробное действие в отношении изученных грамотрицательных микроорганизмов *in vitro*, за исключением синегнойной палочки.

Соединение **39D** способно замедлять или подавлять рост и размножение клинических штаммов *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.pyogenes*, *S.pneumoniae*, *S.salivarius*, *S.bovis*, *S.uberis*, *S.mitis*, *S.agalactiae*, *S.sanguinis*, *S.mutans*, *E. faecalis*, *E.faecium*, *B.cereus*, *E.coli*, *S.enteritidis*, *S.typhimurium*, *S.sonnei*, *C.freundii*, *E.cloacae*, *E.aerogenes*, *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *P.vulgaris*, *A.baumani*, *S.maltophilia*, *S.paucimobilis*.

Из группы соединений, производных 5-аминоиндолов, более или менее выраженную противомикробную активность проявили 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 высоких концентрация (от 250 мкг/мл). Соединение **39D** малоактивно в отношении *P.aeruginosa*. Соединение с лабораторным шифром **39D** не уступает по активности препаратам сравнения диоксидину, нитрофурантоину, фосфомицину и мирамистину.

В рамках дальнейшего исследования биологических свойств была исследована острая токсичность 1,5-диметил-2-фенил-8-(трифторметил)-1,5-дигидро-6*H*-пирроло-[2,3-*g*]хинолин-6-он (**39D**).

При внутрибрюшинном введении соединения с лабораторным шифром **39D** для самцов мышей LD₅₀ составила 483 (431÷541) мг/кг, LD₁₆ – 326 мг/кг, LD₈₄ – 665 мг/кг, для самок мышей LD₅₀ – 371 (331÷416) мг/кг, LD₁₆ – 276 мг/кг, LD₈₄ – 490 мг/кг. Для самцов крыс LD₅₀ составила 452 (407÷502) мг/кг, LD₁₆ – 286 мг/кг, LD₈₄ – 693 мг/кг, для самок мышей LD₅₀ – 410 (369÷455) мг/кг, LD₁₆ – 249 мг/кг, LD₈₄ – 609 мг/кг.

Перед гибелью животных, через 15-20 мин после введения исследуемого соединения наблюдалось сходная картина острого токсикоза.

При внутрижелудочном введении мышам LD₅₀ для самцов составила 725 (642÷819) мг/кг, LD₁₆ – 564 мг/кг, LD₈₄ – 1046 мг/кг, для самок мышей LD₅₀ – 770 (681÷870) мг/кг, LD₁₆ – 552 мг/кг, LD₈₄ – 996 мг/кг. При внутрижелудочном введении крысам LD₅₀ для самцов составила 791 (706÷886) мг/кг, LD₁₆ – 534 мг/кг, LD₈₄ – 1053 мг/кг, для самок мышей LD₅₀ – 759 (678÷850) мг/кг, LD₁₆ – 527 мг/кг, LD₈₄ – 958 мг/кг. Перед гибелью животных, через 25-40 мин после введения, наблюдалась сходная картина острого токсикоза.

При накожном нанесении исследуемого соединения в максимально возможной концентрации пирролохинолон **39D** не вызывал гибель животных, вследствие чего определение LD₅₀ при накожном нанесении не представлялось возможным. После нанесения соединения наблюдалось снижение двигательной активности, в первые часы – снижение аппетита. Через 4-5 часов указанные симптомы исчезали. Отмечалась нормальная координация движений. Животные активно потребляли корм и воду. Физиологические отправления без отклонений

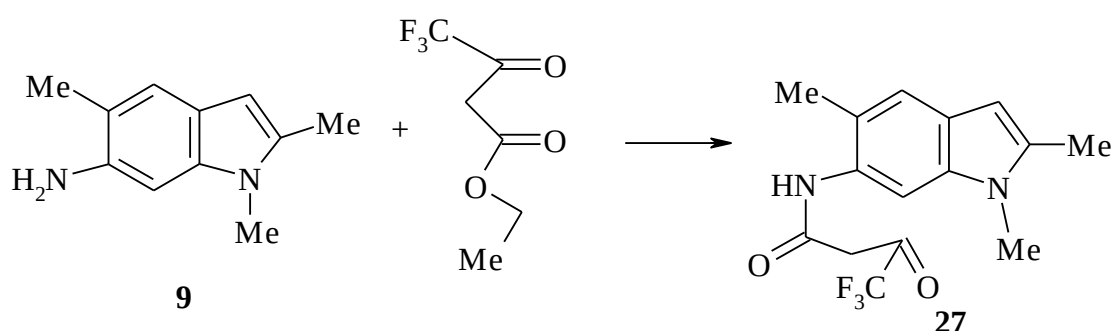
от нормы. При патологоанатомическом вскрытии видимых изменений в макроскопической картине не выявлено.

По классификации токсичности веществ [79] изучаемое соединение относится к умеренно токсичным соединениям.

ГЛАВА 5. СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ЗАМЕЩЕННЫХ 6-АМИНОИНДОЛОВ

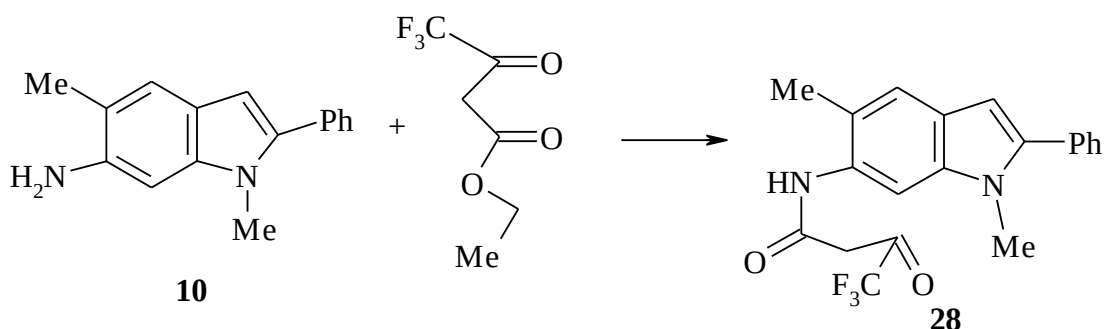
Первичная реакция 6-аминоиндолов с 4,4,4-трифторацетоуксусным эфиром в бензоле со следами соляной кислоты в результате эксперимента приводила к образованию соответствующих амидов, то есть превращение реализовывались за счет этоксикарбонильной группы кетоэфира. При этом в зависимости от природы заместителя у пиррольного атома азота наблюдалось образование нециклических или циклических амидов. Так из 6-амино-1,2,5-триметилиндола (**9**) в, выше приведенных, условиях был получен нециклический амид **27** (схема 5.1).

Схема 5.1



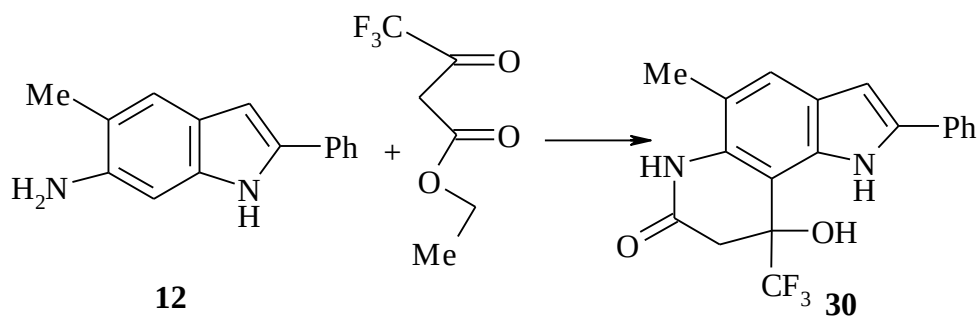
Аналогично схеме 5.1 6-амино-1,5-диметил-2-фенилиндол (**10**) превращается также в амид нециклического строения **28** (схема 5.2).

Схема 5.2



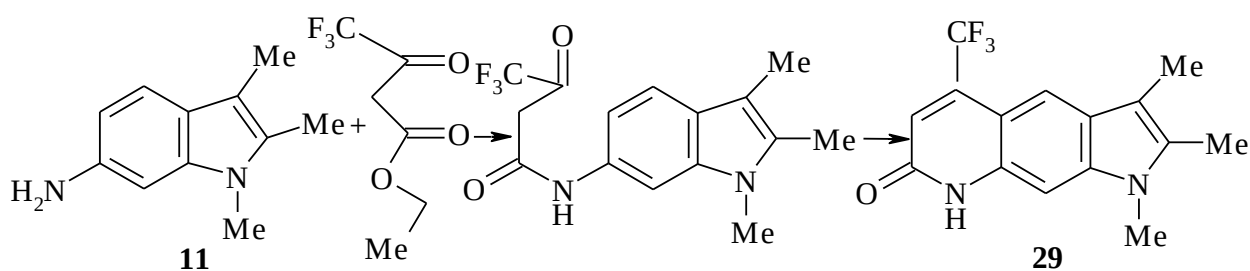
Не метилированный по пиррольному атому азота 6-амино-5-метил-2-фенилиндол (**12**) с трифторацетоуксусным эфиром образовывал амид циклического строения **30** (схема 5.3) [131].

Схема 5.3



Из 6-амино-1,2,3-триметилиндола (**11**) через стадию образования нециклического амида с последующей циклокоденсацией под действием трифторуксусной кислоты получали соответствующий пирро[3,2-*g*]хинолон **29** (схема 5.4) [41].

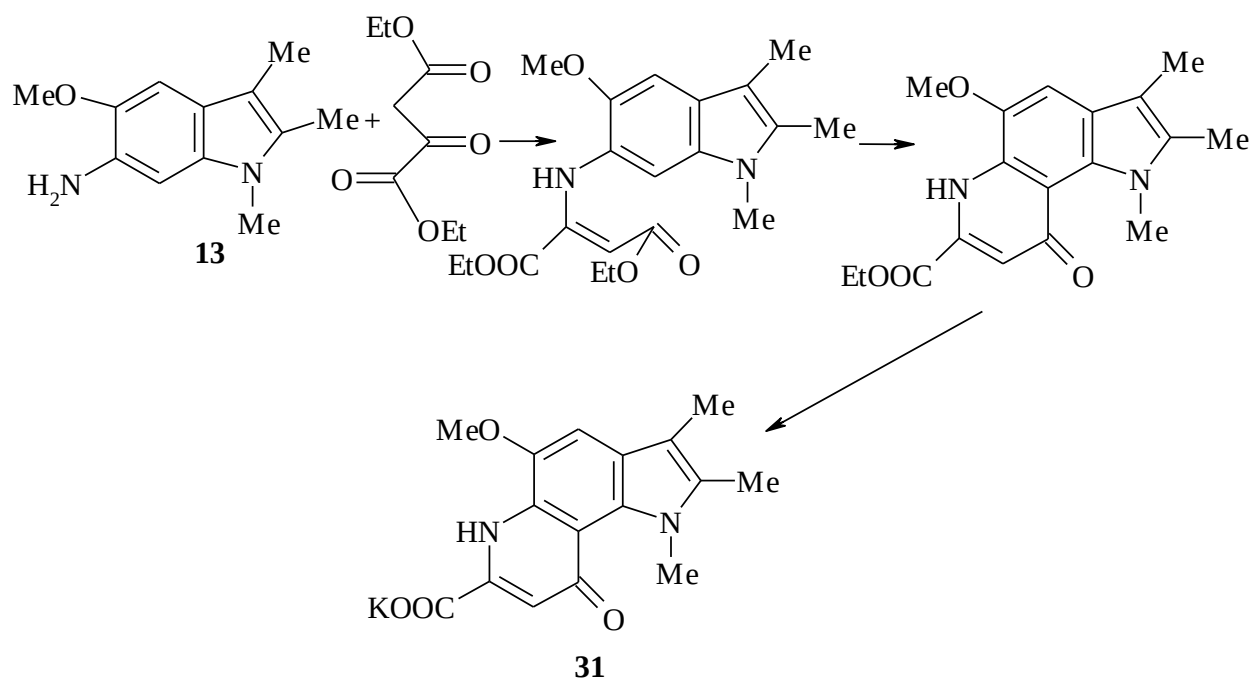
Схема 5.4



Были исследованы особенности влияния 1,2,3-триметил-5-(триформетил)-1,8-дигидро-7Н-пирроло[3,2-*g*]хинолин-7-она **29** (лабораторный шифр **ТФПХ**) на физиолого-биохимические характеристики лигнолитического гриба *Lentinus tigrinus* [41].

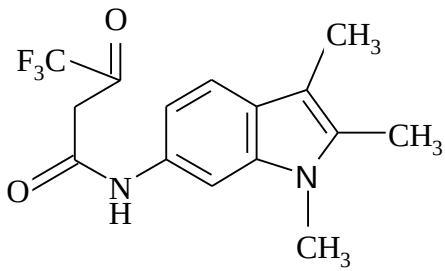
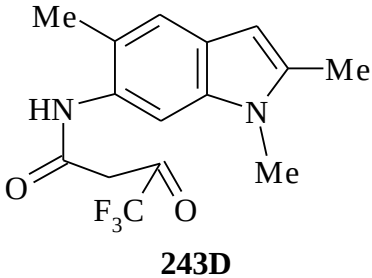
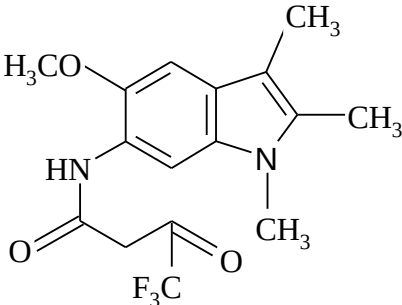
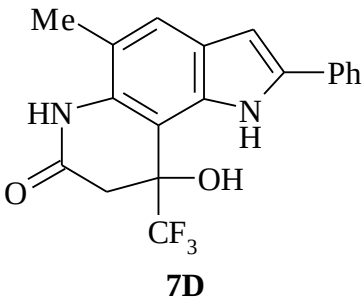
Щавелевоуксусный эфир в отличие от трифторацетоуксусного эфира при кипячении в бензоле реагирует с 6-амино-5-метокси-1,2,3-триметилиндолом (**13**) за счет карбонильной группы. При этом образуется енамин, который в кипящем дифениле превращали в соответствующий пирроло[2,3-*f*]хинолон, в результате последующей обработки которого гидроксидом калия получали калиевую соль пирроло[2,3-*f*]хинолонарбоновой кислоты **31** (схема 5.5) [171; 526].

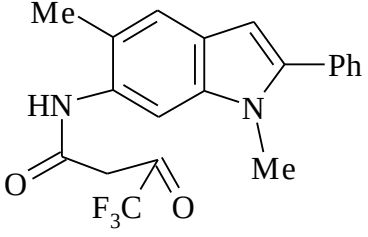
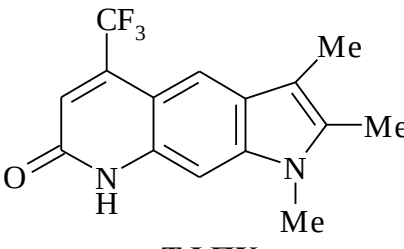
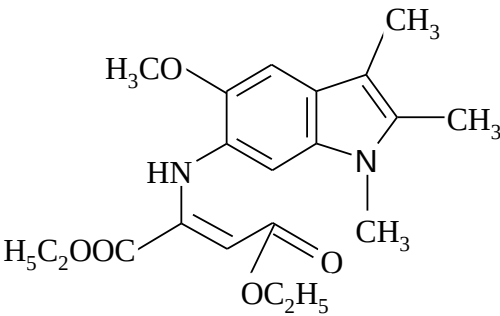
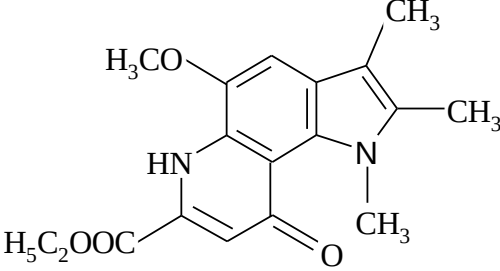
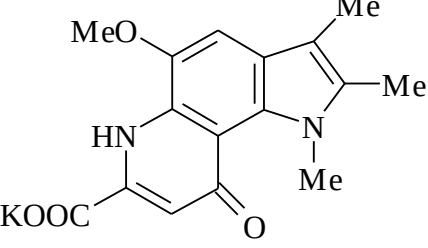
Схема 5.5



Были исследованы особенности влияния калиевой соли 5-метокси-1,2,3-триметил-9-оксо-6,9-дигидро-1*H*-пирроло[2,3-*f*]хинолин-7-карбоновой кислоты **31** (лабораторный шифр **КПХ**) на физиолого-биохимические характеристики лигнолитического гриба *Lentinus tigrinus* [41].

Таблица 5.1 – Внеэкспериментальный прогноз противомикробной активности в ряду производных замещенных 6-аминоиндолов

Соединение	Структурная формула	<i>Pa</i>
1	2	3
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 (27-243D)	 243D	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 (30-7D)	 7D	0,851

1	2	3
<i>N</i>-(1,5-диметил-2-фенил-1<i>H</i>-индол-6-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (28-S3)	 S3	0,909
1,2,3-Триметил-5-(трифторметил)-1,8-дигидро-7<i>H</i>-пирроло[3,2-<i>g</i>]хи-нолин-7-он (29-ТФПХ)	 ТФПХ	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>-пир-роло[2,3-<i>f</i>]хинолин-9-он		0,056
Калиевая соль 7-гидроксикарбонил-1,2,3-триметил-5-метокси-1<i>H</i>-пирроло[2,3-<i>f</i>]хинолин-9-она (31-КПХ)	 КПХ	0,499

В работе исследована противомикробная активность 9-гидрокси-5-метил-2-фенил-9-(трифторметил)-1,6,8,9-тетрагидро-7*H*-пирроло[2,3-*f*]хинолин-7-она (**30**, лабораторный шифр **7D**) и *N*-(1,5-диметил-2-фенил-1*H*-индол-6-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамида (**28**, лабораторный шифр **S3**), 4,4,4-трифтор-3-оксо-*N*-(1,2,5-триметил-1*H*-индол-6-ил)бутанамида, соединения с лабораторным шифром **243D** (**27**) [465]. Также проведено исследование антибактериальной активности 1,2,3-триметил-5-(трифторметил)-1,8-дигидро-7*H*-пирроло[3,2-*g*]хинолин-7-она **29** (лабораторный шифр **ТФПХ**) и калиевой соли 5-метокси-1,2,3-триметил-9-оксо-6,9-дигидро-1*H*-пирроло[2,3-*f*]хинолин-7-карбоновой кислоты **31** (лабораторный шифр **КПХ**).

Относительно тест-штаммов микроорганизмов амид **243D** проявил следующую активность: для *S.aureus* 25923 ATCC – МПК исследуемого соединения составила 125 мкг/мл, для *E.coli* 25922 ATCC – более 250 мкг/мл, для *P.aeruginosa* 27853 ATCC – более 250 мкг/мл, для *S.pyogenes* 1238 ATCC – 125 мкг/мл, *B.cereus* 96 – 250 мкг/мл (таблица 5.2).

Таблица 5.2 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению 243D (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	+/-	++	++	+/-	+/- ¹
	125,0	+/- ¹	+++	+++	+/- ¹	+
	62,5	+	+++	+++	+	+
	31,3	+	+++	+++	+	++
	15,7	++	+++	+++	++	++
	7,9	++	+++	+++	++	+++
	3,9	+++	+++	+++	+++	+++
	1,96	+++	+++	+++	+++	+++
	0,98	+++	+++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: – ¹ титр активности, «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

Соединение **243D** при содержании 250 мкг/диск задерживает рост исследуемых грамположительных тест-штаммов *S.aureus* 906, *Staphylococcus aureus* 43300 ATCC и *E.faecalis* 19433 ATCC. В отношении *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC и *Streptococcus pneumoniae* 49619 ATCC – малоактивно. При нагрузке 500 мкг/диск малоактивно в отношении тест-штаммов семейства *Enterobacteriaceae*, лишь активно задерживает рост *Escherichia coli* M-17 и малоактивно в отношении *P.aeruginosa* (таблица 5.3).

Таблица 5.3 – Антибактериальная активность соединения 243D относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения 243D
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	19	активно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	16	активно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	14	малоактивно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	13	малоактивно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433 ATCC	17	активно
<i>Escherichia coli</i> M-17	16	активно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	14	малоактивно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма	12	малоактивно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	13	малоактивно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13833 ATCC	12	малоактивно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	12	малоактивно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	11	малоактивно

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

Исследуемые опытные штаммы грамположительных микроорганизмов *Streptococcus spp.* (n=32 из 53 исследованных), *Enterococcus spp.* (n=8 из 11 исследованных), *Staphylococcus spp.* (n=16 из 21 исследованного), *B.cereus* (n=6 из 7 исследованных) оказались достаточно чувствительны к изучаемому амиду. Исследуемые штаммы опытных грамотрицательных микроорганизмов, в большинстве случаев, не проявили значимой чувствительности к исследуемому соединению (таблица 5.4).

Таблица 5.4 – Антибактериальная активность соединения 243D относительно опытных штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Штамм микроорганизма	Зона задержки роста / Количество штаммов микроорганизмов			
	≤ 10 мм	11-15 мм	16-25 мм	≥ 25 мм
1	2	3	4	5
<i>Streptococcus mitis</i> (n=7)	-	2	5	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> (n=4)	1	2	1	-
<i>Streptococcus bovis</i> (n=6)	-	2	3	1
<i>Streptococcus uberis</i> (n=5)	1	4	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i> (n=5)	-	1	2	2
<i>Streptococcus sanguinis</i> (n=6)	1	5	-	-
<i>Streptococcus mutans</i> (n=5)	-	-	3	2
<i>Streptococcus pneumonia</i> (n=6)	-	1	4	1
<i>Streptococcus pyogenes</i> (n=9)	-	1	3	5
Штаммов <i>Streptococcus spp.</i> (n=53)	3	18	21	11
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=8)	-	2	2	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=7)	-	2	3	2
<i>Staphylococcus hominis ss hominis</i> (n=6)	-	1	5	-
Штаммов <i>Staphylococcus spp.</i> (n=21)	-	5	10	6
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=6)	1	5	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=5)	2	3	-	-
<i>Enterobacter amnigenus</i> (n=7)	1	6	-	-
<i>Enterobacter gergoviae</i> (n=4)	2	2	-	-
Штаммов <i>Enterobacter spp.</i> (n=22)	6	16	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae ss pneumonia</i> (n=8)	1	6	1	-
<i>Klebsiella pneumoni ss ozaenae</i> (n=6)	1	5	-	-
Штаммов <i>Klebsiella spp.</i> (n=14)	2	11	1	-
<i>Salmonella enteritidis</i> (n=5)	-	5	-	-
<i>Salmonella potsdam</i> (n=1)	-	1	-	-
Штаммов <i>Salmonella spp.</i> (n=6)	-	6	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> (n=6)	-	2	3	1

1	2	3	4	5
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=5)	-	1	1	3
Штаммов <i>Enterococcus spp.</i> (n=11)	-	3	4	4
<i>Citrobacter freundii</i> (n=6)	2	4	-	-
<i>Citrobacter amalonaticus</i> (n=6)	-	6	-	-
Штаммов <i>Citrobacter spp.</i> (n=12)	2	10	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> (n=5)	-	5	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> (n=10)	5	5	-	-
Штаммов <i>Proteus spp.</i> (n=15)	5	10	-	-
<i>Morganella morganii ss morganii</i> (n=3)	-	3	-	-
<i>Escherichia coli</i> (n=7)	2	5	-	-
<i>Bacillus cereus</i> (n=7)	-	1	5	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=6)	1	5	-	-

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

Соединение **243D** обладает противомикробной активностью в отношении исследуемых тест-штаммов и опытных штаммов грамположительных микроорганизмов *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *B.cereus in vitro*. Оно способно задерживать рост *Staphylococcus aureus* 43300 ATCC (MRSA). МИК для опытных штаммов *Streptococcus spp.* 125-750 мкг/мл, *Staphylococcus spp.* 125-1000 мкг/мл, *B.cereus* 250-1000 мкг/мл (таблица 5.5). Грамотрицательные штаммы исследуемых микроорганизмов не проявили значимую чувствительность *in vitro* к исследуемому соединению.

Таблица 5.5 – Показатели МПК соединения 243D для опытных штаммов микроорганизмов (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Штамм микроорганизма	МПК (мкг/мл)									
	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125,0	250,0	500,0	750,0	1000,0
<i>S.pyogenes</i> (n=37)	0	0	0	0	0	16	6	10	5	0
<i>S.mitis</i> (n=36)	0	0	0	0	0	17	19	0	0	0
<i>S.agalactiae</i> (n=37)	0	0	0	0	0	21	7	6	3	0
<i>S.bovis</i> (n=32)	0	0	0	0	0	14	18	0	0	0
<i>S.uberis</i> (n=30)	0	0	0	0	0	16	11	2	1	0
<i>S.salivarius</i> (n=33)	0	0	0	0	0	21	7	5	0	0
<i>S.sanguinis</i> (n=33)	0	0	0	0	0	11	19	1	2	0
<i>S.mutans</i> (n=39)	0	0	0	0	0	16	15	8	0	0
<i>S.pneumoniae</i> (n=34)	0	0	0	0	0	9	10	11	4	0
Штаммов <i>Streptococcus</i> <i>spp.</i> (n=311)	0	0	0	0	0	141	112	43	15	0
<i>S.aureus</i> (n=40)	0	0	0	0	0	20	7	11	1	1
<i>S.epidermidis</i> (n=39)	0	0	0	0	0	14	11	5	7	2
<i>S.haemolyticus</i> (n=31)	0	0	0	0	0	17	8	4	1	1
Штаммов <i>Streptococcus</i> <i>spp.</i> (n=110)	0	0	0	0	0	51	26	20	9	4
<i>B.cereus</i> (n=)	0	0	0	0	0	0	18	9	2	1

4,4,4-Трифтор-3-оксо-N-(1,2,5-триметил-1*H*-индол-6-ил)бутанамид (**243D**) обладает противомикробной активностью в отношении исследуемых тест-штаммов и опытных штаммов грамположительных микроорганизмов *in vitro*. Значимого эффекта в отношении изученных грамотрицательных микроорганизмов *in vitro* не наблюдается.

Амид **243D** способен замедлять или подавлять рост и размножение клинических штаммов *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.pyogenes*, *S.pneumoniae*, *S.salivarius*, *S.bovis*, *S.mitis*, *S.mutans*, *E. faecalis*, *E.faecium*, *B.cereus*.

Относительно тест-штаммов микроорганизмов соединение с лабораторным шифром **S3** проявило следующую активность: для *S.aureus* 25923 ATCC – МПК исследуемого соединения составила 62,5 мкг/мл, для *E.coli* 25922 ATCC – 31,25 мкг/мл, для *P.aeruginosa* 27853 ATCC – 62,5 мкг/мл, для *S.pyogenes* 1238 ATCC – 250 мкг/мл, *B.cereus* 96 – 250 мкг/мл (таблица 5.6).

Таблица 5.6 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению S3 (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	+/-	+/-	+/-	+/- ¹	+/- ¹
	125,0	+/-	+/-	+/-	+	+
	62,5	+/- ¹	+/-	+/- ¹	+	+
	31,3	+	+/- ¹	+	++	++
	15,7	+	+	+	++	++
	7,9	+	+	+	+++	+++
	3,9	++	+	++	+++	+++
	1,96	++	++	++	+++	+++
	0,98	+++	++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: – ¹ титр активности, «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

Соединение **S3** при нагрузке 125 мкг/диск проявило активность относительно тест-штаммов *S.aureus* 906, *S.aureus* 43300 ATCC, 500 мкг/ диск – *S.pneumoniae* 49619 ATCC, *E.faecalis* 19433 ATCC, 62,5 мкг/диск в отношении *E.coli* M-17, *P.aeruginosa* 453, *K.pneumoniae* 13883 ATCC и *P.vulgaris* «Цветков». Малоактивен амид **S3** в отношении тест-штаммов *S.sonnei*, *C.freundii*, и *Salmonella enteritidis* (таблица 5.7).

Таблица 5.7 – Антибактериальная активность соединения S3 относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения S3
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	18	активно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	21	активно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	16	активно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	17	активно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433 ATCC	16	активно
<i>Escherichia coli</i> M-17	16	активно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	12	малоактивно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма	15	малоактивно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	15	малоактивно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 ATCC	16	активно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	17	активно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	16	активно

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

Амид **S3** оказался активным относительно опытных штаммов *Staphylococcus* spp. (n=12 из 15 исследованных), *Streptococcus* spp. (n=32 из 39 исследованных), *Enterococcus* spp. (n=12 из 13 исследованных), *B.cereus* (n=6). Опытные штаммы *E.coli* (n=8 из 9 исследованных), *Enterobacter* spp. (n=9 из 10 исследованных), *Proteus* spp. (n=9 из 12 исследованных), *Citrobacter freundii* (n=4 из 6

исследованных), *Klebsiella pneumoniae* (n=6) при нагрузке 62,5 мкг/диск исследуемого соединения давали задержку роста до 19 мм в диаметре и более. Остальных опытные штаммы грамотрицательных микроорганизмов оказались малочувствительны к изучаемому амиду. Опытные штаммы *P.aeruginosa* (n=5 из 6 исследованных) при содержании 125 мкг/диск соединения **S3** давали задержку роста (таблица 5.8).

Таблица 5.8 – Антибактериальная активность соединения S3 относительно опытных штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Штамм микроорганизма	Зона задержки роста / Количество штаммов микроорганизмов			
	≤ 10 мм	11-15 мм	16-25 мм	≥ 25 мм
1	2	3	4	5
<i>Streptococcus mitis</i> (n=6)	-	2	3	1
<i>Streptococcus agalactiae</i> (n=7)	-	1	4	2
<i>Streptococcus uberis</i> (n=5)	-	-	3	2
<i>Streptococcus salivarius</i> (n=6)	-	1	3	2
<i>Streptococcus pneumonia</i> (n=7)	-	1	4	2
<i>Streptococcus pyogenes</i> (n=8)	-	2	5	1
ШТАММОВ <i>Streptococcus spp.</i> (n=39)	-	7	22	10
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=8)	-	2	4	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=7)	-	1	5	1
ШТАММОВ <i>Staphylococcus spp.</i> (n=15)	-	3	9	3
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=5)	-	1	3	1
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=5)	-	-	4	1
ШТАММОВ <i>Enterobacter spp.</i> (n=10)	-	1	7	2
<i>Enterococcus faecium</i> (n=5)	-	-	5	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=8)	-	1	7	-
ШТАММОВ <i>Enterococcus spp.</i> (n=13)	-	1	12	-
<i>Proteus vulgaris</i> (n=6)	-	1	5	-

1	2	3	4	5
<i>Proteus mirabilis</i> (n=6)	-	2	4	-
Штаммов <i>Proteus spp.</i> (n=12)	-	3	9	-
<i>Escherichia coli</i> (n=9)	-	1	7	1
<i>Citrobacter freundii</i> (n=6)	-	2	4	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=6)	-	-	6	-
<i>Salmonella enteritidis</i> (n=)	-	5	-	-
<i>Bacillus cereus</i> (n=)	-	-	5	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=)	-	1	4	1

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

Полученные данные свидетельствуют о наличии противомикробной активности соединения **S3** *in vitro* в отношении изученных тест-штаммов и опытных штаммов грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Исследуемое соединение активно задерживает рост тест-штамма *S.aureus* 43300 ATCC (MRSA). МПК для опытных штаммов *Staphylococcus spp.* составило 31,25-1000 мкг/мл, *E.coli* – 31,25-500 мкг/мл, *Streptococcus spp.* – 125,0-1000 мкг/мл, *B.cereus* – 250-500 мкг/мл, для *P.aeruginosa* – 62,5-1000 мкг/мл (таблица 5.9).

Таблица 5.9 – Показатели МПК соединения S3 для опытных штаммов микроорганизмов (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Штамм микроорганизма	МПК (мкг/мл)									
	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125,0	250,0	500,0	750,0	1000,0
<i>S.pyogenes</i> (n=37)	0	0	0	0	0	1	25	7	3	1
<i>S.mitis</i> (n=36)	0	0	0	0	0	0	19	14	3	0
<i>S.agalactiae</i> (n=31)	0	0	0	0	0	0	13	10	7	1
<i>S.bovis</i> (n=34)	0	0	0	0	0	0	25	7	2	0
<i>S.uberis</i> (n=28)	0	0	0	0	0	1	16	8	1	2
<i>S.salivarius</i> (n=28)	0	0	0	0	0	0	11	17	0	0
<i>S.sanguinis</i> (n=34)	0	0	0	0	0	1	19	11	2	1

Штамм микроорганизма	МПК (мкг/мл)									
	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125,0	250,0	500,0	750,0	1000,0
<i>S.mutans</i> (n=29)	0	0	0	0	0	0	12	17	0	0
<i>S.pneumoniae</i> (n=35)	0	0	0	0	0	1	21	9	3	1
Штаммов <i>Streptococcus spp.</i> (n=292)	0	0	0	0	0	4	161	100	21	6
<i>S.aureus</i> (n=36)	0	0	0	3	16	14	1	1	0	1
<i>S.epidermidis</i> (n=46)	0	0	0	1	21	17	2	3	2	0
<i>S.haemolyticus</i> (n=37)	0	0	0	2	16	9	7	1	1	1
Штаммов <i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i> (n=119)	0	0	0	6	53	40	10	5	3	2
<i>E.coli</i> (n=51)	0	0	0	25	14	6	5	1	0	0
<i>P.aeruginosa</i> (n=49)	0	0	0	1	23	11	7	2	3	2
<i>B.cereus</i> (n=15)	0	0	0	0	0	0	11	2	1	1

Опытные штаммы микроорганизмов оказались более чувствительны к исследуемому препарату. 6 штаммов *Staphylococcus spp.* были чувствительны к амиду **S3** в дозе 31,25 мкг/мл. 1 штамм *P.aeruginosa* также оказался чувствителен к амиду **S3** в дозе 31,25 мкг/мл. Наибольшее число штаммов *Staphylococcus spp.* были чувствительны к исследуемому соединению в дозах 62,5 и 125,0 мкг/мл, штаммы *Streptococcus spp.* в дозах 250,0 и 500,0 мкг/мл, *E.coli* – 31,25 и 62,5 мкг/мл, *P.aeruginosa* – 62,5 и 125,0 мкг/мл, *B.cereus* – 250,0 мкг/мл. В исследовании участвовали штаммы *S.aureus* устойчивые к азтреонаму (n=1 с МПК 64 мкг/мл), ванкомицину (n=5 с МПК 64 мкг/мл), нитрофурантоину (n=5 с МПК 128 мкг/мл), хлорамфениколу (n=4 с МПК 64 мкг/мл), цефтриаксону (n=1 с МПК 64 мкг/мл). Изучаемый амид **S3** был активен в отношении этих штаммов в дозе 62,5 мкг/мл. Также в исследовании участвовали штаммы *E.coli* устойчивые к пиперациллину (n=17 с МПК 128 мкг/мл), пиперациллин/тазобактаму (n=4 с МПК 128 мкг/мл, n=7 с МПК 256 мкг/мл), тикарциллин/клавуланату (n=14 с МПК 128 мкг/мл, n=1 с МПК 256 мкг/мл), цефтриаксону (n=9 с МПК 128 мкг/мл),

нитрофурантоину (n=9 с МПК 128 мкг/мл, n=2 с МПК 256 мкг/мл). Изучаемый амид **S3** был активен в отношении этих штаммов в дозах 31,25 и 62,5 мкг/мл. Изучалась чувствительность опытных штаммов *P.aeruginosa* устойчивых к карбенициллину (n=5 с МПК 128 мкг/мл, n=8 с МПК 256 мкг/мл, n=10 с МПК 512 мкг/мл), пиперациллину (n=10 с МПК 128 мкг/мл), пиперациллин/тазобактаму (n=8 с МПК 128 мкг/мл, n=4 с МПК 256 мкг/мл), тикарциллину (n=9 с МПК 128 мкг/мл), тикарциллин/клавуланату (n=14 с МПК 128 мкг/мл, n=5 с МПК 256 мкг/мл), цефтриаксону (n=2 с МПК 128 мкг/мл), фосфомицину (n=2 с МПК 256 мкг/мл), сульфизоксазолу (n=16 с МПК 512 мкг/мл). Амид с лабораторным шифром **S3** подавлял рост и размножение вышеуказанных штаммов *P.aeruginosa* в дозах 62,5 мкг/мл и 125,0 мкг/мл.

N-(1,5-диметил-2-фенил-1*H*-индол-6-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (**S3**) обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении изученных штаммов как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов *in vitro*.

Соединение **S3** способно замедлять или подавлять рост и размножение опытных штаммов *S.mitis*, *S.salivarius*, *S.agalactiae*, *S.uberis*, *S.pneumoniae*, *S.pyogenes*, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *E.faecalis*, *E.faecium*, *B.cereus*, *E.aerogenes*, *E.cloacae*, *K.pneumoniae*, *E.coli*, *C.freundii*, *P.vulgaris*, *P.mirabilis* *P.aeruginosa*.

По отношению тест-штаммов микроорганизмов соединение с лабораторным шифром **7D** проявило следующую активность: для *S.aureus* 25923 ATCC – МПК исследуемого соединения составила 125 мкг/мл, для *E.coli* 25922 ATCC – 62,5 мкг/мл, для *P.aeruginosa* 27853 ATCC – более 250 мкг/мл, для *S.pyogenes* 1238 ATCC – 250 мкг/мл, *B.cereus* 96 – 62,5 мкг/мл (таблица 5.10).

Таблица 5.10 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению 7D (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	+/-	+/-	++	+/- ¹	+/-
	125,0	+/- ¹	+/-	+++	+	+/-
	62,5	+	+/- ¹	+++	+	+/- ¹
	31,3	+	+	+++	++	+
	15,7	++	+	+++	++	+
	7,9	++	++	+++	+++	++
	3,9	+++	++	+++	+++	++
	1,96	+++	+++	+++	+++	+++
	0,98	+++	+++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: – ¹ титр активности, «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

Циклический амид **7D** при нагрузке 250 мкг/диск оказался активным относительно тест-штаммов *S.aureus* 906, *Staphylococcus aureus* 43300 ATCC, *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC, *S.pneumoniae* 49619 ATCC, 125 мкг/диск в отношении тест-штаммов *E.coli* и *K.pneumoniae*. Однако амид **7D** оказался малоактивен в отношении тест-штаммов *E.faecalis*, *S.enteritidis*, *S.sonnei*, *C.freundii*, *P.vulgaris*, *P.aeruginosa* (таблица 5.11).

Таблица 5.11 – Антибактериальная активность соединения 7D относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения 7D
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	20	активно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	18	активно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	16	активно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	16	активно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433 ATCC	13	малоактивно
<i>Escherichia coli</i> M-17	18	активно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	14	малоактивно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма	14	малоактивно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	15	малоактивно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 ATCC	17	активно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	12	малоактивно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	12	малоактивно

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

Исследуемое соединение 7D оказалось активно относительно опытных штаммов *Staphylococcus spp.* (n=15) при содержании 250 мкг/диск, *Streptococcus spp.* (n=32 из 37 исследованных) при нагрузке 500 мкг/диск, малоактивно задерживало рост опытных штаммов *Enterococcus spp.* (n=11). Значимую чувствительность к данному соединению показали опытные штаммы *B.cereus* (n=6) при содержании 125 мкг/диск. Опытные штаммы *E.coli* (n=7), *Enterobacter spp.* (n=9 из 11 исследованных), *K.pneumoniae* (n=5 из 6 исследованных) при нагрузке 125 мкг/диск исследуемого соединения давали задержку роста до 25 мм в диаметре и более. Остальные опытные штаммы грамотрицательных микроорганизмов, в том числе *P.aeruginosa* оказались малочувствительны к изучаемому амиду (таблица 5.12).

Таблица 5.12 – Антибактериальная активность соединения 7D относительно опытных штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Штамм микроорганизма	Зона задержки роста / Количество штаммов микроорганизмов			
	≤ 10 мм	11-15 мм	16-25 мм	≥ 25 мм
<i>Streptococcus mitis</i> (n=9)	-	2	7	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> (n=5)	-	-	5	-
<i>Streptococcus uberis</i> (n=8)	-	2	6	-
<i>Streptococcus pneumonia</i> (n=7)	-	1	5	1
<i>Streptococcus pyogenes</i> (n=8)	-	-	7	1
Штаммов <i>Streptococcus spp.</i> (n=37)		5	30	2
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=8)	-	-	8	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=7)	-	-	6	1
Штаммов <i>Staphylococcus spp.</i> (n=15)	-	-	14	1
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=6)	-	1	5	-
<i>Enterobacter cloaceae</i> (n=5)	-	1	3	1
Штаммов <i>Enterobacter spp.</i> (n=11)	-	2	8	1
<i>Enterococcus faecium</i> (n=6)	-	6	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=5)	1	4	-	-
Штаммов <i>Enterococcus spp.</i> (n=11)	1	10	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> (n=6)	-	6	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> (n=6)	2	4	-	-
Штаммов <i>Proteus spp.</i> (n=12)	2	10	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=6)	-	1	4	1
<i>Salmonella enteritidis</i> (n=5)	1	4	-	-
<i>Escherichia coli</i> (n=7)	-	-	4	3
<i>Citrobacter freundii</i> (n=6)	1	5	-	-
<i>Bacillus cereus</i> (n=6)	-	-	4	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=5)	2	3	-	-

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

Полученные данные свидетельствуют о наличии противомикробной активности соединения **7D** *in vitro* в отношении изученных тест-штаммов и опытных штаммов грамположительных микроорганизмов, а также тест-штаммов и опытных штаммов грамотрицательных микроорганизмов, в частности *E.coli*, *Enterobacter spp.*, *K.pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* 43300 ATCC (MRSA) чувствителен к исследуемому соединению. МПК для опытных штаммов *Staphylococcus spp.* составило 62,5-1000 мкг/мл, *E.coli* – 31,25-500 мкг/мл, *Streptococcus spp.* – 250-1000 мкг/мл, *B.cereus* – 62,5-500 мкг/мл (таблица 5.13).

Таблица 5.13 – Показатели МПК соединения 7D для опытных штаммов микроорганизмов (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Штамм микроорганизма	МПК (мкг/мл)									
	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125,0	250,0	500,0	750,0	1000,0
<i>S.pyogenes</i> (n=21)	0	0	0	0	0	0	15	2	3	1
<i>S.mitis</i> (n=37)	0	0	0	0	0	0	28	7	2	0
<i>S.agalactiae</i> (n=28)	0	0	0	0	0	0	16	5	7	0
<i>S.bovis</i> (n=31)	0	0	0	0	0	1	12	8	8	2
<i>S.uberis</i> (n=34)	0	0	0	0	0	0	21	8	5	0
<i>S.salivarius</i> (n=36)	0	0	0	0	0	1	24	5	5	1
<i>S.sanguinis</i> (n=28)	0	0	0	0	0	0	21	7	0	0
<i>S.mutans</i> (n=31)	0	0	0	0	0	0	19	4	7	1
<i>S.pneumoniae</i> (n=29)	0	0	0	0	0	2	17	5	5	0
Штаммов <i>Streptococcus spp.</i> (n=275)	0	0	0	0	0	4	173	51	42	5
<i>S.aureus</i> (n=28)	0	0	0	0	2	16	7	1	1	1
<i>S.epidermidis</i> (n=35)	0	0	0	0	1	23	2	5	3	1
<i>S.haemolyticus</i> (n=40)	0	0	0	0	0	19	11	7	2	1
Штаммов <i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i> (n=103)	0	0	0	0	3	58	20	13	6	3

Штамм микроорганизма	МПК (мкг/мл)									
	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125,0	250,0	500,0	750,0	1000,0
<i>E.coli</i> (n=)	0	0	0	1	18	8	5	2	0	0
<i>B.cereus</i> (n=)	0	0	0	0	13	5	2	1	0	0

Опытные штаммы микроорганизмов оказались более чувствительны к исследуемому препарату. 3 штамма *Staphylococcus spp.* были чувствительны к циклическому амиду **7D** в дозе 62,5 мкг/мл. 1 штамм *E.coli* также оказался чувствителен к циклическому амиду **7D** в дозе 31,25 мкг/мл. Наибольшее число штаммов *Staphylococcus spp.* были чувствительны к исследуемому соединению в дозах 125,0 мкг/мл (n=58 из 103 исследованных) и 250,0 мкг/мл (n=20 из 103 исследованных), штаммы *Streptococcus spp.* в дозах 250,0 мкг/мл (n=173 из 275 исследованных) и 500,0 мкг/мл (n=51 из 275 исследованных), *E.coli* – 62,5 мкг/мл (n=18 из 34 исследованных), *B.cereus* – 62,5 мкг/мл (n=13 из 21 исследованного). В исследовании участвовали штаммы *S.aureus* устойчивые к нитрофурантоину (n=5 с МПК 128 мкг/мл). Изучаемый циклический амид **7D** был активен в отношении этих штаммов в дозе 125,0 мкг/мл. Также в исследовании участвовали штаммы *E.coli* устойчивые к пиперациллину (n=9 с МПК 128 мкг/мл), пиперациллин/тазобактаму (n=4 с МПК 128 мкг/мл, n=7 с МПК 256 мкг/мл), тикарциллин/клавуланату (n=10 с МПК 128 мкг/мл, n=1 с МПК 256 мкг/мл), цефтриаксону (n=9 с МПК 128 мкг/мл), нитрофурантоину (n=8 с МПК 128 мкг/мл, n=2 с МПК 256 мкг/мл). Изучаемый амид **7D** был активен в отношении этих штаммов в дозах 62,5 и 125,0 мкг/мл. Изучалась чувствительность опытных штаммов *B.cereus* устойчивых к пиперациллину (n=1 с МПК 128 мкг/мл), пиперациллин/тазобактаму (n=2 с МПК 256 мкг/мл), тикарциллин/клавуланату (n=4 с МПК 128 мкг/мл), нитрофурантоину (n=5 с МПК 128 мкг/мл). Амид с лабораторным шифром **7D** подавлял рост и размножение вышеуказанных штаммов *B.cereus* в дозе 62,5 мкг/мл.

9-Гидрокси-5-метил-2-фенил-9-(трифторметил)-1,6,8,9-тетрагидро-7H-пирроло[2,3-f]хинолин-7-он (**7D**) обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении изученных штаммов грамотрицательных

микроорганизмов *in vitro*, за исключением синегнойной палочки. Проявляет противомикробную активность в отношении изученных грамположительных микроорганизмов *in vitro*.

Исследуемое соединение **7D** способно замедлять или подавлять рост и размножение клинических штаммов *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.pyogenes*, *S.pneumoniae*, *S.agalactiae*, *B.cereus*, *E.coli*, *E.cloaceae*, *K.pneumoniae*.

Циклический амид **7D** обладает способностью подавлять рост и размножение клинического штамма *M.tuberculosis*, чувствительного к противотуберкулезным препаратам, в дозе 300 мкг/мл [132].

Относительно тест-штаммов микроорганизмов соединение с лабораторным шифром **ТФПХ** проявило следующую активность: для *S.aureus* 25923 ATCC, *E.coli* 25922 ATCC, *P.aeruginosa* 27853 ATCC, *S.pyogenes* 1238 ATCC, *B.cereus* 96 МПК исследуемого соединения составили более 250 мкг/мл (табл. 5.14).

Таблица 5.14 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению ТФПХ (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	++	++	++	++	++
	125,0	++	++	++	++	++
	62,5	+++	+++	+++	++	++
	31,3	+++	+++	+++	+++	+++
	15,7	+++	+++	+++	+++	+++
	7,9	+++	+++	+++	+++	+++
	3,9	+++	+++	+++	+++	+++
	1,96	+++	+++	+++	+++	+++
	0,98	+++	+++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

При содержании 500 мкг/диск в ДДМ исследуемое соединение **ТФПХ** значимой задержки роста не вызывало, как в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus* 906, *Staphylococcus aureus* 43300 ATCC, *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC, *Streptococcus pneumoniae* 49619 ATCC, *Enterococcus faecalis* 19433 ATCC), так и грамотрицательных исследуемых тест-штаммов микроорганизмов (*Escherichia coli* M-17, *Salmonella enteritidis* 5765 ATCC, *Shigella sonnei* S-форма, *Citrobacter freundii* 101/57, *Klebsiella pneumoniae* 13883, *Proteus vulgaris* «Цветков», *Pseudomonas aeruginosa* 453) (таблица 5.15).

Таблица 5.15 – Антибактериальная активность соединения ТФПХ относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения ТФПХ
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	14	малоактивно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	13	малоактивно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	12	малоактивно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	13	малоактивно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433 ATCC	12	малоактивно
<i>Escherichia coli</i> M-17	14	малоактивно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	13	малоактивно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма	13	малоактивно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	12	малоактивно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 ATCC	13	малоактивно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	12	малоактивно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	12	малоактивно

Примечание: соединение высокоактивно – полное отсутствие роста в диаметре >25 мм; соединение активно – полное отсутствие роста в диаметре 16-25

мм; соединение малоактивно – полное отсутствие роста в диаметре 10-15 мм; соединение неактивно – задержка роста не наблюдается.

Из проведенного исследования следует, что соединение с лабораторным шифром **ТФПХ** малоактивно в отношении исследованных грамположительных и грамотрицательных тест-штаммов микроорганизмов *in vitro*.

Относительно тест-штаммов микроорганизмов соединение с лабораторным шифром **КПХ** проявило следующую активность: для *S.aureus* 25923 ATCC, *E.coli* 25922 ATCC, *P.aeruginosa* 27853 ATCC, *S.pyogenes* 1238 ATCC, *B.cereus* 96 МПК исследуемого соединения составили более 250 мкг/мл (таблица 5.16).

Таблица 5.16 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению КПХ (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	+++	+++	+++	+++	+++
	125,0	+++	+++	+++	+++	+++
	62,5	+++	+++	+++	+++	+++
	31,3	+++	+++	+++	+++	+++
	15,7	+++	+++	+++	+++	+++
	7,9	+++	+++	+++	+++	+++
	3,9	+++	+++	+++	+++	+++
	1,96	+++	+++	+++	+++	+++
	0,98	+++	+++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения

МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

При нагрузке 500 мкг/диск в ДДМ исследуемое соединение **КПХ** задержки роста не вызывало, как в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus* 906, *Staphylococcus aureus* 43300 ATCC, *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC, *Streptococcus pneumoniae* 49619 ATCC, *Enterococcus faecalis* 19433 ATCC), так и грамотрицательных исследуемых тест-штаммов микроорганизмов (*Escherichia coli* M-17, *Salmonella enteritidis* 5765 ATCC, *Shigella sonnei* S-форма, *Citrobacter freundii* 101/57, *Klebsiella pneumoniae* 13883, *Proteus vulgaris* «Цветков», *Pseudomonas aeruginosa* 453) (таблица 5.17).

Таблица 5.17 – Антибактериальная активность соединения КПХ относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения КПХ
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	≥ 10	неактивно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	≥ 10	неактивно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	≥ 10	неактивно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	≥ 10	неактивно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433 ATCC	≥ 10	неактивно
<i>Escherichia coli</i> M-17	≥ 10	неактивно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	≥ 10	неактивно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма	≥ 10	неактивно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	≥ 10	неактивно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 ATCC	≥ 10	неактивно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	≥ 10	неактивно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	≥ 10	неактивно

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

Из проведенного исследования следует, что соединение с лабораторным шифром **КПХ** неактивно в отношении исследованных грамположительных и грамотрицательных тест-штаммов микроорганизмов *in vitro*.

В группе соединений, полученных на основе 6-аминоиндола, противомикробную активность проявили вещества с лабораторным шифром **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 некоторых других грамотрицательных микроорганизмов. Циклический амид **7D** активен в отношении антибиотикоустойчивых штаммов *S.aureus*, в том числе MRSA штамма, *E.coli* и *B.cereus*. Циклический амид **7D** 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 не выраженной противомикробной активностью и узким спектром противомикробного действия.

В рамках дальнейшего исследования биологических свойств была исследована острая токсичность *N*-(1,5-диметил-2-фенил-1*H*-индол-6-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (**S3**) и 9-гидрокси-5-метил-2-фенил-9-(трифторметил)-1,6,8,9-тетрагидро-7*H*-пирроло[2,3-*f*]хинолин-7-он (**7D**).

При внутрибрюшинном введении соединения с лабораторным шифром **S3** для самцов мышей LD₅₀ составила 853 (755÷964) мг/кг, LD₁₆ – 606 мг/кг, LD₈₄ – 1032 мг/кг, для самок мышей LD₅₀ – 748 (662÷845) мг/кг, LD₁₆ – 507 мг/кг, LD₈₄ – 965 мг/кг. Для самцов крыс LD₅₀ составила 711 (629÷803) мг/кг, LD₁₆ – 586 мг/кг, LD₈₄ – 938 мг/кг, для самок крыс LD₅₀ – 596 (527÷673) мг/кг, LD₁₆ – 393 мг/кг, LD₈₄ – 887 мг/кг.

Перед гибелью животных, через 15-20 мин после введения исследуемого соединения наблюдалось сходная картина острого токсикоза.

При внутрижелудочном введении мышам LD₅₀ для самцов составила 1095 (978÷1226) мг/кг, LD₁₆ – 821 мг/кг, LD₈₄ – 1397 мг/кг, для самок мышей LD₅₀ – 1041 (929÷1166) мг/кг, LD₁₆ – 710 мг/кг, LD₈₄ – 1334 мг/кг.

При внутрижелудочном введении крысам в максимально возможном объеме и максимально возможной концентрации для данного способа введения соединение **S3** не вызывало гибель экспериментальных животных, вследствие чего определение средней смертельной дозы не представлялось возможным.

При накожном нанесении исследуемого соединения в максимально возможной концентрации амид **S3** не вызывал гибель животных, вследствие чего определение LD₅₀ при накожном нанесении не представлялось возможным.

При внутрибрюшинном введении соединения с лабораторным шифром **7D** для самцов мышей LD₅₀ составила 863 (771÷967) мг/кг, LD₁₆ – 616 мг/кг, LD₈₄ – 1042 мг/кг, для самок мышей LD₅₀ – 760 (679÷851) мг/кг, LD₁₆ – 458 мг/кг, LD₈₄ – 977 мг/кг. Для самцов крыс LD₅₀ составила 623 (556÷698) мг/кг, LD₁₆ – 494 мг/кг, LD₈₄ – 748 мг/кг, для самок крыс LD₅₀ – 590 (527÷661) мг/кг, LD₁₆ – 411 мг/кг, LD₈₄ – 707 мг/кг.

Перед гибелью животных, через 15-20 мин после введения исследуемого соединения наблюдалось сходная картина острого токсикоза.

При внутрижелудочном введении мышам LD₅₀ для самцов составила 1105 (969÷1259) мг/кг, LD₁₆ – 833 мг/кг, LD₈₄ – 1501 мг/кг, для самок мышей LD₅₀ – 1050 (921÷1197) мг/кг, LD₁₆ – 721 мг/кг, LD₈₄ – 1391 мг/кг.

При внутрижелудочном введении крысам в максимально возможном объеме и максимально возможной концентрации для данного способа введения соединение **7D** не вызывало гибель экспериментальных животных, вследствие чего определение средней смертельной дозы не представлялось возможным.

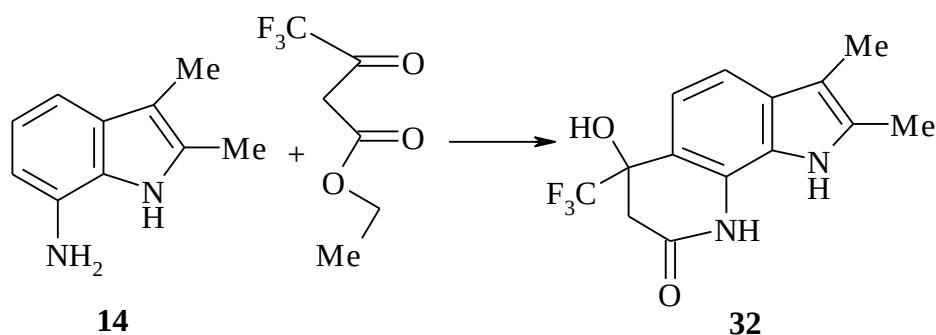
При накожном нанесении исследуемого соединения в максимально возможной концентрации амид **7D** не вызывал гибель животных, вследствие чего определение LD₅₀ при накожном нанесении не представлялось возможным.

По классификации токсичности веществ [79] изучаемые соединения относятся к практически нетоксичным соединениям.

ГЛАВА 6. СИНТЕЗ И ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ 7-АМИНО-2,3-ДИМЕТИЛ-1,2,3- ТРИМЕТИЛИНДОЛОВ

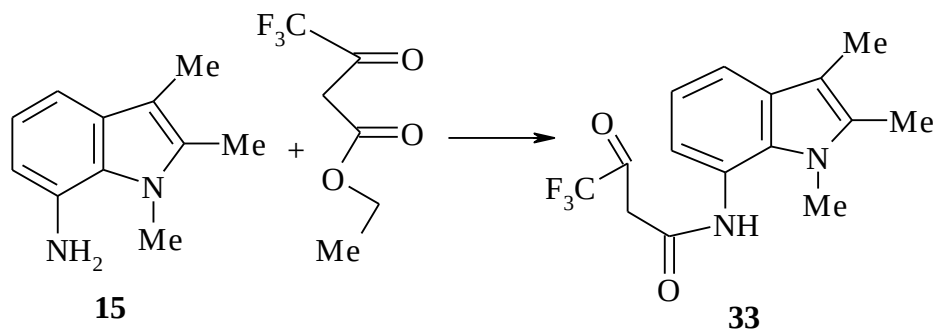
При кипячении в бензоле с каталитическими количествами ледяной уксусной кислоты 7-амино-2,3-диметилиндол (**12**) и трифторацетоуксусный эфир реагировали с образованием циклического амида **32** (схема 6.1) [161; 525].

Схема 6.1



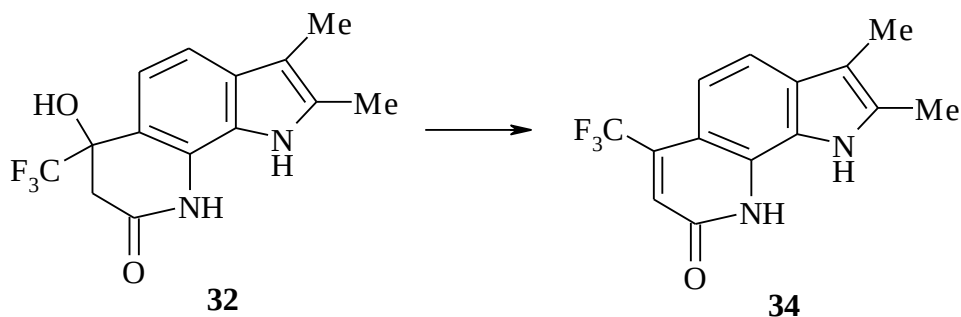
В кипящем бензоле с каталитическими количествами соляной кислоты 7-амино-1,2,3-триметилиндол (**15**) с трифторацетоуксусным эфиром давал нециклический амид **33** (схема 6.2) [161; 525].

Схема 6.2



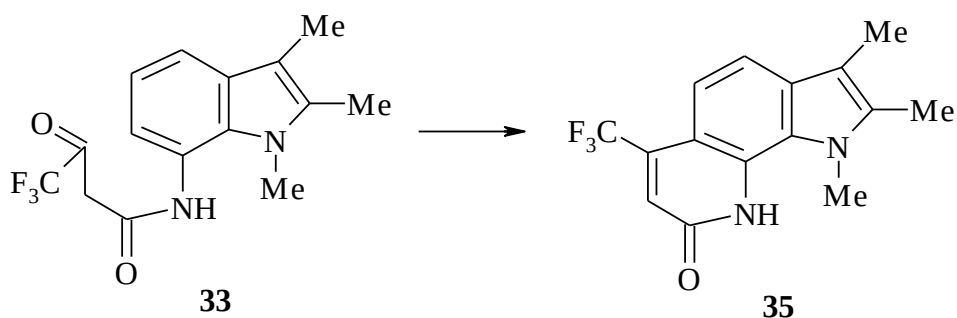
В кислотных условиях (кипящая вода - трифторуксусная кислота) циклический амид **32** с отщеплением воды ароматизовался в трифторметилпирролохинолон **34** (схема 6.3).

Схема 6.3



Нециклический амид **33** под действием той же трифторуксусной кислоты подвергался циклизации с одновременной ароматизацией, превращаясь в трифторметилпирролохинолон **35** (схема 6.4) [161; 525].

Схема 6.4



Под действием диметилсульфата трифторметилпиррохинолон **34** метилировался по пиридоновому и пиррольному атомам азота, а трифторметилпиррохинолон **35** по атому азота пиридонового кольца. При этом образовывался дважды метилированный трифторметилпирролохинолон **36** (схема 6.5).

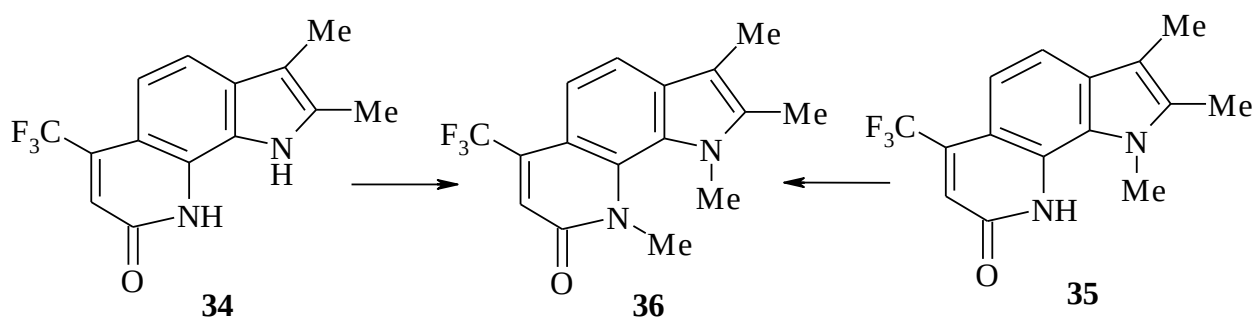


Таблица 6.1 – Внеэкспериментальный прогноз противомикробной активности в ряду производных замещенных 7-аминоиндолов

Соединение	Структурная формула	<i>Pa</i>
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 (32-HD)	 HD	0,817
2,3-Диметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8 <i>H</i> -пирроло[3,2- <i>h</i>]хино-лин-8-он (34-1D)	 1D	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 (36-4D)	 4D	0,926

В ходе работы проведено изучение противомикробной активности и спектра антимикробного действия, полученных и описанных нами, 6-гидрокси-2,3-диметил-6-(трифторметил)-1,6,7,9-тетрагидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]хинолина-8-она **32** (лабораторный шифр **HD**), 2,3-диметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*] хинолин-8-она (**34**, лабораторный шифр **1D**) и 1,2,3,9-тетраметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]хинолин-8-она **36** (лабораторный шифр **4D**) [54; 55; 125; 126; 127; 128; 130; 465].

Относительно тест-штаммов микроорганизмов соединение с лабораторным шифром **HD (32)** проявило следующую активность: для *S.aureus* 25923 ATCC – МПК исследуемого соединения составила 59 мкг/мл, для *E.coli* 25922 ATCC – 108,0 мкг/мл, для *P.aeruginosa* 27853 ATCC – 184,0 мкг/мл, для *S.pyogenes* 1238 ATCC – 117,0 мкг/мл, *B.cereus* 96 – 117,0 мкг/мл (таблица 6.2).

Таблица 6.2 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению HD (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	0	+/-	+/-	+/-	+/-
	184,0	0	+/-	+/- ¹	+/-	+/-
	117,0	+/-	+/-	+	+/- ¹	+/- ¹
	108,0	+/-	+/- ¹	+	+	+
	59,0	+/- ¹	+	++	+	+
	28,5	+	++	++	++	++
	14,25	+	++	+++	++	++
	7,0	++	+++	+++	+++	+++
	3,5	++	+++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: – ¹ титр активности, «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

Исследуемое соединение в ДДМ способно подавлять рост как грамположительных тест-штаммов (*Staphylococcus aureus* 906, *Staphylococcus aureus* 43300 ATCC, *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC, *Streptococcus pneumoniae* 49619 ATCC, *Enterococcus faecalis* 19433 ATCC) исследуемых микроорганизмов, так и грамотрицательных тест-штаммов (*Escherichia coli* M-17, *Salmonella enteritidis* 5765 ATCC, *Shigella sonnei* S-форма, *Citrobacter freundii* 101/57, *Klebsiella pneumoniae* 13883 ATCC, *Proteus vulgaris* «Цветков», *Pseudomonas aeruginosa* 453) (таблица 6.3).

Таблица 6.3 – Антибактериальная активность соединения HD относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения HD
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	23	активно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	17	активно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	16	активно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	26	высокоактивно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433 ATCC	16	активно
<i>Escherichia coli</i> M-17	20	активно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	17	активно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма	16	активно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	16	активно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 ATCC	18	активно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	17	активно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	18	активно

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

Чувствительность к изучаемому циклическому амиду в виде задержки роста от 16 мм до 23 мм в диаметре наблюдалась у клинических штаммов грамположительных микроорганизмов *S.aureus* (n=9 из 10 исследованных), *S.epidermidis* (n=17), *S.saprophyticus* (n=9), *S.haemolyticus* (n=7), *S.pyogenes* (n=10), *S.pneumoniae* (n=12 из 13 исследованных) *S.salivarius* (n=11 из 12 исследованных), *S.uberis* (n=7), *S.mitis* (n=10), *S.warneri* (n=7), *S.mutans* (n=10), *S.agalactia* (n=9), *E.faecalis* (n=8), *E.faecium* (n=7) и грамотрицательных микроорганизмов *E.coli* (n=29), *S.enteritidis* (n=14), *S.typhimurium* (n=4), *S.sonnei* (n=3), *C.freundii* (n=9 из 11 исследованных), *E.cloacae* (n=8 из 9 исследованных), *E.aerogenes* (n=8), *E.amnigenes* (n=7), *E.gergoviae* (n=4), *K.pneumoniae* (n=13 из 15 исследованных), *M.morganii* (n=3), *P.agglomerans* (n=6), *A.baumani* (n=8), *P.aeruginosa* (n=16 из 20

исследованных), *K.oxytoca* (n=12), *P.vulgaris* (n=15), *P.mirabilis* (n=9 из 11 исследованных) (таблица 6.4).

Таблица 6.4 – Антибактериальная активность соединения HD относительно опытных штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Штамм микроорганизма	Зона задержки роста / Количество штаммов микроорганизмов			
	≤ 10 мм	11-15 мм	15-16 мм	≥ 25 мм
1	2	3	4	5
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=10)	-	1	9	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=17)	-	-	17	-
<i>Staphylococcus warneri</i> (n=7)	-	-	7	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (n=9)	-	-	9	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n=7)	-	-	7	-
Штаммов <i>Staphylococcus spp.</i> (n=50)	-	1	49	
<i>Streptococcus pyogenes</i> (n=10)	-	-	10	-
<i>Streptococcus pneumonia</i> (n=13)	-	1	12	-
<i>Streptococcus salivarius</i> (n=12)	-	1	11	-
<i>Streptococcus uberis</i> (n=7)	-	-	7	-
<i>Streptococcus mitis</i> (n=10)	-	-	10	-
<i>Streptococcus agalactia</i> (n=9)	-	-	9	-
<i>Streptococcus sanguinis</i> (n=8)	-	-	8	-
<i>Streptococcus mutans</i> (n=10)	-	-	10	-
Штаммов <i>Streptococcus spp.</i> (n=79)	-	2	77	
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=8)	-	-	8	-
<i>Enterococcus faecium</i> (n=7)	-	-	7	-

1	2	3	4	5
Штаммов <i>Enterococcus</i> spp. (n=15)	-	-	15	
<i>Salmonella enteritidis</i> (n=14)	-	-	14	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (n=4)	-	-	4	-
Штаммов <i>Salmonella</i> spp. (n=18)	-	-	18	
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=9)	-	1	8	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=8)	-	-	8	-
<i>Enterobacter gergoviae</i> (n=4)	-	-	4	-
<i>Enterobacter amnigenes</i> (n=7)	-	-	7	-
Штаммов <i>Enterobacter</i> spp. (n=28)	-	1	27	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=15)	-	2	13	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=12)	-	-	12	-
Штаммов <i>Klebsiella</i> spp. (n=27)	-	2	25	
<i>Proteus vulgaris</i> (n=15)	-	-	15	-
<i>Proteus mirabilis</i> (n=11)	-	2	9	-
Штаммов <i>Proteus</i> spp. (n=26)	-	2	24	
<i>Escherichia coli</i> (n=29)	-	-	29	-
<i>Shigella sonnei</i> (n=3)	-	-	3	-
<i>Citrobacter freundii</i> (n=11)	-	2	9	-
<i>Morganella morganii</i> (n=3)	-	-	3	-
<i>Pantoea agglomerans</i> (n=6)	-	-	6	-
<i>Hafnia alvei</i> (n=2)	-	2	-	-
<i>Acinetobacter baumani</i> (n=8)	-	-	8	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=20)	-	4	16	-

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

Таким образом, циклический амид **HD** проявил широкий спектр противомикробной активности, как в отношении исследованных грамположительных, так и в отношении исследованных грамотрицательных микроорганизмов *in vitro*. *Staphylococcus aureus* 43300 ATCC (MRSA) чувствителен к исследуемому соединению. Для опытных штаммов *Staphylococcus spp.* – МПК исследуемого соединения составила 14,25-1000 мкг/мл, для *E.coli* – 59,0-1000 мкг/мл, для *P.aeruginosa* – 117,0-1000 мкг/мл, для *Streptococcus spp.* – 28,5-1000 мкг/мл, *B.cereus* – 117-1000 мкг/мл (таблица 6.5).

Таблица 6.5 – Показатели МПК соединения HD для опытных штаммов микроорганизмов (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Штамм микроорганизма	МПК (мкг/мл)									
	3,5	7,0	14,25	28,5	59,0	117,0	184,0	250,0	500,0	1000,0
<i>S.pyogenes</i> (n=19)	0	0	0	0	1	15	0	1	1	1
<i>S.mitis</i> (n=25)	0	0	0	1	3	15	2	1	1	2
<i>S.agalactiae</i> (n=29)	0	0	0	0	1	19	3	2	3	1
<i>S.bovis</i> (n=32)	0	0	0	0	0	23	3	4	1	1
<i>S.uberis</i> (n=22)	0	0	0	1	0	12	2	2	3	2
<i>S.salivarius</i> (n=28)	0	0	0	0	2	18	4	2	1	1
<i>S.sanguinis</i> (n=23)	0	0	0	1	1	10	7	2	1	1
<i>S.mutans</i> (n=31)	0	0	0	1	1	14	8	3	2	2
<i>S.pneumoniae</i> (n=16)	0	0	0	0	2	10	1	1	1	1
Штаммов <i>Streptococcus spp.</i> (n=225)	0	0	0	4	11	136	30	18	14	12
<i>S.aureus</i> (n=54)	0	0	2	5	30	11	2	2	1	1
<i>S.epidermidis</i> (n=45)	0	0	5	2	23	9	3	1	1	1
<i>S.haemolyticus</i> (n=40)	0	0	0	3	1	15	9	8	3	1
Штаммов <i>Staphylococcus spp.</i> (n=139)	0	0	7	10	54	35	14	11	5	3

Штамм микроорганизма	МПК (мкг/мл)									
	3,5	7,0	14,25	28,5	59,0	117,0	184,0	250,0	500,0	1000,0
<i>E.coli</i> (n=48)	0	0	0	0	3	18	14	9	2	2
<i>P.aeruginosa</i> (n=33)	0	0	0	0	0	2	15	11	3	2
<i>B.cereus</i> (n=13)	0	0	0	0	0	8	2	2	0	1

Опытные штаммы микроорганизмов оказались более чувствительны к исследуемому препарату. 7 штаммов *Staphylococcus spp.* были чувствительны к циклическому амиду **HD** в дозе 14,25 мкг/мл и 10 штаммов в дозе 28,5 мкг/мл. 2 штамма *E.coli* также оказались чувствительны к изучаемому амиду **HD** в дозе 59,0 мкг/мл. Наибольшее число штаммов *Staphylococcus spp.* были чувствительны к исследуемому соединению в дозах 59,0 мкг/мл (n=54 из 139 исследованных) и 117,0 мкг/мл (n=35 из 139 исследованных), штаммы *Streptococcus spp.* в дозе 117,0 мкг/мл (n=136 из 225 исследованных), однако 4 штамма *Streptococcus spp.* были чувствительны к МПК 28,5 мкг/мл и 11 штаммов к МПК 59,0 мкг/мл, *E.coli* – 117,0 мкг/мл (n=18 из 48 исследованных), *P.aeruginosa* – 2 штамма к МПК 117,0 мкг/мл, 184,0 мкг/мл (n=11 из 33 исследованных), *B.cereus* – 117,0 мкг/мл. В исследовании участвовали штаммы *S.aureus* устойчивые к азтреонаму (n=1 с МПК 64 мкг/мл), ванкомицину (n=5 с МПК 64 мкг/мл), нитрофурантоину (n=5 с МПК 128 мкг/мл), хлорамфениколу (n=4 с МПК 64 мкг/мл), цефтриаксону (n=1 с МПК 64 мкг/мл). Изучаемый циклический амид **HD** был активен в отношении этих штаммов в дозах 28,5 и 59,0 мкг/мл. Также в исследовании участвовали штаммы *E.coli* устойчивые к пиперациллину (n=17 с МПК 128 мкг/мл), пиперациллин/тазобактаму (n=4 с МПК 128 мкг/мл, n=7 с МПК 256 мкг/мл), тикарциллин/клавуланату (n=14 с МПК 128 мкг/мл, n=1 с МПК 256 мкг/мл), цефтриаксону (n=9 с МПК 128 мкг/мл), нитрофурантоину (n=9 с МПК 128 мкг/мл, n=2 с МПК 256 мкг/мл). Изучаемый циклический амид **HD** был активен в отношении этих штаммов в дозах 59,0 и 117,0 мкг/мл. Изучалась чувствительность опытных штаммов *P.aeruginosa* устойчивых к карбенициллину (n=12 с МПК 256 мкг/мл, n=10 с МПК 512 мкг/мл), пиперациллин/тазобактаму (n=4 с МПК 256 мкг/мл), тикарциллин/клавуланату (n=5 с МПК 256 мкг/мл),

фосфомицину (n=2 с МПК 256 мкг/мл), сульфизоксазолу (n=16 с МПК 512 мкг/мл). Циклический амид с лабораторным шифром **HD** подавлял рост и размножение вышеуказанных штаммов *P.aeruginosa* в дозе 184,0 мкг/мл.

Изучаемое соединение **HD** способно замедлять или подавлять рост и размножение клинических штаммов *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.saprophyticus*, *S.haemolyticus*, *S.warneri*, *S.pyogenes*, *S.pneumoniae*, *S.salivarius*, *S.uberis*, *S.mitis*, *S.agalactiae*, *S.sanguinis*, *S.mutans*, *E. faecalis*, *E.faecium*, *E.coli*, *S.enteritidis*, *S.typhimurium*, *S.sonnei*, *C.freundii*, *E.cloaceae*, *E.aerogenes*, *E.gergoviae*, *E.amnigenes*, *E.hormaechei*, *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *P.vulgaris*, *M.morganii*, *P.agglomerans*, *A.baumani*, *P.aeruginosa*.

Циклический амид **HD** обладает способностью подавлять рост и размножение клинического штамма *M.tuberculosis*, чувствительного к противотуберкулезным препаратам, в дозе 240 мкг/мл [128; 130; 133].

Соединение с лабораторным шифром **1D (34)** относительно тест-штаммов микроорганизмов проявило следующую активность: для *S.aureus* 25923 ATCC, *E.coli* 25922 ATCC, *P.aeruginosa* 27853 ATCC минимальная подавляющая концентрация (МПК) исследуемого соединения составила более 250 мкг/мл, для *S.pyogenes* 1238 ATCC – 125 мкг/мл, *B.cereus* 96 – 125 мкг/мл (таблица 6.6).

Таблица 6.6 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению 1D (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	++	++	++	+/-	+/-
	125,0	+++	+++	+++	+/- ¹	+/- ¹
	62,5	+++	+++	+++	+	+
	31,3	+++	+++	+++	+	+
	15,7	+++	+++	+++	++	++
	7,9	+++	+++	+++	++	++
	3,9	+++	+++	+++	+++	+++
	1,96	+++	+++	+++	+++	+++
	0,98	+++	+++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: – ¹ титр активности, «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

При исследовании в диско-диффузионном методе для изучения чувствительности тест-штаммов *S.aureus* 906, микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* – *E.coli* M-17, *S.enteritidis* 5765 ATCC, *S.sonnei* S-форма, *C.freundii* 101/57, *K.pneumoniae* 13883 ATCC, *P. vulgaris* «Цветков» и *P.aeruginosa* 453 содержание соединения **1D** составляло 500 мкг/диск, для *S.pyogenes* 1238 ATCC, *E.faecalis* 19443 ATCC, *B.cereus* – 250 мкг/диск.

Соединение **1D** вызывало задержку роста тест-штамма *S.pyogenes* 19615 ATCC и *S.pneumoniae* 49619 ATCC до 18 мм. В отношении тест-штаммов *S.aureus* 906, *S.aureus* 43300 ATCC, *E.coli* M-17, *S.enteritidis* 5765 ATCC, *S.sonnei* S-форма,

C.freundii 101/57, *K.pneumoniae* 13883 ATCC, *E.faecalis* 19433 ATCC, *P. vulgaris* «Цветков» и *P.aeruginosa* 453 изучаемое соединение оказалось малоактивно (таблица 6.7).

Таблица 6.7 – Антибактериальная активность соединения 1D относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения 1D
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	15	малоактивно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	14	малоактивно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	18	активно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	18	активно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433 ATCC	14	малоактивно
<i>Escherichia coli</i> M-17	13	малоактивно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	12	малоактивно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма	12	малоактивно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	13	малоактивно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 ATCC	13	малоактивно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	12	малоактивно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	12	малоактивно

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

Исследуемые опытные штаммы *Streptococcus spp.* (n=40 из 61 исследованных) оказались малочувствительны, кроме исследуемых штаммов *S.pyogenes* (n=16), которые были чувствительны к исследуемому соединению при нагрузке 250 мкг/диск. Пирролохинолон **1D** вызывал задержку роста опытных штаммов *B.cereus* (n=7) до 25 мм. Исследуемые опытные штаммы *Staphylococcus spp.* (n=13 из 17 исследованных), *Enterococcus spp.* (n=11), представители семейства *Enterobacteriaceae* (n=40), опытные штаммы *P.aeruginosa* (n=7) не

показали значимую чувствительность к исследуемому пирролохинолону (таблица 6.8).

Таблица 6.8 – Антибактериальная активность соединения 1D относительно опытных штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Штамм микроорганизма	Зона задержки роста / Количество штаммов микроорганизмов			
	≤ 10 мм	11-15 мм	16-25 мм	≥ 25 мм
1	2	3	4	5
<i>Streptococcus mitis</i> (n=10)	1	8	1	-
<i>Streptococcus bovis</i> (n=5)	-	4	1	-
<i>Streptococcus uberis</i> (n=5)	1	2	2	-
<i>Streptococcus salivarius</i> (n=6)	1	4	1	-
<i>Streptococcus sanguinis</i> (n=8)	2	6	-	-
<i>Streptococcus mutans</i> (n=5)	1	-	-	-
<i>Streptococcus pneumonia</i> (n=6)	2	4	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> (n=16)	-	-	16	-
Штаммов <i>Streptococcus spp.</i> (n=61)	8	32	21	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=6)	-	4	2	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=5)	-	5	-	-
<i>Staphylococcus hominis ss hominis</i> (n=6)	1	3	2	-
Штаммов <i>Staphylococcus spp.</i> (n=17)	1	12	4	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=5)	1	4	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=5)	1	4	-	-
<i>Enterobacter gergoviae</i> (n=2)	-	2	-	-
Штаммов <i>Enterobacter spp.</i> (n=12)	2	10	-	-
<i>Klebsiella pneumonia</i> (n=5)	-	5	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=5)	-	5	-	-

1	2	3	4	5
Штаммов <i>Klebsiella</i> spp. (n=10)	-	10	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> (n=6)	-	6	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=5)	-	5	-	-
Штаммов <i>Enterococcus</i> spp. (n=11)	-	11	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=7)	2	5	-	-
<i>Pseudomonas putida</i> (n=4)	-	4	-	-
Штаммов <i>Pseudomonas</i> spp. (n=11)	2	9	-	-
<i>Bacillus cereus</i> (n=7)	-	-	7	-
<i>Proteus vulgaris</i> (n=6)	1	5	-	-
<i>Escherichia coli</i> (n=7)	1	6	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> (n=5)	1	4	-	-

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

Таким образом, соединение с лабораторным шифром **1D** малоактивно в отношении исследуемых грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Тест-штаммы *S.pyogenes* 1238 ATCC, *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC и исследованные опытные штаммы *S.pyogenes* оказались чувствительны к изучаемому соединению, МПК исследованных опытных штаммов *S.pyogenes* составила 65,2-1000 мкг/мл. Тест-штамм *B.cereus* 96 и опытные штаммы *B.cereus* также проявили чувствительность к соединению, МПК исследованных опытных штаммов *B.cereus* составила 125-1000 мкг/мл (таблица 6.9). Проведенное исследование позволяет дать заключение о противомикробной активности пирролохинолона **1D** относительно *S.pyogenes* и *B.cereus in vitro*.

Таблица 6.9 – Показатели МПК соединения 1D для опытных штаммов микроорганизмов (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Штамм микроорганизма	МПК (мкг/мл)									
	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125,0	250,0	500,0	750,0	1000,0
<i>S.pyogenes</i> (n=51)	0	0	0	0	9	15	8	8	5	6
<i>B.cereus</i> (n=22)	0	0	0	0	0	3	5	5	3	6

2,3-Диметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8H-пирроло[3,2-*h*]хинолин-8-он (**1D**) обладает противомикробной активностью в отношении исследуемых тест-штаммов и опытных штаммов *S.pyogenes* и *B.cereus in vitro*.

Значимого эффекта в отношении изученных грамотрицательных микроорганизмов *in vitro* не наблюдается.

Относительно тест-штаммов микроорганизмов соединение с лабораторным шифром **4D** проявило следующую активность: для *S.aureus* 25923 ATCC – МПК исследуемого соединения составила 125 мкг/мл, для *E.coli* 25922 ATCC – 125 мкг/мл, для *P.aeruginosa* 27853 ATCC – более 250 мкг/мл, для *S.pyogenes* 1238 ATCC – 125 мкг/мл, *B.cereus* 96 – 125 мкг/мл (таблица 6.10).

Таблица 6.10 – Чувствительность тест-штаммов микроорганизмов к соединению 4D (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Тест-культура		<i>S.aureus</i> 25923 ATCC	<i>E.coli</i> 25922 ATCC	<i>P.aeruginosa</i> 27853 ATCC	<i>S.pyogenes</i> 1238 ATCC	<i>B.cereus</i> 96
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	+/-	+/-	++	+/-	+/-
	125,0	+/- ¹	+/- ¹	+++	+/- ¹	+/- ¹
	62,5	+	+	+++	+	+
	31,3	+	+	+++	+	+
	15,7	++	++	+++	++	++
	7,9	++	++	+++	++	++
	3,9	+++	+++	+++	+++	+++
	1,96	+++	+++	+++	+++	+++
	0,98	+++	+++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: – ¹ титр активности, «+++» – диффузное помутнение МХБ; «++» – умеренное помутнение МХБ; «+» – слабое помутнение МХБ; «+/-» – отсутствие помутнения МХБ (как в «отрицательном контроле»); «0» – отсутствие роста при пересеве на МХА.

Изучаемое соединение в исследуемых дозах способно подавлять рост как тест-штаммов исследуемых грамположительных микроорганизмов, так и грамотрицательных (таблица 6.11).

Таблица 6.11 – Антибактериальная активность соединения 4D относительно тест-штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Тест-штамм микроорганизма	Зона задержки роста (мм)	Активность соединения 4D
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	18	активно
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300 ATCC	16	активно
<i>Streptococcus pyogenes</i> 19615 ATCC	16	активно
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619 ATCC	16	активно
<i>Enterococcus faecalis</i> 19433ATCC	17	активно
<i>Escherichia coli</i> M-17	18	активно
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	16	активно
<i>Shigella sonnei</i> S-форма 20	17	активно
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	16	активно
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 ATCC	16	активно
<i>Proteus vulgaris</i> «Цветков»	16	активно
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	16	активно

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

Пирролохинолон **4D** в исследуемых дозах способен подавлять рост как опытных штаммов исследуемых грамположительных микроорганизмов *Staphylococcus spp.* (n=47 из 51 исследованного), *Streptococcus spp.* (n=56 из 59 исследованных), *Enterococcus spp.* (n=15), так и опытных штаммов грамотрицательных микроорганизмов *Escherichia coli* (n=11 из 12 исследованных), *Salmonella spp.* (n=16 из 17 исследованных), *Shigella sonnei* (n=3), *Citrobacter freundii* (n=9 из 10 исследованных), *Enterobacter spp.* (n=24 из 25 исследованных), *Klebsiella spp.* (n=12 из 17 исследованных), *Proteus spp.* (n=13 из 16 исследованных), *Morganella morganii* (n=3), *Pantoea agglomerans* (n=6 из 8 исследованных), *Hafnia alvei* (n=2), *Acinetobacter baumani* (n=11), *Pseudomonas aeruginosa* (n=13 из 15 исследованных) (таблица 6.12).

Таблица 6.12 – Антибактериальная активность соединения 4D относительно опытных штаммов микроорганизмов (диско-диффузионный метод)

Штамм микроорганизма	Зона задержки роста / Количество штаммов микроорганизмов			
	≤ 10 мм	11-15 мм	16-25 мм	≥ 25 мм
1	2	3	4	5
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=9)	-	2	7	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n=18)	-	1	17	-
<i>Staphylococcus warneri</i> (n=7)	-	-	7	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (n=10)	-	1	9	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (n=7)	-	-	7	-
Штаммов <i>Streptococcus spp.</i> (n=51)	-	4	47	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> (n=10)	-	-	10	-
<i>Streptococcus pneumonia</i> (n=7)	-	-	7	-
<i>Streptococcus salivarius</i> (n=7)	-	-	7	-
<i>Streptococcus uberis</i> (n=5)	-	-	5	-
<i>Streptococcus mitis</i> (n=8)	-	1	7	-
<i>Streptococcus agalactia</i> (n=6)	-	1	5	-
<i>Streptococcus sanguinis</i> (n=6)	-	1	5	-
<i>Streptococcus mutans</i> (n=10)	-	-	10	-
Штаммов <i>Streptococcus spp.</i> (n=59)	-	3	56	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=8)	-	-	8	-
<i>Enterococcus faecium</i> (n=7)	-	-	7	-
Штаммов <i>Enterococcus spp.</i> (n=15)	-	-	15	-
<i>Salmonella enteritidis</i> (n=13)	-	1	12	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (n=4)	-	-	4	-
Штаммов <i>Salmonella spp.</i> (n=17)	-	1	16	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=7)	-	-	7	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=7)	-	-	7	-
<i>Enterobacter gergoviae</i> (n=4)	-	-	4	-
<i>Enterobacter amnigenes</i> (n=7)	-	1	6	-
Штаммов <i>Salmonella spp.</i> (n=25)	-	1	24	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=10)	-	3	7	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=7)	-	2	5	-
Штаммов <i>Klebsiella spp.</i> (n=17)	-	5	12	-
<i>Proteus vulgaris</i> (n=8)	-	1	7	-

1	2	3	4	5
<i>Proteus mirabilis</i> (n=8)	-	2	6	-
Штаммов <i>Proteus spp.</i> (n=16)	-	3	13	-
<i>Escherichia coli</i> (n=12)	-	1	11	-
<i>Shigella sonnei</i> (n=3)	-	-	3	-
<i>Citrobacter freundii</i> (n=10)	-	1	9	-
<i>Morganella morganii</i> (n=3)	-	-	3	-
<i>Pantoea agglomerans</i> (n=8)	-	2	6	-
<i>Hafnia alvei</i> (n=2)	-	-	2	-
<i>Acinetobacter baumani</i> (n=11)	-	-	11	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=15)	-	2	13	-

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

Таким образом, пирролохинолон с лабораторным шифром **4D** проявил широкий спектр противомикробной активности, как в отношении исследованных грамположительных, так и в отношении исследованных грамотрицательных микроорганизмов *in vitro*. Исследуемое соединение способно задерживать рост *Staphylococcus aureus* 43300 ATCC (MRSA). Для опытных штаммов *Staphylococcus spp.* – МПК изучаемого соединения составила 125-1000 мкг/мл, для *E.coli* – 125-1000 мкг/мл, для *P.aeruginosa* – 500-1500 мкг/мл, для *Streptococcus spp.* – 62,5-1000 мкг/мл, *B.cereus* – 125-1000 мкг/мл (таблица 6.13).

Таблица 6.13 – Показатели МПК соединения 4D для опытных штаммов микроорганизмов (метод серийных разведений в Мюллер-Хинтон бульоне)

Штамм микроорганизма	МПК (мкг/мл)									
	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125,0	250,0	500,0	750,0	1000,0
<i>S.pyogenes</i> (n=54)	0	0	0	0	29	15	6	2	1	1
<i>S.mitis</i> (n=34)	0	0	0	0	16	9	4	3	1	1
<i>S.agalactiae</i> (n=31)	0	0	0	0	14	7	5	1	2	2

Штамм микроорганизма	МПК (мкг/мл)									
	3,9	7,8	15,6	31,25	62,5	125,0	250,0	500,0	750,0	1000,0
<i>S.bovis</i> (n=30)	0	0	0	0	12	6	6	5	0	1
<i>S.uberis</i> (n=35)	0	0	0	0	17	5	5	4	2	2
<i>S.salivarius</i> (n=30)	0	0	0	0	12	7	8	2	1	0
<i>S.sanguinis</i> (n=34)	0	0	0	0	11	9	10	3	1	0
<i>S.mutans</i> (n=38)	0	0	0	0	20	15	1	1	1	0
<i>S.pneumoniae</i> (n=26)	0	0	0	0	10	4	4	6	1	1
Штаммов <i>Streptococcus</i> <i>spp.</i> (n=312)	0	0	0	0	141	77	49	27	10	8
<i>S.aureus</i> (n=33)	0	0	0	0	0	20	7	3	2	1
<i>S.epidermidis</i> (n=25)	0	0	0	0	0	15	8	1	1	0
<i>S.haemolyticus</i> (n=33)	0	0	0	0	0	17	10	2	3	1
Штаммов <i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i> (n=91)	0	0	0	0	0	52	25	6	6	2
<i>E.coli</i> (n=30)	0	0	0	0	0	15	8	5	1	1
<i>P.aeruginosa</i> (n=25)	0	0	0	0	0	0	0	11	6	8
<i>B.cereus</i> (n=15)	0	0	0	0	0	8	4	1	1	1

1,2,3,9-Тетраметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]хинолин-8-он (**4D**) обладает широким спектром противомикробной активности и выраженной антибактериальной активностью в отношении изученных штаммов как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов *in vitro*.

Пирролохинолон **4D** способен замедлять или подавлять рост и размножение клинических штаммов *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.saprophyticus*, *S.haemolyticus*, *S.warneri*, *S.pyogenes*, *S.pneumoniae*, *S.salivarius*, *S.uberis*, *S.mitis*, *S.agalactiae*, *S.sanguinis*, *S.mutans*, *E. faecalis*, *E.faecium*, *E.coli*, *S.enteritidis*, *S.typhimurium*, *S.sonnei*, *C.freundii*, *E.cloacae*, *E.aerogenes*, *E.gergoviae*, *E.amnigenes*, *E.hormaechei*, *K.pneumoniae*, *K.oxytoca*, *P.vulgaris*, *P.mirabilis*, *M.morganii*, *H.alvei*, *P.agglomerans*, *A.baumani*, *P.aeruginosa*.

Соединение **4D** обладает способностью подавлять рост и размножение клинического штамма *M.tuberculosis*, чувствительного к противотуберкулезным препаратам, в дозе 250 мкг/мл [130].

Группа соединений, полученных на основе замещенных 7-аминоиндолов 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 и грамотрицательных микроорганизмов, *M.tuberculosis*. 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 дальнейшего 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**).

При внутрибрюшинном введении соединения с лабораторным шифром **HD** для самцов мышей LD₅₀ составила 1753 (1565÷1963) мг/кг, LD₁₆ – 1306 мг/кг, LD₈₄ – 2032 мг/кг, для самок мышей LD₅₀ – 1649 (1472÷1847) мг/кг, LD₁₆ – 1247 мг/кг, LD₈₄ – 1966 мг/кг. Для самцов крыс LD₅₀ составила 1511 (1337÷1707) мг/кг, LD₁₆ – 1013 мг/кг, LD₈₄ – 1838 мг/кг, для самок крыс LD₅₀ – 1380 (1221÷1560) мг/кг, LD₁₆ – 1010 мг/кг, LD₈₄ – 1675 мг/кг.

Перед гибелью животных, через 15-20 мин после введения исследуемого соединения наблюдалось сходная картина острого токсикоза.

При внутривенном введении мышам LD₅₀ для самцов составила 1994 (1780÷2233) мг/кг, LD₁₆ – 1521 мг/кг, LD₈₄ – 2390 мг/кг, для самок мышей LD₅₀ – 2041 (1822÷2286) мг/кг, LD₁₆ – 1610 мг/кг, LD₈₄ – 2334 мг/кг.

При внутрижелудочном введении крысам в максимально возможном объеме и максимально возможной концентрации для данного способа введения соединение **HD** не вызывало гибель экспериментальных животных, вследствие чего определение средней смертельной дозы не представлялось возможным.

При накожном нанесении исследуемого соединения в максимально возможной концентрации амид **HD** не вызывал гибель животных, вследствие чего определение LD₅₀ при накожном нанесении не представлялось возможным.

По классификации токсичности веществ [79] изучаемое соединение **HD** относится к практически нетоксичным соединениям.

При внутрибрюшинном введении соединения с лабораторным шифром **4D** для самцов мышей LD₅₀ составила 464 (400÷538) мг/кг, LD₁₆ – 316 мг/кг, LD₈₄ – 643 мг/кг, для самок мышей LD₅₀ – 359 (309÷416) мг/кг, LD₁₆ – 251 мг/кг, LD₈₄ – 478 мг/кг. Для самцов крыс LD₅₀ составила 421 (379÷467) мг/кг, LD₁₆ – 255 мг/кг, LD₈₄ – 649 мг/кг, для самок крыс LD₅₀ – 390 (351÷433) мг/кг, LD₁₆ – 210 мг/кг, LD₈₄ – 582 мг/кг.

Перед гибелью животных, через 15-20 мин после введения исследуемого соединения наблюдалось сходная картина острого токсикоза.

При внутрижелудочном введении мышам LD₅₀ для самцов составила 706 (619÷804) мг/кг, LD₁₆ – 533 мг/кг, LD₈₄ – 1042 мг/кг, для самок мышей LD₅₀ – 752 (659÷857) мг/кг, LD₁₆ – 521 мг/кг, LD₈₄ – 992 мг/кг. При внутрижелудочном введении крысам LD₅₀ для самцов составила 751 (670÷841) мг/кг, LD₁₆ – 548 мг/кг, LD₈₄ – 997 мг/кг, для самок крыс LD₅₀ – 799 (713÷894) мг/кг, LD₁₆ – 523 мг/кг, LD₈₄ – 901 мг/кг. Перед гибелью животных, через 25-40 мин после введения, наблюдалась сходная картина острого токсикоза.

При накожном нанесении исследуемого соединения в максимально возможной концентрации амид **4D** не вызывал гибель животных, вследствие чего определение LD₅₀ при накожном нанесении не представлялось возможным.

По классификации токсичности веществ [79] изучаемое соединение **4D** относится к умеренно токсичным соединениям.

ГЛАВА 7. ТИП ПРОТИВОМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ЗАМЕЩЕННЫХ 4-, 5-, 6-, 7-АМИНОИНДОЛОВ

Для эксперимента готовили растворы исследуемых соединений в концентрации 100 мг/мл (конечная концентрация $\approx$ 80-100 мкг/мл) в физиологическом растворе и разливали по пробиркам (по 1 мл), для азитромицина 2 мг/мл (конечная концентрация $\approx$ 1-2 мкг/мл). В качестве препарата сравнения был выбран азитромицин, как классический препарат с бактериостатическим действием, МПК₉₀ азитромицина для *S.aureus* 0,01-2 мкг/мл [81].

Контрольные пробирки не содержали исследуемые соединения. Для работы использовали стандартный инокулюм *S.aureus* ATCC 6538-*P*, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту Мак-Фарланда и содержащий примерно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. МПК исследуемых соединений для *S.aureus* составляют у циклического амида **5D** 7,8 мкг/мл, циклического амида **7D** 125 мкг/мл, для амида **S3** 62,5 мкг/мл, циклического амида **HD** – 59 мкг/мл. Инокулюм добавляли по 1 мл в пробирки с исследуемыми соединениями. Отмечали время, а затем через 5, 10, 15 и 30 минут, 1, 2 и 4 часа с помощью нихромовой петли делали высевы в пробирки, содержащие 1 мл Мюллер-Хинтон бульона. Пробирки помещали в термостат при 37 °С и наблюдали в течение 5-ти суток. Рост исследуемых микроорганизмов фиксировали в проходящем свете и по изменению оптической плотности культуральной среды фотокolorиметрически с использованием фотоэлектроколориметра (ФЭК) Аpel «AP-101». В процессе проведения эксперимента было выявлено, что видимый рост микроорганизмов в питательной среде наблюдается при показателях оптической плотности (D) культуральной среды более 0,21. «Отрицательный» контроль микроорганизмов (содержащий инокулюм одной нихромовой петли в 1 мл МХБ и хранившийся в холодильнике) имеет значение D=0,003.

В контрольных пробирках видимый рост микроорганизмов наблюдался через 20 часов после посева (таблица 7.1).

Таблица 7.1 – Показатели роста *S.aureus ATCC 6538-P* после экспозиций в физиологическом растворе

Время экспозиции	Контроль	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	1 час	2 часа	4 часа
Время исследования								
1-е сутки	рост	рост	рост	рост	рост	рост	рост	рост

Показатели оптической плотности культуральной среды после первых суток культивирования демонстрировали прирост микробной массы до 0,26 и более (таблица 7.2; рисунок 7.1). Через 48 часов культивирования значения D микробной популяции *S.aureus ATCC 6538-P* достигли 0,39, через 72 ч – 0,51, через 96 ч – 0,56, через 110 часов культивирования этот показатель составил 0,6. Таким образом, в течение эксперимента наблюдался прирост микробной популяции на 50 %, на 30 %, на 9 %, на 7 % после 2-х, 3-х, 4-х и 5-ти суток культивирования соответственно (рисунок 7.2). Снижение интенсивности роста объясняется истощением ресурсов питательной среды.



Рисунок 7.1 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus ATCC 6538-P* при культивировании в течение 5 суток

Таблица 7.2 – Динамика роста *S.aureus ATCC 6538-P* по показателям оптической плотности культуральной среды

Время экспозиции	Контроль	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	1 час	2 часа	4 часа
Время исследования								
1-е сутки	0,26±0,03	0,22±0,01	0,22±0,02	0,25±0,04	0,26±0,02	0,23±0,05	0,27±0,03	0,25±0,02
2-е сутки	0,39±0,06	0,38±0,07	0,38±0,09	0,38±0,12	0,37±0,08	0,43±0,09	0,39±0,04	0,44±0,01
3-е сутки	0,51±0,05	0,45±0,02	0,45±0,04	0,48±0,02	0,49±0,08	0,51±0,03	0,46±0,02	0,51±0,01
4-е сутки	0,56±0,02	0,53±0,01	0,53±0,03	0,56±0,03	0,56±0,01	0,58±0,01	0,54±0,01	0,57±0,01
5-е сутки	0,60±0,02	0,54±0,03	0,54±0,05	0,57±0,03	0,57±0,01	0,59±0,01	0,55±0,04	0,58±0,03

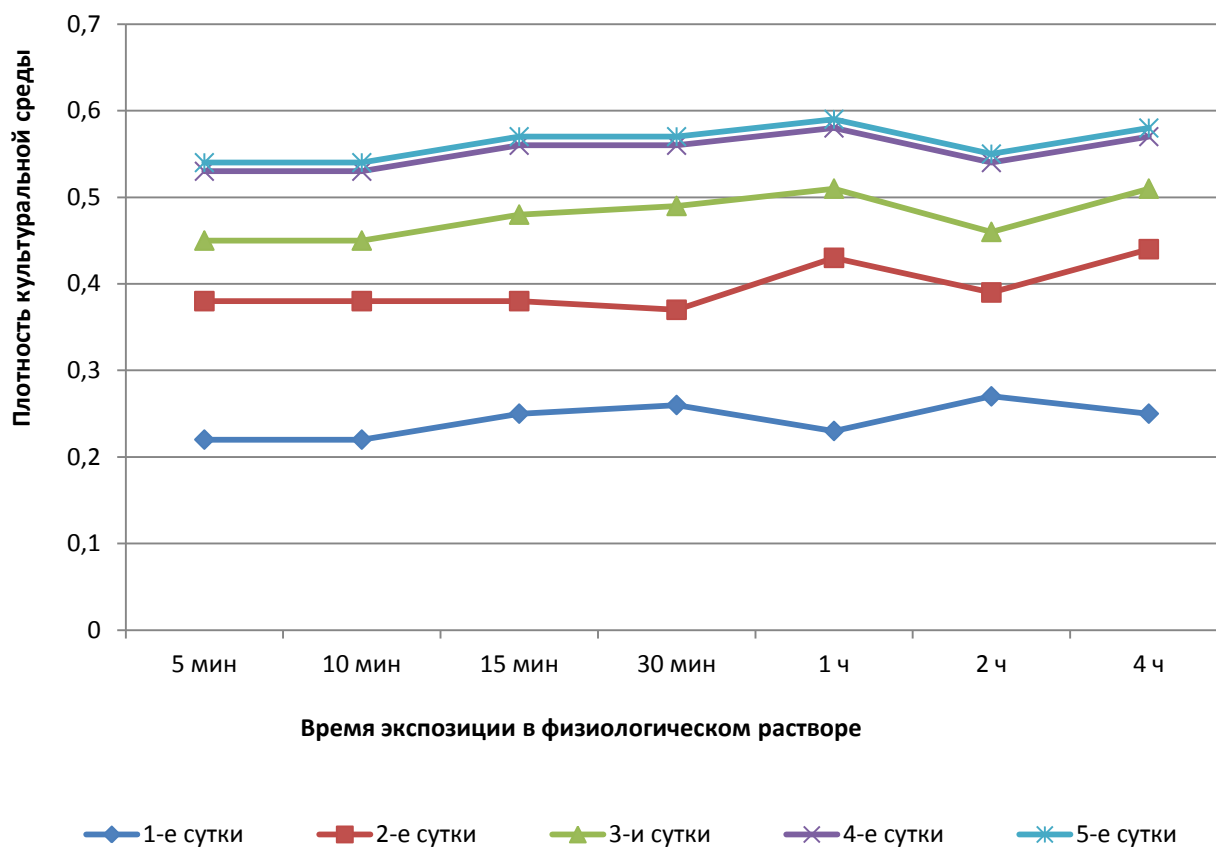


Рисунок 7.2 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus* ATCC 6538-Р после экспозиций в физиологическом растворе при культивировании в течение 5 суток

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 (таблица 7.3).

Таблица 7.3 – Показатели роста *S.aureus* ATCC 6538-Р после экспозиции с азитромицином

Время экспозиции	Контроль	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	1 час	2 часа	4 часа
Время исследования								
1-е сутки	рост	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
2-е сутки	рост	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
3-е сутки	рост	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
4-е сутки	рост	рост	рост	рост	рост	рост	рост	рост

Оптическая плотность культуральной среды, содержащей инокулом одной нихромовой петли МХБ с азитромицином равна 0,039.

Увеличение плотности культуральной среды после экспозиций с азитромицином наблюдалось после 2-х суток культивирования. Показатели величины D культуральной среды статистически значимо отличались от таковых в контроле ($P < 0,05$). Увеличение плотности культуральной среды до 0,23-0,25 дало видимое помутнение культуральной среды после 4-х суток культивирования микроорганизмов в термостате при 37 °С, но задержка роста микробной популяции оставалась статистически значимо отличной от контроля в течение всего эксперимента (таблица 7.4; рисунок 7.3).

Запоздалый рост свидетельствует об отсутствии бактерицидного действия. МПК₉₀ азитромицина задерживает рост и размножение микроорганизмов и оказывает в исследуемой концентрации бактериостатическое действие.

Таблица 7.4 – Динамика роста *S.aureus* ATCC 6538-Р по показателям оптической плотности культуральной среды после экспозиций с азитромицином

Время экспозиции	Контроль	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	1 час	2 часа	4 часа
Время исследования								
1-е сутки	0,26±0,03	0,05±0,01*	0,05±0,01*	0,05±0,01*	0,05±0,01*	0,07±0,03*	0,07±0,02*	0,06±0,01*
2-е сутки	0,39±0,06	0,09±0,06*	0,09±0,05*	0,12±0,04*	0,15±0,02*	0,15±0,01*	0,15±0,04*	0,11±0,02*
3-е сутки	0,51±0,05	0,13±0,07*	0,13±0,05*	0,17±0,02*	0,20±0,01*	0,20±0,01*	0,19±0,02*	0,18±0,02*
4-е сутки	0,56±0,02	0,24±0,05*	0,25±0,03*	0,27±0,07	0,33±0,03	0,34±0,02	0,25±0,03	0,23±0,03*
5-е сутки	0,60±0,02	0,25±0,05*	0,26±0,02*	0,28±0,09	0,38±0,1	0,36±0,06	0,26±0,02*	0,25±0,01*

Примечание: * - отличие от контроля статистически достоверно при $P < 0,05$

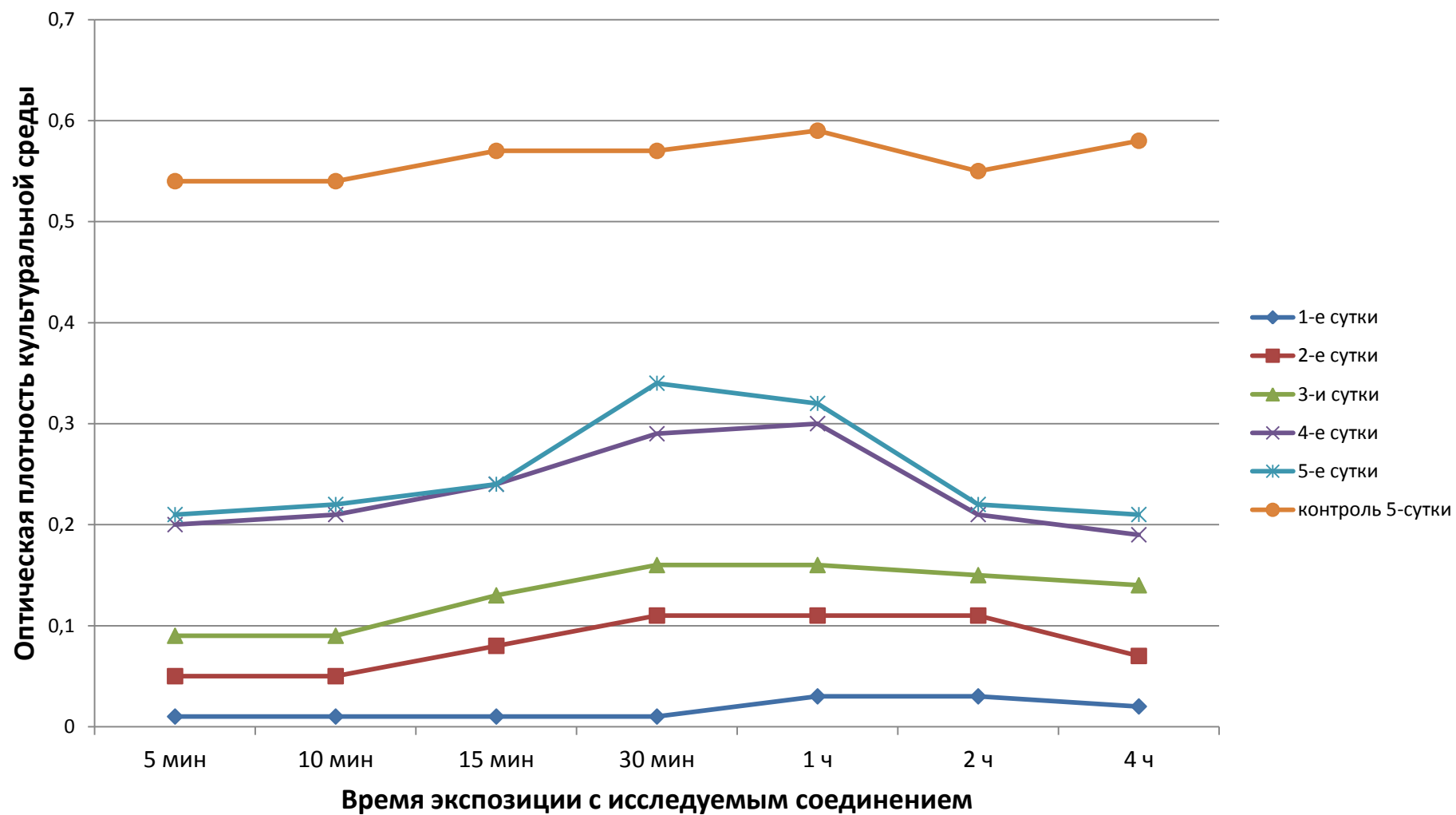


Рисунок 7.3 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus ATCC 6538-P* после экспозиций с азитромицином

В первые сутки видимый в проходящем свете рост в пробирках после экспозиции микроорганизмов с циклическим амидом **HD** не наблюдался. Через 48 часов культивирования при 37 °С рост микроорганизмов во всех пробирках не вооруженным глазом не определялся. Через 3-е суток наблюдения было обнаружено видимое помутнение среды во всех пробирках с посевами (таблица 7.5).

Таблица 7.5 – Показатели роста *S.aureus ATCC 6538-P* после экспозиций с соединением HD

Время экспозиции	Контроль	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	1 час	2 часа	4 часа
Время исследования								
1-е сутки	рост	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
2-е сутки	рост	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
3-е сутки	рост	рост	рост	рост	рост	рост	рост	рост

Оптическая плотность культуральной среды, содержащей инокулюм одной нихромовой петли МХБ с соединением **HD** равна 0,012.

Значение D культуральной среды после первых суток наблюдения свидетельствует о задержке роста и размножения тест-штамма *S.aureus ATCC 6538-P* после экспозиций с исследуемым соединением (таблица 7.6). После культивирования в течение 2-х суток при 37 °С циклический амид **HD** статистически значимо задерживал рост микробной популяции ($P < 0,05$). В течение всего эксперимента плотность культуральной жидкости содержащей МПК изучаемого соединения была ниже, чем в контроле (рисунок 7.4). МПК исследуемого соединения **HD** задерживает рост и размножение микроорганизмов и оказывает в исследуемой концентрации бактериостатическое действие.

Таблица 7.6 – Динамика роста *S.aureus* ATCC 6538-Р по показателям оптической плотности культуральной среды после экспозиций с соединением HD

Время экспозиции	Контроль	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	1 час	2 часа	4 часа
Время исследования								
1-е сутки	0,26±0,03	0,07±0,01*	0,07±0,02*	0,07±0,01*	0,08±0,03*	0,07±0,01*	0,06±0,02*	0,05±0,001*
2-е сутки	0,39±0,06	0,18±0,04*	0,18±0,02*	0,15±0,03*	0,14±0,03*	0,09±0,01*	0,08±0,01*	0,07±0,02*
3-е сутки	0,51±0,05	0,28±0,11	0,28±0,08	0,28±0,02	0,24±0,05*	0,22±0,03*	0,21±0,04*	0,23±0,02*
4-е сутки	0,56±0,02	0,35±0,09	0,35±0,12	0,36±0,09	0,36±0,10	0,32±0,07	0,36±0,09	0,30±0,06
5-е сутки	0,60±0,02	0,43±0,05	0,43±0,09	0,43±0,06	0,53±0,05	0,43±0,09	0,46±0,04	0,37±0,09

Примечание: * - отличие от контроля статистически достоверно при $P < 0,05$.

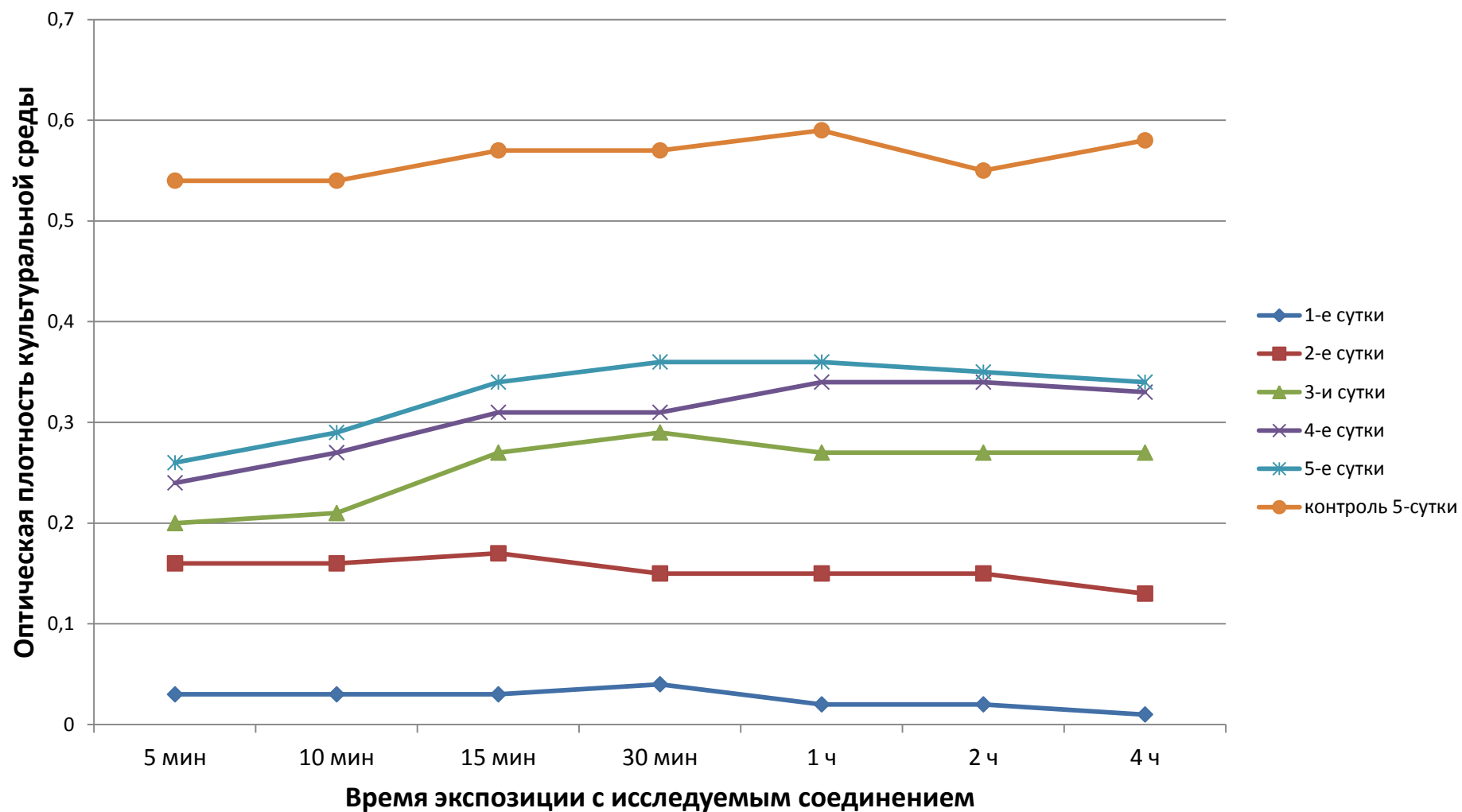


Рисунок 7.4 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus ATCC 6538-P* после экспозиций с соединением HD

В контрольной пробирке рост микроорганизмов наблюдался через 20 часов после посева. В первые сутки видимый в проходящем свете рост в пробирках после экспозиций микроорганизмов с соединением **S3** не наблюдался. Через 48 часов культивирования при 37 °С наблюдался видимый рост в пробирках после экспозиции исследуемых микроорганизмов с амидом **S3** в течение 5 мин, 10 мин и 15 мин, в остальных пробирках рост не вооруженным глазом в проходящем свете не определялся. На 3-сутки наблюдения было обнаружено видимое помутнение среды во всех пробирках с посевами (таблица 7.7).

Таблица 7.7 – Показатели роста *S.aureus* ATCC 6538-Р после экспозиций с соединением S3

Время экспозиции	Контроль	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	1 час	2 часа	4 часа
Время исследования								
1-е сутки	рост	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
2-е сутки	рост	рост	рост	рост	нет	нет	нет	нет
3-е сутки	рост	рост	рост	рост	рост	рост	рост	рост

Оптическая плотность культуральной среды, содержащей инокулюм одной нихромовой петли МХБ с соединением **S3** равна 0,046.

Исучаемый амид **S3** статистически значимо задерживает увеличение значения D культуральной среды с тест-штаммом *S.aureus* в первые сутки и вторые сутки культивирования ($P < 0,05$) (таблица 7.8; рисунок 7.5). В течение последующих суток культивирования также видна тенденция задержки степени увеличения оптической плотности культуральной среды по сравнению с контролем.

Таблица 7.8 – Динамика роста *S.aureus ATCC 6538-P* по показателям оптической плотности культуральной среды после экспозиции с соединением S3

Время экспозиции	Контроль	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	1 час	2 часа	4 часа
Время исследования								
1-е сутки	0,26±0,03	0,12±0,02*	0,12±0,02*	0,10±0,01*	0,10±0,02*	0,09±0,03*	0,09±0,02*	0,09±0,02*
2-е сутки	0,39±0,06	0,25±0,02	0,27±0,02	0,24±0,03	0,20±0,01*	0,19±0,03*	0,20±0,01*	0,20±0,01*
3-е сутки	0,51±0,05	0,32±0,1	0,32±0,07	0,34±0,04	0,29±0,5	0,29±0,04	0,27±0,05	0,26±0,03
4-е сутки	0,56±0,02	0,42±0,03	0,42±0,04	0,39±0,02	0,36±0,03	0,35±0,06	0,35±0,04	0,33±0,04
5-е сутки	0,60±0,02	0,43±0,06	0,43±0,05	0,40±0,13	0,37±0,11	0,36±0,07	0,35±0,04	0,35±0,03

Примечание: * - отличие от контроля статистически достоверно при $P < 0,05$.

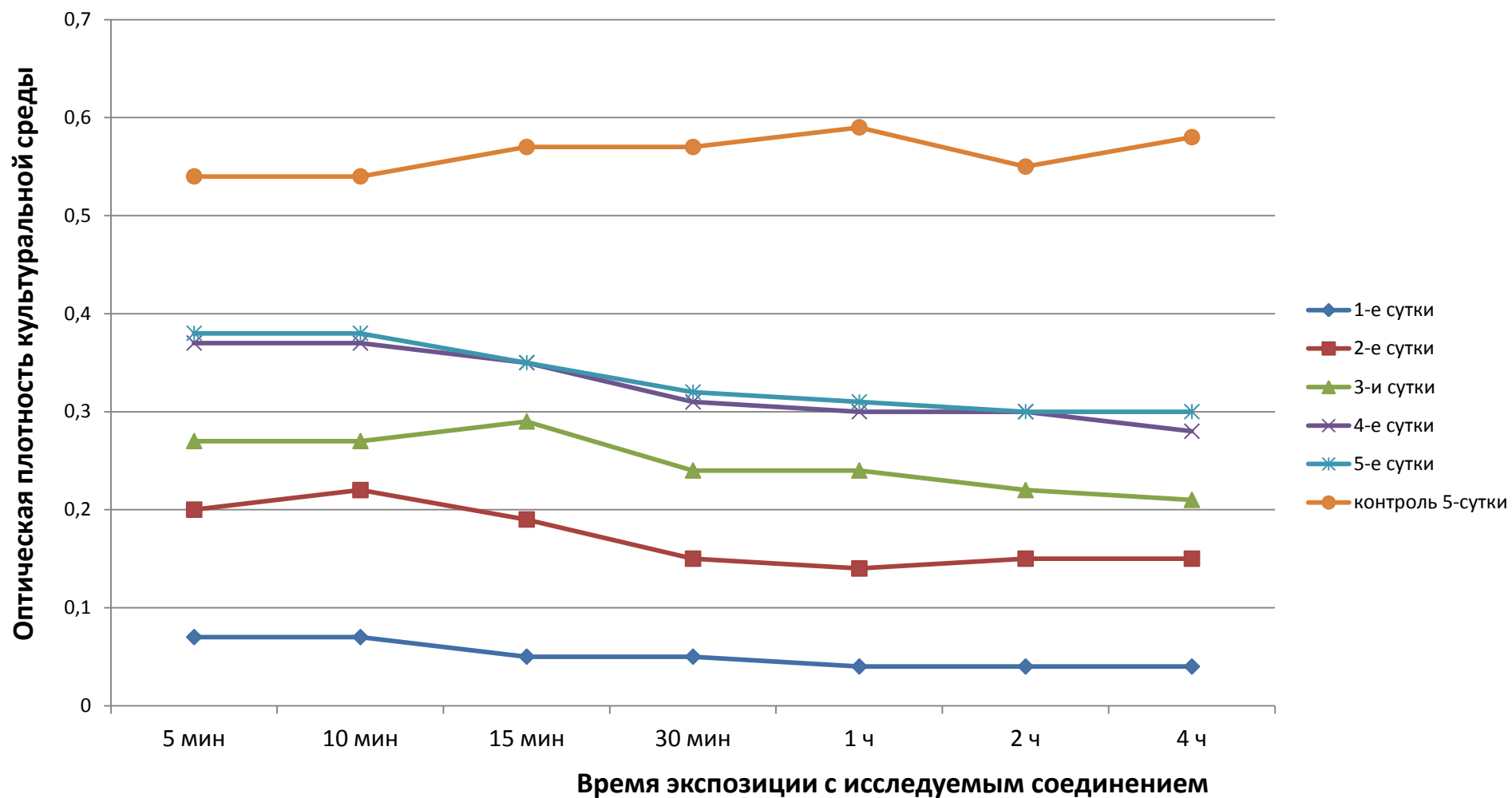


Рисунок 7.5 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus* ATCC 6538-*P* после экспозиций с соединением S3

Запоздалый рост свидетельствует об отсутствии бактерицидного действия. МПК исследуемого соединения **S3** задерживает рост и размножение микроорганизмов и оказывает в исследуемой концентрации бактериостатическое действие.

В первые сутки видимый в проходящем свете рост в пробирках после экспозиций микроорганизмов с соединением **7D** не наблюдался. Через 48 часов культивирования при 37 °С рост микроорганизмов во всех пробирках не вооруженным глазом не определялся. После 3-х суток наблюдения было обнаружено видимое помутнение среды с экспозицией исследуемого циклического амида **7D** в течение 30 мин. После 96 часов культивирования в термостате при 37 °С во всех пробирках наблюдалось видимое в проходящем свете помутнение культуральной среды (таблица 7.9).

Таблица 7.9 – Показатели роста *S.aureus ATCC 6538-P* после экспозиции с соединением **7D**

Время экспозиции	Контроль	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	1 час	2 часа	4 часа
Время исследования								
1-е сутки	рост	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
2-е сутки	рост	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
3-е сутки	рост	нет	нет	нет	рост	нет	нет	нет
4-е сутки	рост	рост	рост	рост	рост	рост	рост	рост

Оптическая плотность культуральной среды, содержащей инокулом одной нихромовой петли МХБ с соединением **7D** равна 0,004.

Статистически значимое снижение плотности культуральной среды по сравнению с контролем наблюдалось в течение 3-х суток культивирования исследуемого тест-штамма *S.aureus ATCC 6538-P* после экспозиций с циклическим амидом **7D** (таблица 7.10; рисунок 7.6).

Таблица 7.10 – Динамика роста *S.aureus* ATCC 6538-Р по показателям оптической плотности культуральной среды
после экспозиции с соединением 7D

Время экспозиции	Контроль	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	1 час	2 часа	4 часа
Время исследования								
1-е сутки	0,26±0,03	0,07±0,02*	0,07±0,02*	0,07±0,01*	0,08±0,02*	0,06±0,01*	0,06±0,01*	0,06±0,01*
2-е сутки	0,39±0,06	0,15±0,04*	0,15±0,02*	0,14±0,03*	0,19±0,04*	0,15±0,02*	0,15±0,01*	0,13±0,03*
3-е сутки	0,51±0,05	0,18±0,03*	0,18±0,02*	0,17±0,01*	0,25±0,04	0,20±0,01*	0,19±0,01*	0,18±0,01*
4-е сутки	0,56±0,02	0,27±0,02	0,27±0,04	0,27±0,06	0,33±0,03	0,33±0,04	0,25±0,03	0,23±0,01*
5-е сутки	0,60±0,02	0,31±0,12	0,31±0,09	0,31±0,04	0,42±0,05	0,35±0,02	0,31±0,03	0,25±0,02*

Примечание: * - отличие от контроля статистически достоверно при $P < 0,05$.

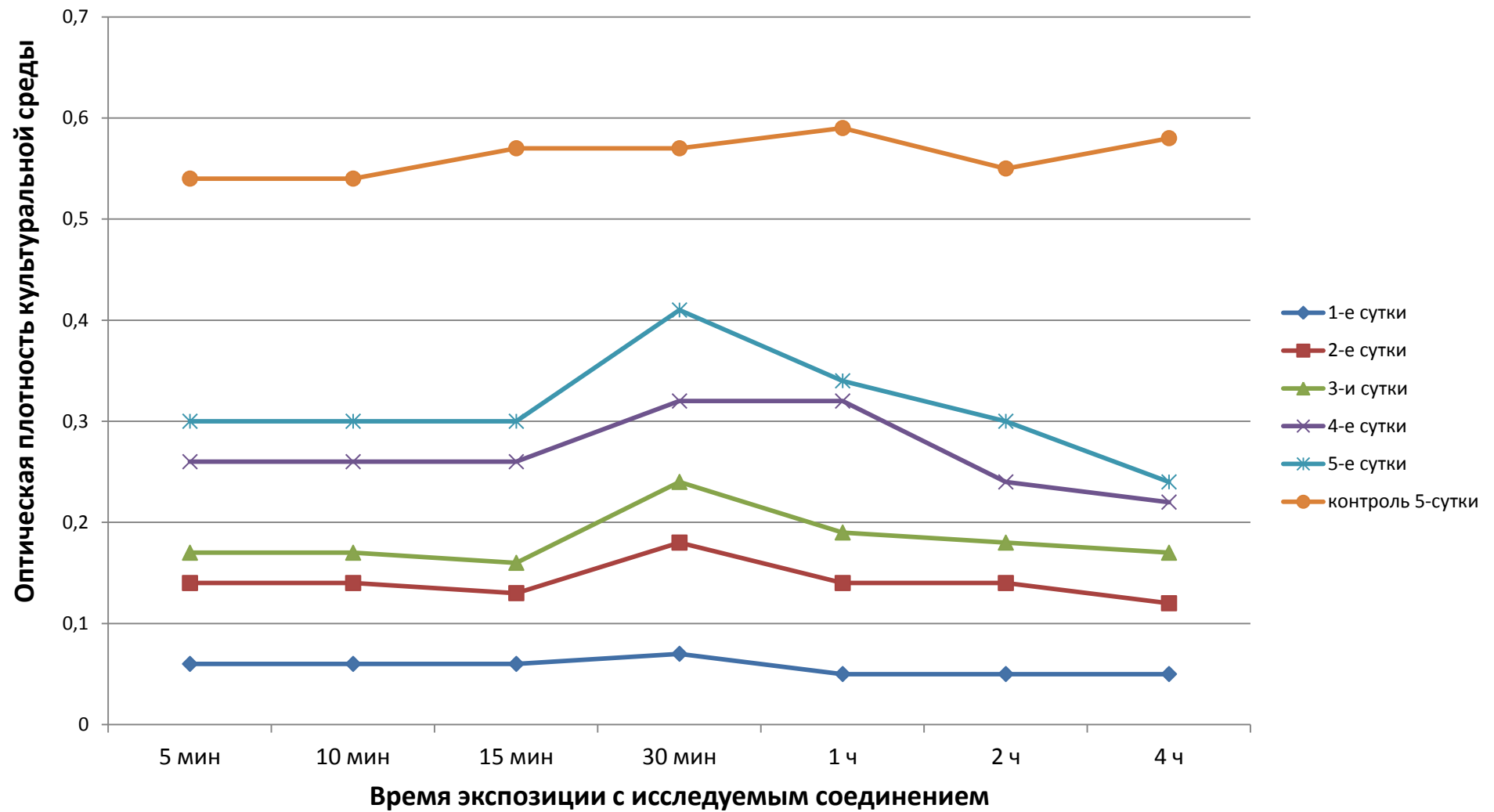


Рисунок 7.6 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus ATCC 6538-P* после экспозиций с соединением 7D

На протяжении всего эксперимента наблюдалась тенденция к задержке роста микробной популяции в присутствии соединения **7D**. МПК исследуемого соединения задерживает рост и размножение микроорганизмов и оказывает в исследуемой концентрации бактериостатическое действие.

Видимый в проходящем свете рост *S.aureus ATCC 6538-P* после экспозиций с циклическим амидом **5D** в течение всего эксперимента не наблюдался (таблица 7.13).

Таблица 7.13. Показатели роста *S.aureus ATCC 6538-P* после экспозиций с соединением **5D**

Время экспозиции	Контроль	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	1 час	2 часа	4 часа
Время исследования								
1-е сутки	рост	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
2-е сутки	рост	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
3-е сутки	рост	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
4-е сутки	рост	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
5-е сутки	рост	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет

Оптическая плотность культуральной среды, содержащей инокулом одной нихромовой петли МХБ с соединением **5D** равна 0,006.

Показатели оптической плотности культуральной среды в присутствии циклического амида **5D** свидетельствовали о задержке роста и размножения исследуемого тест-штамма *S.aureus* в течение 5-ти суток культивирования в термостате при 37 °С (таблица 7.14). Величина D культуральной среды статистически значимо отличалась от контроля ($P < 0,05$) в ходе эксперимента, но все же имела тенденцию к увеличению (рисунок 7.8). Видимо концентрация соединения **5D**, полученная в среде, была близка к бактерицидной. Изучаемый циклический амид **5D** задерживает рост и размножения микроорганизмов и оказывает в исследуемой концентрации бактериостатическое действие.

Таблица 7.14 – Динамика роста *S.aureus ATCC 6538-P* по показателям оптической плотности культуральной среды после экспозиции с соединением 5D

Время экспозиции	Контроль	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	1 час	2 часа	4 часа
Время исследования								
1-е сутки	0,26±0,03	0,010±0,001*	0,010±0,001*	0,010±0,001*	0,010±0,003*	0,010±0,001*	0,010±0,001*	0,010±0,002*
2-е сутки	0,39±0,06	0,011±0,002*	0,012±0,001*	0,012±0,002*	0,011±0,002*	0,011±0,001*	0,011±0,003*	0,011±0,002*
3-е сутки	0,51±0,05	0,014±0,002*	0,013±0,003*	0,014±0,003*	0,02±0,007*	0,014±0,002*	0,02±0,002*	0,02±0,002*
4-е сутки	0,56±0,02	0,03±0,007*	0,03±0,008*	0,03±0,003*	0,04±0,011*	0,07±0,013*	0,07±0,01*	0,09±0,01*
5-е сутки	0,60±0,02	0,04±0,009*	0,04±0,01*	0,06±0,012*	0,07±0,011*	0,08±0,02*	0,09±0,01*	0,11±0,01*

Примечание: * - отличие от контроля статистически достоверно при $P < 0,05$.

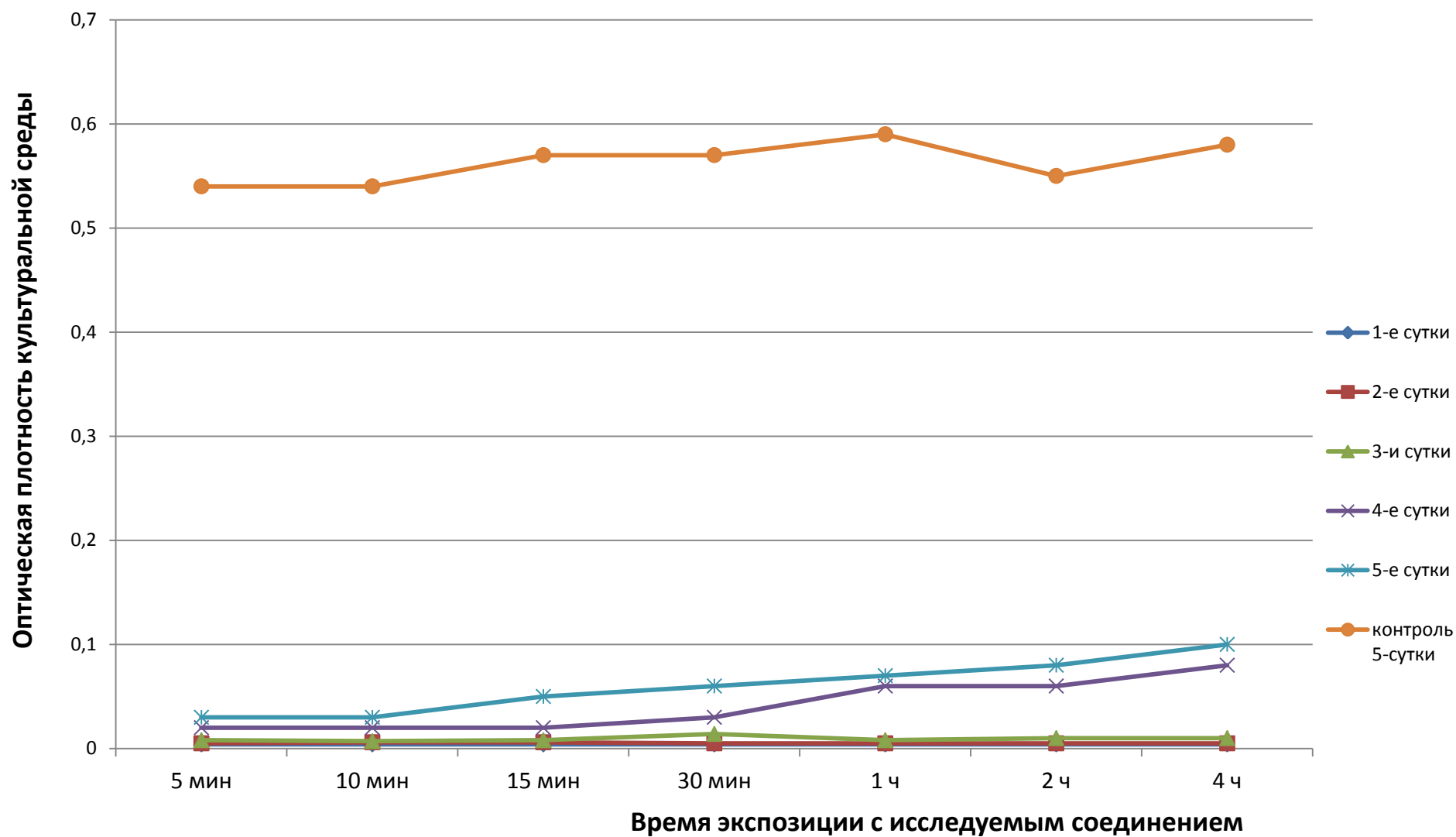


Рисунок 7.8 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus ATCC 6538-P* после экспозиций с соединением 5D

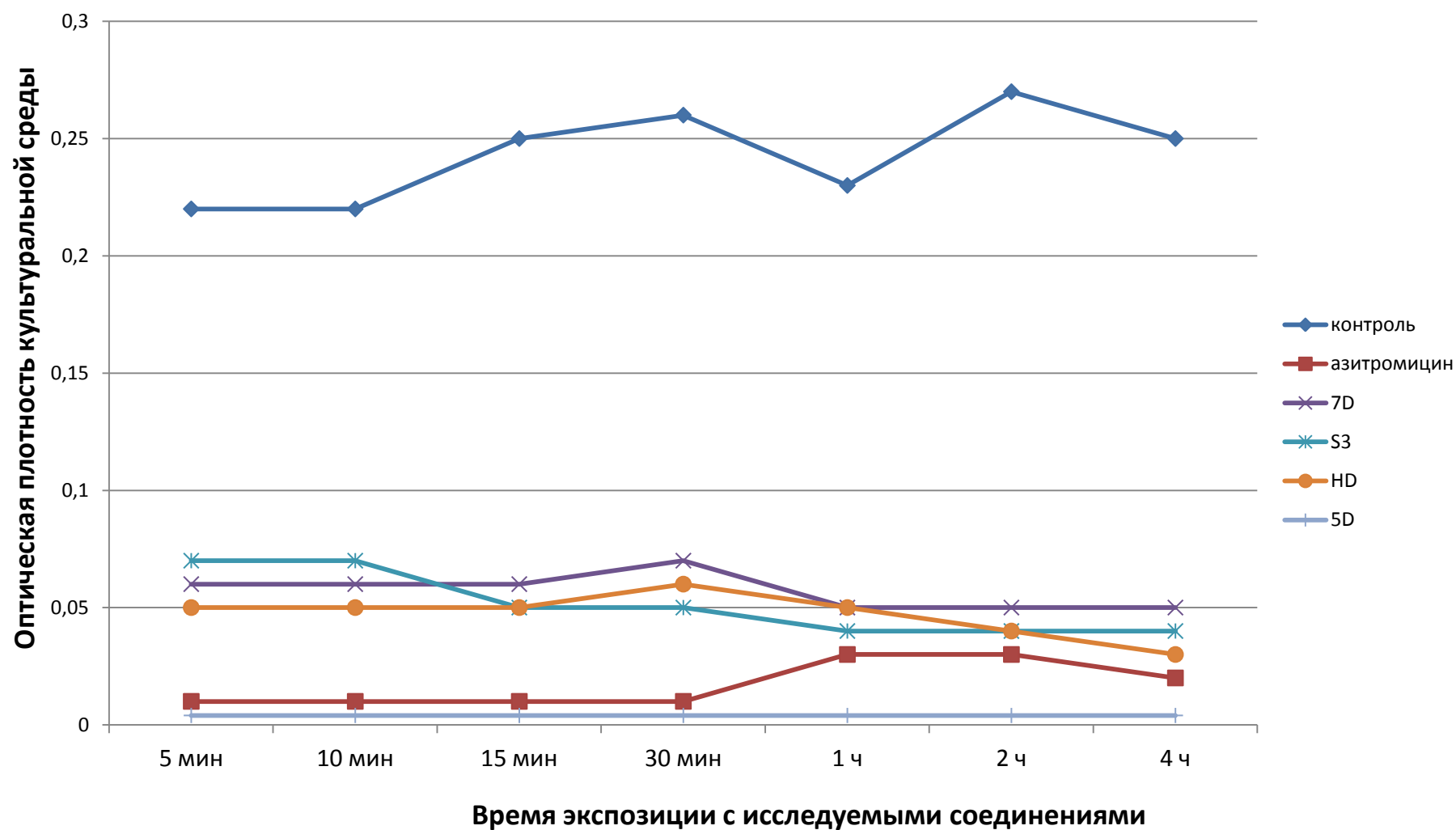


Рисунок 7.9 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus* ATCC 6538-Р после экспозиций с исследуемыми соединениями и культивировании в течение 24 часов

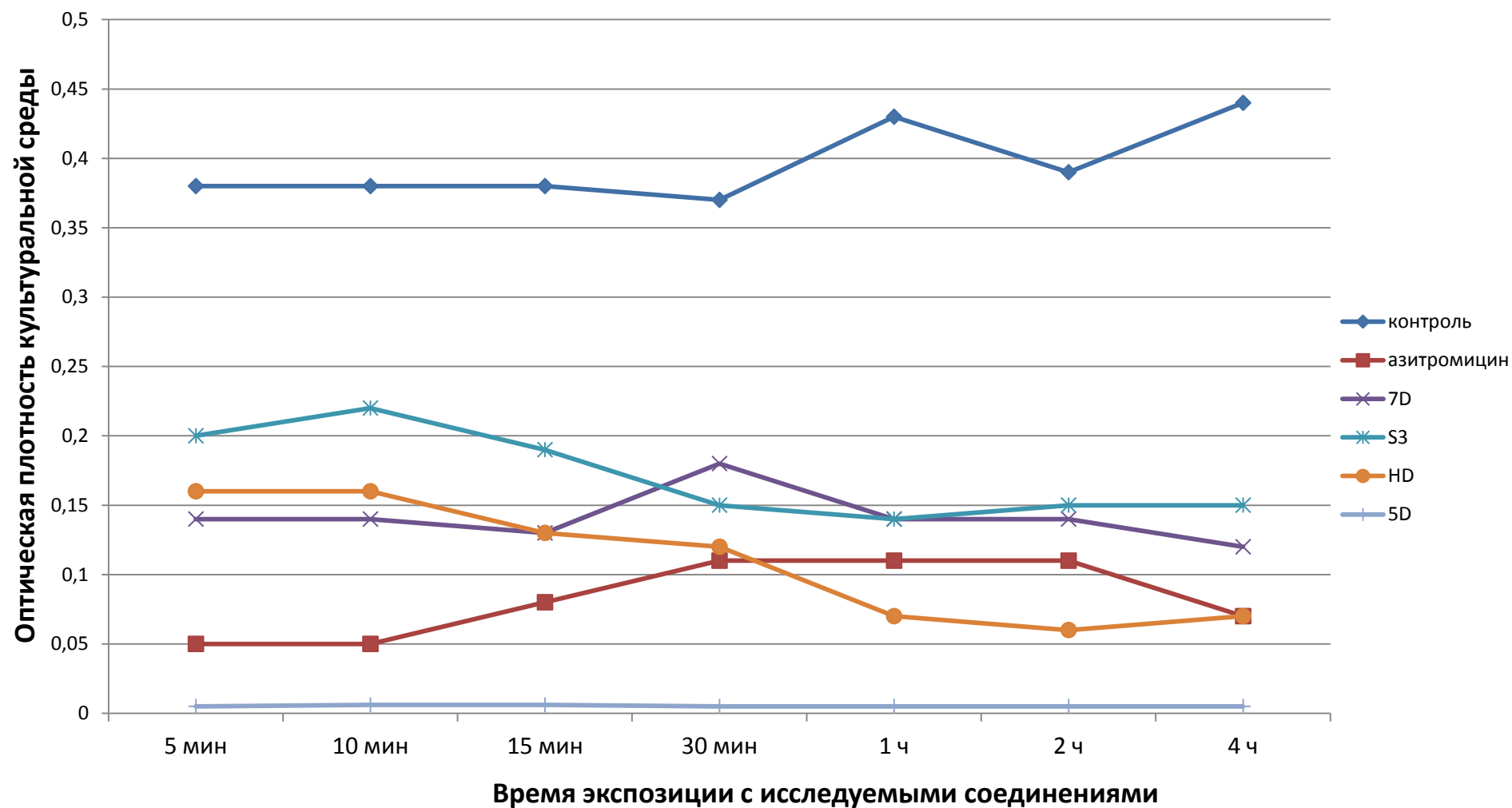


Рисунок 7.10 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus* ATCC 6538-*P* после экспозиций с исследуемыми соединениями и культивировании в течение 48 часов

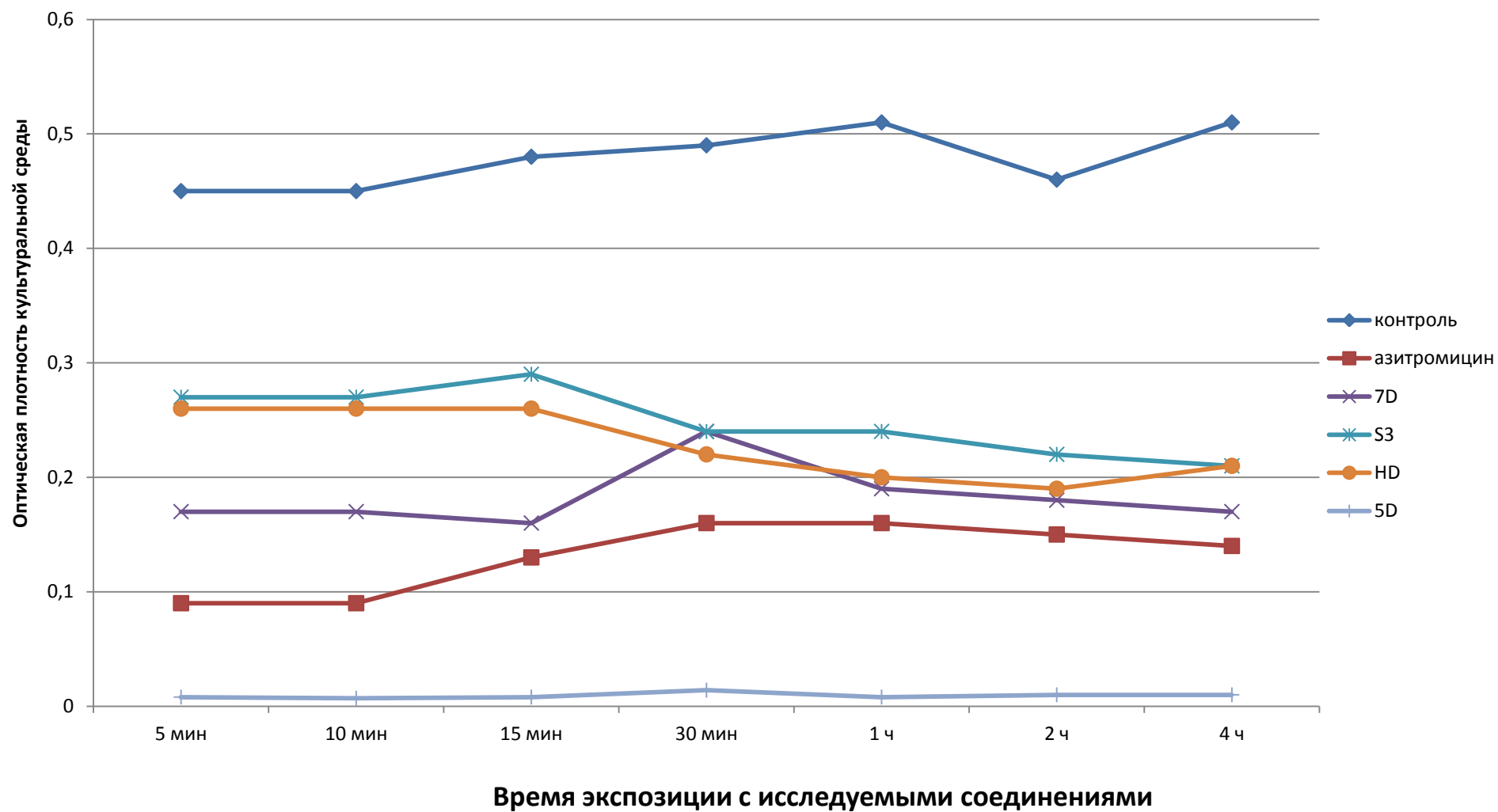


Рисунок 7.11 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus* ATCC 6538-P после экспозиций с исследуемыми соединениями после культивирования в течение 72 часов

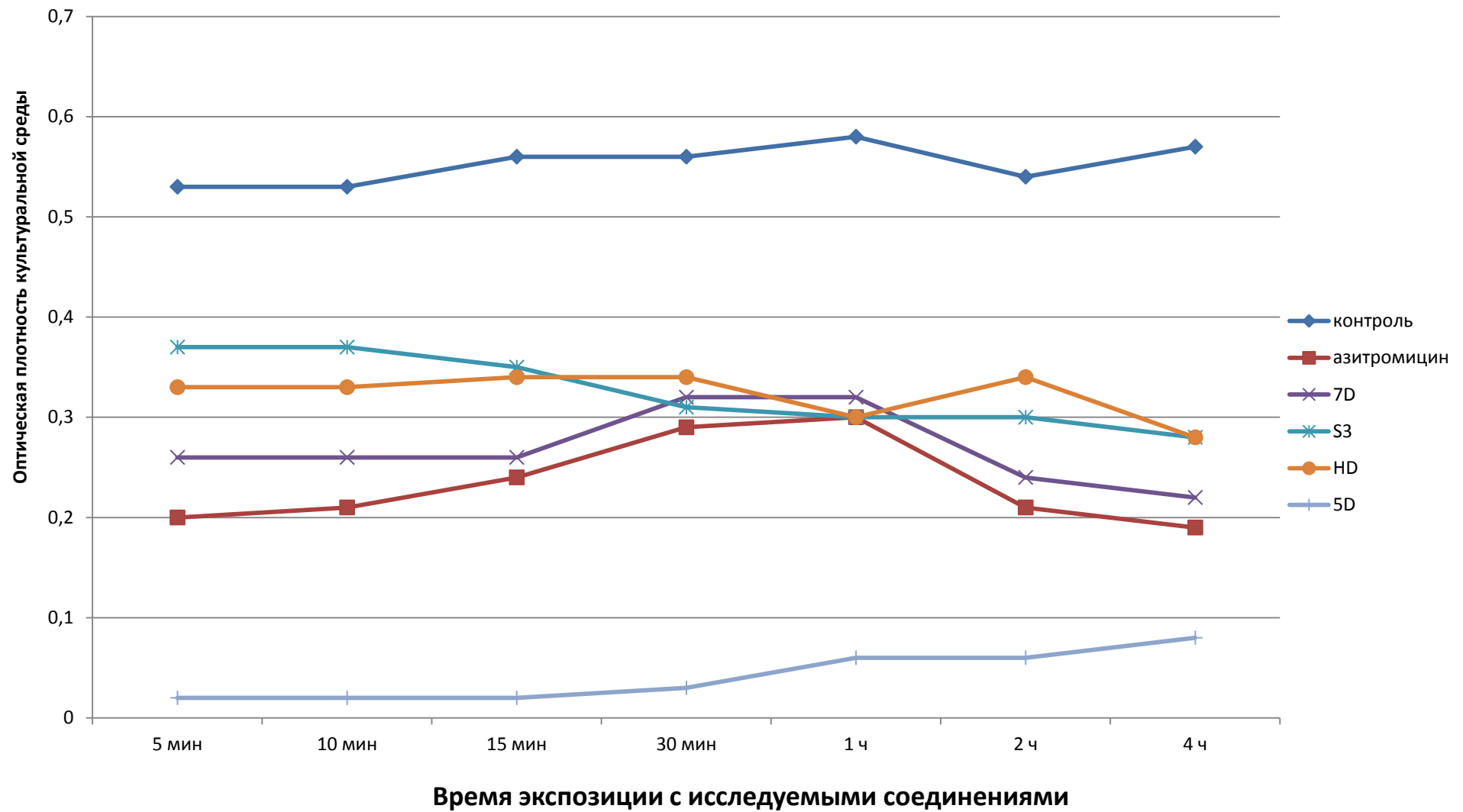


Рисунок 7.12 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus* ATCC 6538-*P* после экспозиций с исследуемыми соединениями после культивирования в течение 96 часов

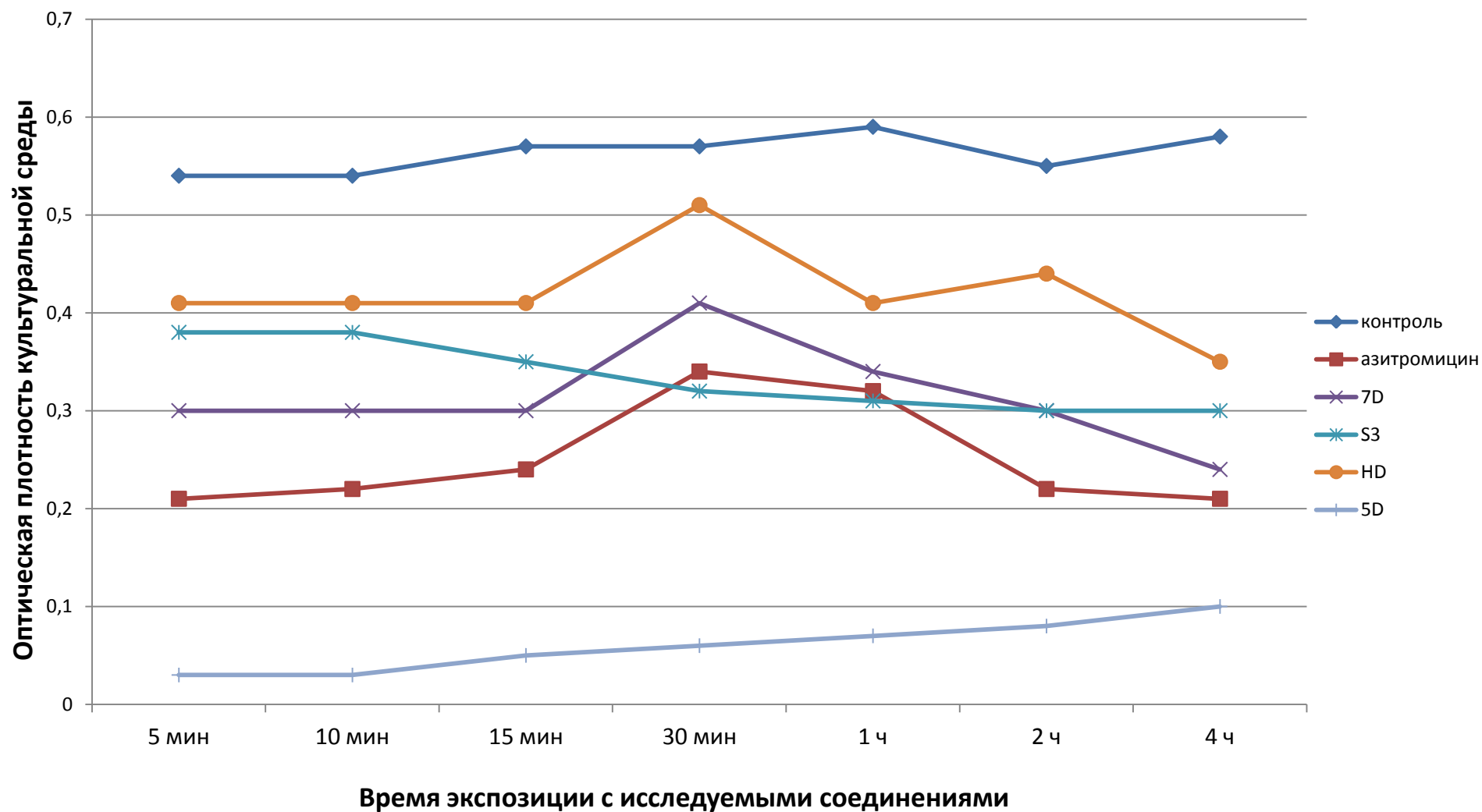


Рисунок 7.13 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus* ATCC 6538-*P* после экспозиций с исследуемыми соединениями и культивировании в течение 110 часов

Таким образом, все исследуемые соединения, 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 7.9; 7.10; 7.11; 7.12; 7.13). 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. Запоздалый рост микроорганизмов свидетельствует о способности соединений, полученных на основе 4-, 6- и 7-замещенных амининдолов задерживать рост и размножение микроорганизмов и оказывать в МПК бактериостатическое действие.

ГЛАВА 8. НОВЫЙ СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИПА ПРОТИВОМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Исследование противомикробной активности новых соединений включает как традиционное изучение минимальной подавляющей концентрации (МПК) вещества, так и других показателей, одним из которых является определение типа действия (бактерицидное или бактериостатическое) [117]. Исследователи новых противомикробных соединений сталкиваются с различными проблемами на этом пути – рутинность и длительность исторически сложившихся классических методик, дороговизна питательных сред, одноразовой лабораторной посуды, недоступность традиционно применяемой аппаратуры и диагностических систем для исследований новых соединений. Классические методы определения типа противомикробного действия включают длительные периоды наблюдения от 5 сут и более, большие затраты исследуемых соединений и питательных сред [87]. Современные методы основаны на исследовании и сравнении МПК и минимальных бактерицидных концентраций (МБК). Данные показатели дают возможность условно классифицировать новое соединение по типу действия на бактериальную клетку [117].

Недостатками известного решения являются затраты большого количества испытуемого препарата, питательной дорогостоящей среды (МХБ), лабораторной посуды и необходимость наблюдения в течение 5-7 сут. Результат оценивается с помощью невооруженного глаза, что не прибавляет точности в исследовании, либо с последующим использованием чашек Петри с МХА, также дорогостоящей питательной средой, для посева микроорганизмов и инкубирования в течение 18-20 ч, а это прибавляет еще сутки к проводимому эксперименту.

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 [466].

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-Р обнуляется по показателям оптической плотности исследуемого соединения. Определяется оптическая плотность культуральной среды в присутствии штамма бактерий *Staphylococcus aureus* 6538-Р, 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.

В основу нового способа определения типа противомикробного действия новых соединений, положено следующее обоснование:

Оптический метод изучения биомассы для количественного подсчета микроорганизмов позволяет достаточно быстро и точно определить концентрацию клеток в культуральной жидкости. В его основе лежит измерение ослабления пучка света при его прохождении через суспензию клеток. В определенных пределах оно обусловлено преимущественно рассеянием света клетками и пропорционально их концентрации. Величина этого показателя зависит от многих факторов: формы клеток, размера микроорганизмов, оптических свойств самой культуральной среды, длины световой волны и т. д. Поэтому способ имеет ограничения и пригоден лишь для тех микроорганизмов, которые вызывают равномерное помутнение питательной среды, и их рост не сопровождается образованием мицелия, пленок или других посторонних соединений. Очень важно чтобы среда для культивирования была оптически прозрачной. Бактерицидные препараты не позволяют размножаться чувствительным микроорганизмам, и их концентрация в культуральной среде мало отличается от таковой в «отрицательном контроле» (пробирка с микроорганизмами, которую помещают в холодильник при температуре 4 °С, при данной температуре рост микроорганизмов не наблюдается). Бактериостатические препараты задерживают рост и размножение чувствительных микроорганизмов и в культуральной среде при наличии МПК препаратов наблюдается изменение концентрации микроорганизмов. Выявлено, что оптическая плотность культуральной среды «отрицательного контроля» *Staphylococcus aureus* 6538-Р ATCC составляет 0,003, а видимый рост

микроорганизмов наблюдается при показателях оптической плотности культуральной среды более 0,21.

Способ разработан на основании исследования, в которое было включено 2 музейных штамма микроорганизмов (*Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC и *Staphylococcus aureus* 6538-P ATCC) и апробирован, как на традиционных антимикробных препаратах с доказанным бактерицидным и бактериостатическим типом действия, так и на группе новых соединений, синтезированных на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов, обладающих противомикробным действием [3; 125; 126; 127; 128; 131; 185; 465]. В качестве традиционных противомикробных средств использовались бактерицидные – ампициллин и цефазолин, и бактериостатические – азитромицин и линкомицин [98].

В качестве тест-микроорганизмов для изучения типа противомикробного действия исследуемых соединений использовались музейные штаммы *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC и *Staphylococcus aureus* 6538-P ATCC.

Для изучения типа противомикробного действия новые исследуемые соединения использовались в виде раствора (в качестве растворителя использовался «Димексид»). Группа исследуемых соединений включала амиды, циклические амиды и пирролохинолон, полученные на основе 4-, 5-, 6- и 7-аминоиндолов:

1. Производное замещенного 4-амино-2-фенилиндола: 4-гидрокси-8-фенил-4-(трифторметил)-1,3,4,7-тетрагидро-2*H*-пирроло[2,3-*h*]хинолин-2-он (лабораторный шифр **5D**).

2. Производное замещенного 5-аминоиндола: 1,5-диметил-2-фенил-8-(трифторметил)-1,5-дигидро-6*H*-пирроло-[2,3-*g*]хинолин-6-он (лабораторный шифр **39D**).

3. Производные замещенных 6-аминоиндолов: *N*-(1,5-диметил-2-фенил-1*H*-индол-6-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (лабораторный шифр **S3**) и 9-гидрокси-5-метил-2-фенил-9-(трифторметил)-1,6,8,9-тетрагидро-7*H*-пирроло[2,3-*f*]хинолин-7-он (лабораторный шифр **7D**).

4. Производное замещенного 7-аминоиндола: 6-гидрокси-2,3-диметил-6-(трифторметил)-1,6,7,9-тетрагидро-8*H*-пирроло[3,2-*h*]хинолин-8-он (лабораторный шифр **HD**).

В качестве традиционных, использовались бактерицидные противомикробные препараты – ампициллин и цефазолин, и бактериостатические – азитромицин и линкомицин. Использовались МПК исследуемых соединений и их двух-, четырех- и шестикратное увеличение. МПК исследуемых соединений готовили в объеме 1 мл. Выбор исследуемых микроорганизмов осуществляется исходя из спектра противомикробного действия соединения.

Концентрация суспензии исследуемого микроорганизма составляет $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Оптическая плотность бактериальной суспензии с концентрацией $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл при визуальном контроле соответствует стандарту мутности 0,5 по Мак-Фарланду. Использовался коммерческий стандарт мутности. Бактериальная суспензия готовится из агаровых культур. Для приготовления инокулюма используется чистая суточная культура микроорганизмов, выросших на плотных питательных средах. Отбирается несколько однотипных, четко изолированных колоний, выросших на неселективных плотных питательных средах. Петлей переносится незначительное количество материала с верхушек колоний в пробирку со стерильным физиологическим раствором, плотность инокулюма доводится точно до 0,5 по стандарту Мак-Фарланда. Инокулюм используется в течение 15 мин после приготовления. МХБ, как для определения чувствительности к противомикробным препаратам [81], разливается по 0,5 мл в каждую пробирку. Количество пробирок составляет пять штук, в том числе, одна для постановки «отрицательного» контроля. Рабочий раствор исследуемого соединения готовится из основного раствора с использованием жидкой питательной среды – МХБ. Затем рабочий раствор в количестве 0,5 мл при помощи микропипетки со стерильным наконечником вносится в первую пробирку, содержащую 0,5 мл бульона. Тщательно перемешивается и новым стерильным наконечником переносится 0,5 мл раствора исследуемого соединения в бульоне во вторую пробирку, содержащую первоначально 0,5 мл бульона. Эту

процедуру повторяется, пока не приготовится весь необходимый ряд разведений. Из последней пробирки 0,5 мл бульона удаляется. Таким образом, получается ряд пробирок с растворами исследуемого соединения, концентрации которых отличаются в соседних пробирках в 2 раза. Затем засеивается культурой исследуемого микроорганизма. Конечная концентрация микроорганизма в каждой пробирке составляет примерно 5×10^5 КОЕ/мл. Все пробирки, кроме пробирки «отрицательный» контроль, инкубируются в обычной атмосфере при температуре 37 °С в течение 16-20 или 20-24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма). Пробирка «отрицательный» контроль помещается в холодильник при температуре 4 °С, где хранится до учета результатов.

Для исследования оптической плотности культуральной среды использовался фотоэлектроколориметр (ФЭК) Аpel «AP-101». Фотоэлектроколориметрически исследуется оптическая плотность МХБ, МХБ с исследуемыми культурами микроорганизмов после инкубации при температуре 37 °С в течение 24 ч (положительный контроль); МХБ с исследуемыми культурами микроорганизмов, который после посева помещался в холодильник при температуре 4 °С, где хранился до учета результатов («отрицательный контроль»); МХБ с МПК исследуемых соединений без микроорганизмов; МХБ с МПК исследуемых соединений и исследуемыми культурами микроорганизмов после инкубации при температуре 37 °С в течение 24 ч. Исследования проводятся в объеме 1 мл в стерильных кюветах при длине волны 600 нм.

Зависимость оптической плотности изучаемого соединения с культурой микроорганизмов обнуляется по показателям оптической плотности исследуемого вещества. Полученная оптическая плотность микроорганизмов, культивируемых в присутствии противомикробного соединения, используется для подсчета коэффициента оптической плотности культуральной среды по выше указанной формуле.

Исследование типа противомикробного действия ампициллина – с доказанным бактерицидным типом противомикробного действия

Зависимость оптической плотности ампициллина с культурой *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC обнуляли по показателям оптической плотности ампициллина (0,008). Оптическая плотность культуральной среды в присутствии тест-штамма *Streptococcus pyogenes*, культивируемого при 0,125 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл [81] концентрациях ампициллина составляет 0,004; 0,005; 0,001; 0,003 соответственно (формула 2). Оптическая плотность культуральной среды с исследуемым микроорганизмом, при культивировании без ампициллина составляет 0,311.

$$K_D = \frac{0,004 + 0,005 + 0,001 + 0,003}{4} \times 100 = 0,325 \quad (2)$$

Показатель K_D с ампициллином менее 1, следовательно, противомикробный препарат обладает бактерицидным типом действия в отношении *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC.

Зависимость оптической плотности ампициллина с культурой *Staphylococcus aureus* 6538-P ATCC обнуляли по показателям оптической плотности ампициллина. Оптическая плотность культуральной среды в присутствии тест-штамма *Staphylococcus aureus*, культивируемого при концентрациях 0,125 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл ампициллина составляет 0,003; 0,0029; 0,003; 0,0028 соответственно (формула 3). Оптическая плотность культуральной среды с исследуемым микроорганизмом, при культивировании без ампициллина составляет 0,33.

$$K_D = \frac{0,003 + 0,0029 + 0,003 + 0,0028}{4} \times 100 = 0,293 \quad (3)$$

Показатель K_D с ампициллином менее 1, следовательно, противомикробный препарат обладает бактерицидным типом действия в отношении *Staphylococcus aureus* 6538-Р ATCC.

Исследование типа противомикробного действия цефазолина – с доказанным бактерицидным типом противомикробного действия

Зависимость оптической плотности цефазолина с культурой *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC обнуляют по показателям оптической плотности цефазолина (0,008). Оптическая плотность культуральной среды в присутствии тест-штамма *Streptococcus pyogenes*, культивируемого при 0,125 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл [81] концентрациях цефазолина составляет 0,002; 0,002; 0,001; 0,001 соответственно (формула 4). Оптическая плотность культуральной среды с исследуемым микроорганизмом, при культивировании без цефазолина составляет 0,311.

$$K_D = \frac{0,002 + 0,002 + 0,001 + 0,001}{4} \times 100 = 0,150 \quad (4)$$

Показатель K_D с цефазолином менее 1, следовательно, противомикробный препарат обладает бактерицидным типом действия в отношении *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC.

Зависимость оптической плотности цефазолина с культурой *Staphylococcus aureus* 6538-Р ATCC обнуляли по показателям оптической плотности антибиотика (0,006). Оптическая плотность культуральной среды в присутствии тест-штамма *Staphylococcus aureus*, культивируемого при 0,125 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл концентрациях цефазолина составляет 0,006; 0,008; 0,005; 0,005 соответственно (формула 5). Оптическая плотность культуральной среды с исследуемым микроорганизмом, при культивировании без цефазолина составляет 0,33.

$$K_D = \frac{0,006 + 0,008 + 0,005 + 0,005}{4} \times 100 = 0,600 \quad (5)$$

Показатель K_D с цефазолином менее 1, следовательно, противомикробный препарат обладает бактерицидным типом действия в отношении *Staphylococcus aureus* 6538-Р ATCC.

Исследование типа противомикробного действия азитромицина – с доказанным бактериостатическим типом противомикробного действия

Зависимость оптической плотности азитромицина с культурой *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC обнуляли по показателям оптической плотности азитромицина (0,039). Оптическая плотность культуральной среды в присутствии тест-штамма *Streptococcus pyogenes*, культивируемого при 0,125 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл [81] концентрациях азитромицина составляет 0,061; 0,023; 0,017; 0,009 соответственно (формула 6). Оптическая плотность культуральной среды с исследуемым микроорганизмом, при культивировании без азитромицина составляет 0,311.

$$K_D = \frac{0,061 + 0,023 + 0,017 + 0,009}{4} \times 100 = 2,75 \quad (6)$$

Показатель K_D с азитромицином более 1, следовательно, противомикробный препарат обладает бактериостатическим типом действия в отношении *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC.

Зависимость оптической плотности азитромицина с культурой *Staphylococcus aureus* 6538-Р ATCC обнуляли по показателям оптической плотности антибиотика (0,039). Оптическая плотность культуральной среды в присутствии тест-штамма *Staphylococcus aureus*, культивируемого при 0,125 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл концентрациях азитромицина составляет 0,018; 0,014; 0,01; 0,007 соответственно (формула 7). Оптическая плотность

культуральной среды с исследуемым микроорганизмом, при культивировании без азитромицина составляет 0,33.

$$K_D = \frac{0,018 + 0,014 + 0,010 + 0,007}{4} \times 100 = 1,23 \quad (7)$$

Показатель K_D с азитромицином более 1, следовательно, противомикробный препарат обладает бактериостатическим типом действия в отношении *Staphylococcus aureus* 6538-Р ATCC.

Исследование типа противомикробного действия линкомицина – с доказанным бактериостатическим типом противомикробного действия

Зависимость оптической плотности линкомицина с культурой *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC обнуляли по показателям оптической плотности линкомицина (0,006). Оптическая плотность культуральной среды в присутствии тест-штамма *Streptococcus pyogenes*, культивируемого при 0,125 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл [81] концентрациях линкомицина составляет 0,031; 0,017; 0,009; 0,005 соответственно (формула 8). Оптическая плотность культуральной среды с исследуемым микроорганизмом, при культивировании без линкомицина составляет 0,311.

$$K_D = \frac{0,031 + 0,017 + 0,009 + 0,005}{4} \times 100 = 1,55 \quad (8)$$

Показатель K_D с линкомицином более 1, следовательно, противомикробный препарат обладает бактериостатическим типом действия в отношении *Streptococcus pyogenes* 19615 ATCC.

Зависимость оптической плотности линкомицина с культурой *Staphylococcus aureus* 6538-Р ATCC обнуляли по показателям оптической плотности антибиотика (0,039). Оптическая плотность культуральной среды в

присутствии тест-штамма *Staphylococcus aureus*, культивируемого при 0,125 мкг/мл, 0,25 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл концентрациях линкомицина составляет 0,051; 0,029; 0,018; 0,006 соответственно (формула 9). Оптическая плотность культуральной среды с исследуемым микроорганизмом, при культивировании без линкомицина составляет 0,33.

$$K_D = \frac{0,051 + 0,029 + 0,018 + 0,006}{4} \times 100 = 2,60 \quad (9)$$

Показатель K_D с линкомицином более 1, следовательно, противомикробный препарат обладает бактериостатическим типом действия в отношении *Staphylococcus aureus* 6538-Р ATCC.

*Исследование типа противомикробного действия соединения с
лабораторным шифром **HD***

Зависимость оптической плотности соединения с лабораторным шифром **HD** с культурой *Staphylococcus aureus* 6538-Р ATCC обнуляли по показателям оптической плотности антибиотика (0,012). Оптическая плотность культуральной среды в присутствии тест-штамма *Staphylococcus aureus*, культивируемого при 29,5 мкг/мл, 59 мкг/мл, 118 мкг/мл, 236 мкг/мл [465] концентрациях циклического амида **HD** составляет 0,03; 0,019; 0,011; 0,005 соответственно (формула 10). Оптическая плотность культуральной среды с исследуемым микроорганизмом, при культивировании без исследуемого соединения составляет 0,27.

$$K_D = \frac{0,030 + 0,019 + 0,011 + 0,005}{4} \times 100 = 1,625 \quad (10)$$

Показатель K_D с циклическим амидом **HD** более 1, следовательно, исследуемое соединение обладает бактериостатическим типом действия в отношении *Staphylococcus aureus* 6538-Р ATCC.

*Исследование типа противомикробного действия соединения
с лабораторным шифром S3*

Зависимость оптической плотности соединения с лабораторным шифром **S3** с культурой *Staphylococcus aureus* 6538-Р ATCC обнуляют по показателям оптической плотности антибиотика (0,046). Оптическая плотность культуральной среды в присутствии тест-штамма *Staphylococcus aureus*, культивируемого при 31,25 мкг/мл, 62,5 мкг/мл, 125 мкг/мл, 250 мкг/мл [465] концентрациях циклического амида **S3** составляет 0,029; 0,012; 0,009; 0,003 соответственно (формула 11). Оптическая плотность культуральной среды с исследуемым микроорганизмом, при культивировании без исследуемого соединения составляет 0,27.

$$K_D = \frac{0,029 + 0,012 + 0,009 + 0,003}{4} \times 100 = 1,325 \quad (11)$$

Показатель K_D с циклическим амидом **S3** более 1, следовательно, исследуемое соединение обладает бактериостатическим типом действия в отношении *Staphylococcus aureus* 6538-Р ATCC.

*Исследование типа противомикробного действия соединения
с лабораторным шифром 7D*

Зависимость оптической плотности соединения с лабораторным шифром **7D** с культурой *Staphylococcus aureus* 6538-Р ATCC обнуляют по показателям оптической плотности антибиотика (0,004). Оптическая плотность культуральной среды в присутствии тест-штамма *Staphylococcus aureus*, культивируемого при 62,5 мкг/мл, 125 мкг/мл, 250 мкг/мл, 500 мкг/мл [465] концентрациях амида **7D** составляет 0,06; 0,03; 0,012; 0,004 соответственно (формула 12). Оптическая

плотность культуральной среды с исследуемым микроорганизмом, при культивировании без исследуемого соединения составляет 0,27.

$$K_D = \frac{0,060 + 0,030 + 0,012 + 0,004}{4} \times 100 = 2,65 \quad (12)$$

Показатель K_D с амидом **7D** более 1, следовательно, исследуемое соединение обладает бактериостатическим типом действия в отношении *Staphylococcus aureus* 6538-P ATCC.

*Исследование типа противомикробного действия соединения
с лабораторным шифром 39D*

Зависимость оптической плотности соединения с лабораторным шифром **39D** с культурой *Staphylococcus aureus* 6538-P ATCC обнуляют по показателям оптической плотности антибиотика (0,023). Оптическая плотность культуральной среды в присутствии тест-штамма *Staphylococcus aureus*, культивируемого при 15,6 мкг/мл, 31,25 мкг/мл, 62,5 мкг/мл, 125 мкг/мл [465] концентрациях пирролохинолона **39D** составляет 0,030; 0,018; 0,008; 0,003 соответственно (формула 13). Оптическая плотность культуральной среды с исследуемым микроорганизмом, при культивировании без исследуемого соединения составляет 0,27.

$$K_D = \frac{0,030 + 0,018 + 0,008 + 0,003}{4} \times 100 = 1,475 \quad (13)$$

Показатель K_D с пирролохинолоном **39D** более 1, следовательно, исследуемое соединение обладает бактериостатическим типом действия в отношении *Staphylococcus aureus* 6538-P ATCC.

*Исследование типа противомикробного действия соединения
с лабораторным шифром 5D*

Зависимость оптической плотности соединения с лабораторным шифром **5D** с культурой *Staphylococcus aureus* 6538-Р ATCC обнуляют по показателям оптической плотности антибиотика (0,006). Оптическая плотность культуральной среды в присутствии тест-штамма *Staphylococcus aureus*, культивируемого при 7,8 мкг/мл, 15,6 мкг/мл, 31,25 мкг/мл, 62,5 мкг/мл [465] концентрациях циклического амида **5D** составляет 0,045; 0,026; 0,014; 0,006 соответственно (формула 14). Оптическая плотность культуральной среды с исследуемым микроорганизмом, при культивировании без исследуемого соединения составляет 0,27.

$$K_D = \frac{0,045 + 0,026 + 0,014 + 0,006}{4} \times 100 = 2,275 \quad (14)$$

Показатель K_D с циклическим амидом **5D** более 1, следовательно, исследуемое соединение обладает бактериостатическим типом действия в отношении *Staphylococcus aureus* 6538-Р ATCC.

Показатель K_D с исследуемыми соединениями составлял более 1. 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 в главе 7 настоящей работы.

ГЛАВА 9. ВЛИЯНИЕ ИССЛЕДУЕМЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ЗАМЕЩЕННЫХ 4-, 5-, 6-, 7-АМИНОИНДОЛОВ НА ДНК ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ 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 ДНК-повреждающего действия соединений можно использовать тест-систему, в которой индукцию SOS оперонов в присутствии различных концентраций испытуемого вещества оценивают по абсолютному значению активности β -галактозидазы [117].

Эффективность мутационного процесса в целом зависит от ряда факторов, причем сам факт взаимодействия молекулы химического соединения с ДНК является лишь одним из этапов в общем процессе, приводящем к возникновению мутаций. В течение последних десятилетий расшифрованы основные механизмы работы SOS-системы бактерий, которая формирует комплексный SOS-ответ клетки на повреждение ДНК [141].

SOS-ответ включает следующие основные реакции: задержка клеточного деления, замедление клеточного дыхания, индукцию профагов и SOS репарацию ДНК. В результате «ошибочной» SOS-репарации, возможна репликация ДНК и дальнейшее клеточное деление. Роль UmuDC-зависимой SOS-репарации состоит в том, что при множественных дефектах ДНК, если клетка никак не поспевает возобновить начальную последовательность ДНК, она стремится продолжить репликацию, посредством введения случайных оснований в синтезируемую цепь напротив повреждений. Установлено, что индукция SOS-ответа приводит к значительному увеличению частоты мутаций. Если жизненно важные функции

все-таки безнадежно утрачены, такая клетка, в конце концов, погибнет. В том случае, если мутации, возникшие в результате «ошибочной» SOS-репарации окажутся не летальными, клетка выживет, но ее потомки будут носителями мутаций, возникших в процессе SOS-ответа клетки [23].

Таким образом, факторы, индуцирующие SOS-ответ клетки, обладают ДНК-повреждающей (генотоксической) активностью и способны вызвать так называемый SOS-мутагенез в клетках бактерий.

В настоящей работе для оценки ДНК-повреждающей активности соединений использован SOS-хромотест, предложенный в 1982 г. Philippe Quillardet с коллегами [407; 408].

Фактор индукции SOS-ответа соединения **7D** в концентрациях 50 и 500 мкг/мл оказался ниже порогового значения, и составляло 1,2 и 1,8 соответственно, при повышении концентрации изучаемого циклического амида до 1000 мкг/мл значение IF превысило пороговый уровень «2» и составило 3,2. Исследуемое соединение статистически значимо повышало активность индуцибельного фермента β -галактозидазы в концентрации 1000 мкг/мл (таблица 9.1).

Таблица 9.1 – SOS-индуцирующая активность циклического амида 7D

Исследуемое соединение	Доза, мкг/мл	β -галактозидаза, показатель активности	Щелочная фосфатаза, показатель активности	Фактор индукции SOS-ответа (IF)
Негативный контроль	-	246,3 $\pm$ 27,0	1453,3 $\pm$ 94,8	-
Митомицин С	10	2107,2 $\pm$ 70,9	1775,6 $\pm$ 93,1	7,02
7D	50	243,4 $\pm$ 31,3	1290,8 $\pm$ 185,9	1,2
	500	399,2 $\pm$ 78,9	1315,2 $\pm$ 218,9	1,8
	1000	946,5 $\pm$ 34,6*	1682, 5 $\pm$ 73,1	3,2

Примечание: * - отличие от контроля статистически достоверно при $P < 0,05$.

Амид **66D** в исследуемых концентрациях в тесте на повреждение ДНК не проявил ни токсического, ни генотоксического действия. Фактор индукции SOS-ответа для изучаемого соединения в концентрации от 50 до 1000 мкг/мл был ниже порогового значения (таблица 9.2).

Таблица 9.2 – SOS-индуцирующая активность амида 66D

Исследуемое соединение	Доза, мкг/мл	β -галактозидаза, показатель активности	Щелочная фосфатаза, показатель активности	Фактор индукции SOS-ответа (IF)
Негативный контроль	-	177,2 $\pm$ 9,6	1493,7 $\pm$ 76,2	
Митомицин С	10	2107,2 $\pm$ 70,9	1775,54731 $\pm$ 93,05	7,02
66D	50	173,5 $\pm$ 7,55	1575,5 $\pm$ 238,1	1,0
	500	192,6 $\pm$ 4,6	1506,1 $\pm$ 41,4	1,10
	1000	187,7 $\pm$ 6,3	1417,9 $\pm$ 133,9	1,17

Фактор индукции SOS-ответа соединения **HD** в концентрации 50 мкг/мл оказался ниже порогового значения, и составил 1,3. При повышении концентрации изучаемого циклического амида до 500 мкг/мл значение IF превысило пороговый уровень «2» и составило 2,8. Дальнейшее увеличение концентрации изучаемого соединения **HD** выявило дозозависимое повышение значения фактора индукции SOS-ответа до 6,7. Исследуемый циклический амид статистически значимо увеличивал активность индуцибельного фермента β -галактозидазы в концентрации 500 и 1000 мкг/мл (таблица 9.3).

Таблица 9.3 – SOS-индуцирующая активность циклического амида **HD**

Исследуемое соединение	Доза, мкг/мл	β -галактозидаза, показатель активности	Щелочная фосфатаза, показатель активности	Фактор индукции SOS-ответа (IF)
Негативный контроль	-	177,2 $\pm$ 9,6	1493,7 $\pm$ 76,2	
Митомицин С	10	2107,2 $\pm$ 70,9	1775,6 $\pm$ 93,1	7,02
HD	50	246,0 $\pm$ 9,2	1636,6 $\pm$ 172,1	1,3
	500	532,1 $\pm$ 121,9*	1098,9 $\pm$ 386,0	2,8
	1000	1055,9 $\pm$ 94,2*	1387,9 $\pm$ 44,4	6,7

Примечание: * - отличие от контроля статистически достоверно при $P < 0,05$.

Фактор индукции SOS-ответа пирролохинолона **4D** в концентрации 50 мкг/мл также оказался ниже порогового значения, и составил 1,9. При повышении концентрации изучаемого пирролохинолона до 500 мкг/мл значение IF превысило пороговый уровень «2» и составило 3,1. Изучаемое соединение **4D** выявило дозозависимое SOS-индуцирующее действие, однако способность индуцировать SOS-ответ у него выражена слабее, чем у циклического амида **HD** и IF пирролохинолона **4D** составил 3,8. Исследуемый пирролохинолон **4D** статистически значимо увеличивал активность индуцибельного фермента β -галактозидазы в концентрации 1000 мкг/мл (таблица 9.4).

Таблица 9.4 – SOS-индуцирующая активность пирролохинолона **4D**

Исследуемое соединение	Доза, мкг/мл	β -галактозидаза, показатель активности	Щелочная фосфатаза, показатель активности	Фактор индукции SOS-ответа (IF)
Негативный контроль	-	177,2 $\pm$ 9,6	1493,7 $\pm$ 76,2	-
Митомицин С	10	2107,2 $\pm$ 70,9	1775,6 $\pm$ 93,1	7,02
4D	50	336,2 $\pm$ 12,7	1575,6 $\pm$ 194,0	1,9
	500	333,0 $\pm$ 22,1	1000,5 $\pm$ 107,9	3,1
	1000	591,0 $\pm$ 76,8*	1287,6 $\pm$ 130,9	3,8

Примечание: * - отличие от контроля статистически достоверно при $P < 0,05$.

Фактор индукции SOS-ответа амида **S3** в концентрации 50 мкг/мл также оказался ниже порогового значения, и составил 1,7. При повышении концентрации изучаемого амида до 500 мкг/мл значение IF превысило пороговый уровень «2» и составило 2,1. Дальнейшее увеличение концентрации изучаемого соединения **S3** не выявило дозозависимого повышения значения фактора индукции SOS-ответа и значение IF осталось на уровне 2,0. Наблюдалась тенденция к увеличению активности β -галактозидазы в концентрации 1000 мкг/мл (таблица 9.5).

Таблица 9.5 – SOS-индуцирующая активность амида S3

Исследуемое соединение	Доза, мкг/мл	β -галактозидаза, показатель активности	Щелочная фосфатаза, показатель активности	Фактор индукции SOS-ответа (IF)
Негативный контроль	-	177,2 $\pm$ 9,6	1493,7 $\pm$ 76,2	-
Митомицин С	10	2107,2 $\pm$ 70,9	1775,6 $\pm$ 93,1	7,02
S3	50	211,2 $\pm$ 9,3	1188,4 $\pm$ 135,9	1,7
	500	211,2 $\pm$ 58,5	990,07 $\pm$ 99,2	2,1
	1000	224,9 $\pm$ 79,2	1132,6 $\pm$ 75,1	2,0

Значение фактора индукции SOS-ответа циклического амида **5D** в концентрации 50 мкг/мл было ниже порогового значения, и составил 1,0. При повышении концентрации изучаемого циклического амида до 500 мкг/мл значение IF достигло порогового уровня и составило 2,0. Дальнейшее увеличение концентрации изучаемого соединения **5D** выявило дозозависимое повышение значения фактора индукции SOS-ответа до 3,1. Исследуемый циклический амид **5D** статистически значимо повышал активность β -галактозидазы в концентрации 500 и 1000 мкг/мл (таблица 9.6).

Таблица 9.6 – SOS-индуцирующая активность циклического амида 5D

Исследуемое соединение	Доза, мкг/мл	β -галактозидаза, показатель активности	Щелочная фосфатаза, показатель активности	Фактор индукции SOS-ответа (IF)
Негативный контроль	-	327,6 $\pm$ 36,5	993,1 $\pm$ 39,5	-
Митомицин С	10	2107,2 $\pm$ 70,9	1775,6 $\pm$ 93,1	7,02
5D	50	282,9 $\pm$ 39,9	868,4 $\pm$ 27,9	1,0
	500	640,43 $\pm$ 51,7	938,82 $\pm$ 60,8	2,0
	1000	1004,53 $\pm$ 113,3*	854,14 $\pm$ 41,6	3,1

Примечание: * - отличие от контроля статистически достоверно при $P < 0,05$.

На фоне применения амида **43D** в исследуемых концентрациях не выявлено индукции SOS-функций у тестерного микроорганизма. Фактор индукции SOS-ответа для изучаемого соединения в концентрации от 50 до 1000 мкг/мл был ниже порогового значения (таблица 9.7).

Таблица 9.7. SOS-индуцирующая активность амида 43D

Исследуемое соединение	Доза, мкг/мл	β -галактозидаза, показатель активности	Щелочная фосфатаза, показатель активности	Фактор индукции SOS-ответа (IF)
1	2	3	4	5
Негативный контроль	-	327,6 $\pm$ 36,5	993,1 $\pm$ 39,5	-
Митомицин С	10	2107,2 $\pm$ 70,9	1775,6 $\pm$ 93,1	7,02

1	2	3	4	5
43D	50	297,1±72,8	1019,5±44,1	0,9
	500	279,1±37,8	855,2±47,6	0,9
	1000	276,3±45,4	954,2±57,2	0,9

Результаты, полученные в SOS-хромотесте, позволяют разделить исследуемые соединения по типу воздействия на геном микроорганизмов. Производные замещенных 5-аминоиндолов, амиды **66D** и **43D** не обладают SOS-индуцирующей способностью в исследуемых концентрациях (рисунок 9.1). Циклический амид **5D**, соединение на основе 4-амино-2-фенилиндола, в концентрации оказывало дозозависимый эффект на активность индуцибельного фермента β-галактозидазы тестерного штамма *E.coli* PQ 37. Соединения, на основе замещенных 6-аминоиндолов – **7D** и 7-аминоиндолов – **HD** и **4D**, также в концентрации 50 мкг/мл не демонстрировали индукцию SOS-функций у тестерного штамма кишечной палочки, а в более высоких концентрациях, являющихся бактерицидными, проявляли SOS-индуцирующую активность, что свидетельствует о влиянии на ДНК прокариотической клетки данных соединений.

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. В концентрациях 50 и 500 мкг/мл исследуемые соединения не вызывали индукцию SOS-ответа микробной клетки, но в высоких концентрациях (1000 мкг/мл), соединения с широким спектром противомикробного действия 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.

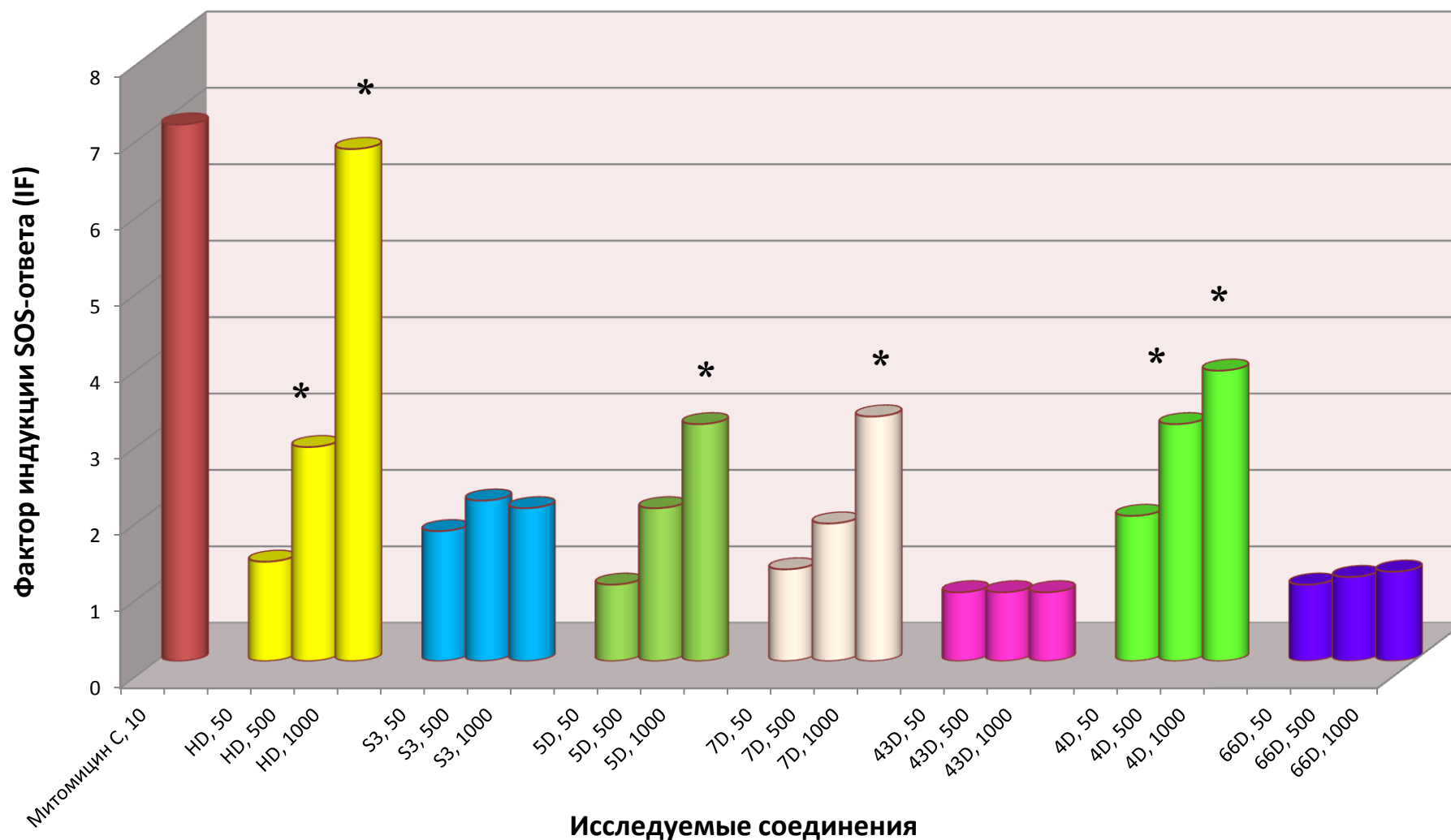


Рисунок 9.1 – Показатели фактора индукции SOS-ответа исследуемых соединений

Таким образом, проведенное исследование позволяет заключить, что механизм действия исследуемых соединений включает воздействие на ДНК микробной клетки. В высоких концентрациях соединения производные замещенных 4-, 6-, 7-аминоиндолов способны оказывать воздействие на ДНК прокариотических микроорганизмов, в бактериостатических концентрациях, выше указанные соединения и производные замещенных 5-аминоиндолов, возможно имеют дополнительный механизм.

ГЛАВА 10. ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ ЗАМЕЩЕННЫХ 4-, 6-, 7-АМИНОИНДОЛОВ НА ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ И ПРОКАРИОТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ *IN VITRO*

10.1. Цитотоксичность исследуемых соединений *in vitro*

Изучена цитотоксичность препаратов с лабораторными шифрами **5D**, **HD**, **S3** и **7D** *in vitro* на линии опухолевых клеток HeLa (ATCC ® CCL-2TM).

Исследуемые соединения **5D**, **HD**, **S3** и **7D** тестировали в диапазоне концентраций 50-1000 мкг/мл в четырех параллельных сравнениях (для каждой концентрации) в 4 сериях экспериментов. Среднее значение для четырех измерений оптической плотности в опытных и контрольных лунках (эквивалент доли метаболически активных/жизнеспособных клеток) выражали в процентах к контролю [129].

МТТ-тест показал, что при применении амида **5D** в диапазоне концентраций от 1000 до 50 мкг/мл доля жизнеспособных клеток по отношению к контролю колебалась в пределах $96,1 \pm 3,8$ % до $89,2 \pm 1,5$ % соответственно (таблица 10.1; рисунок 10.1). На фоне введения в культуру опухолевых клеток циклического амида **HD** в аналогичных концентрациях жизнеспособность клеток существенно не изменялась, процент жизнеспособности находился в пределах от $85,1 \pm 3,8$ % до $70,4 \pm 1,3$ %, что статистически не отличалось от контроля. Показатель жизнеспособности клеток аденокарциномы шейки матки человека в присутствии амида **S3**, добавленного в культуральную среду в дозе 1000 мкг/мл составил $89,3 \pm 3,1$ %, в дозе 500 мкг/мл – $92,2 \pm 4,4$ % и в дозе 50 мкг/мл – $95,7 \pm 3,4$ %, что подтверждает отсутствие цитотоксического действия *in vitro*.

Таблица 10.1 – Выживаемость линии опухолевых клеток HeLa на фоне применения исследуемых соединений (MTT-тест)

Доза соединения, мкг/мл	Исследуемые соединения			
	5D	HD	S3	7D
	Доля жизнеспособных клеток по отношению к контролю, %			
1000	89,2±1,5	70,4±1,3	89,3±3,1	112,2±2,6
500	92,5±3,2	71,2±7,5	92,2±4,4	109,5±2,4
50	96,1±3,8	85,1±3,8	95,7±3,4	106,2±3,5

Примечание: * - отличие от контроля статистически достоверно при $P < 0,05$; выживаемость культуры клеток в контроле составляет 100 %.

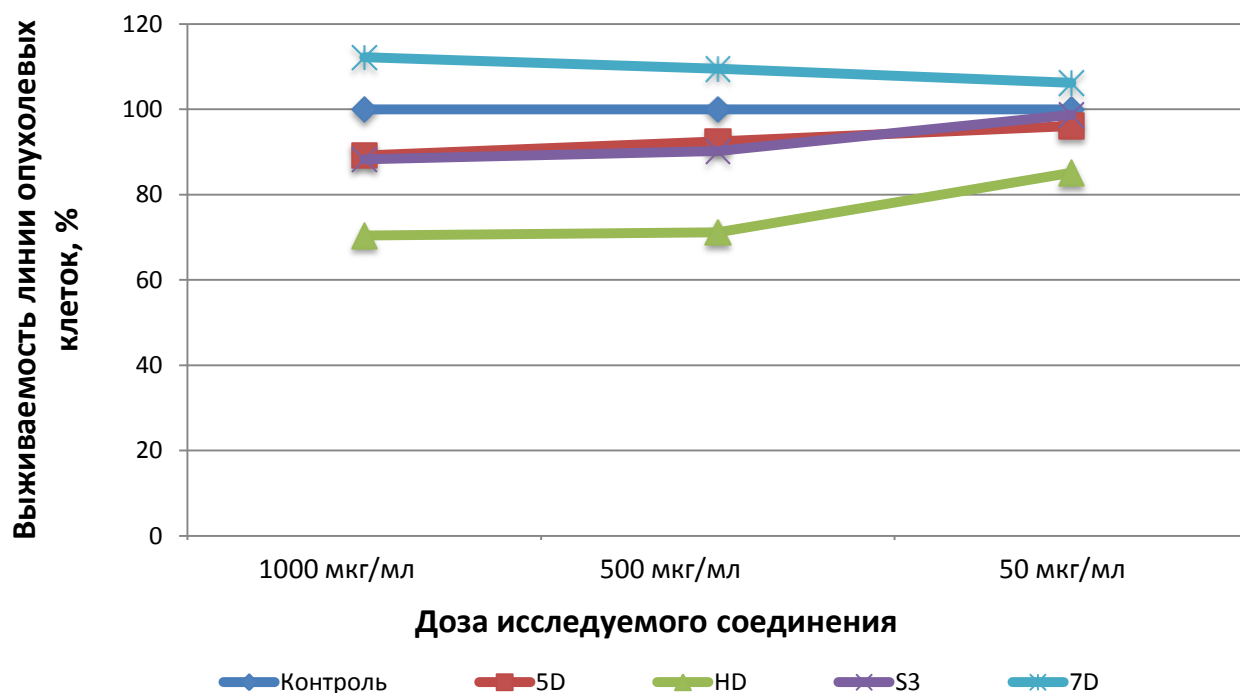


Рисунок 10.1 – Динамика выживаемости линии опухолевых клеток HeLa на фоне применения исследуемых соединений (MTT-тест)

В ходе эксперимента было выявлено, что соединение **7D** усиливают пролиферацию исследуемой тест-культуры, показатель выживаемости линии

опухолевых клеток HeLa на его фоне превышает этот показатель в контроле. Так в дозе 1000 мкг/мл доля жизнеспособных клеток по отношению к контролю составила $112,2 \pm 2,6$ %, в дозе 50 мкг/мл $-109,5 \pm 2,4$ % и в дозе 50 мкг/мл – $106,2 \pm 3,5$ %.

В ходе эксперимента выявлено, что исследуемые соединения **5D**, **HD**, **S3**, **7D** не обладают способностью оказывать токсическое воздействие на эукариотические клетки аденокарциномы шейки матки человека при инкубации в присутствии исследуемых концентраций в течении 48 часов.

В результате исследования выявилась тенденция к увеличению количества метаболически активных клеток при инкубировании в присутствии циклического амида **7D**, что может свидетельствовать о возможном митогенном эффекте исследуемого соединения.

Таким образом, все изучаемые соединения в исследуемом интервале концентраций не обладают способностью оказывать цитотоксическое воздействие на эукариотические клетки аденокарциномы шейки матки человека.

10.2. Исследование генотоксических эффектов исследуемых соединений *in vitro*

Диапазон концентраций, приемлемых для использования в тесте Эймса, определен в процессе оценки токсичности исследуемых соединений по отношению к штамму *S.typhimurium* TA 100. Среднее число колониеобразующих единиц (КОЕ) штамма *S.typhimurium* TA 100 на чашках с питательной средой составило 197,7. При добавлении к питательной среде исследуемого циклического амида с лабораторным шифром **7D** в дозе 50 мкг/мл среднее число КОЕ тест-штамма сальмонеллы составило 196,7, в дозе 500 мкг/мл – 196,7 и в дозе 1000 мкг/мл – 121,7. Таким образом, средняя выживаемость штамма *S.typhimurium* TA 100 при добавлении исследуемого соединения оказалась $>50\%$, так как при добавлении 50 мкг/мл соединения **7D** средняя выживаемость составляла 99,3 %, 500 мкг/мл – 99,3 % и 1000 мкг/ мл – 61,45 %. Соединение с

лабораторным шифром **7D** не показало токсических эффектов ни в одной из исследуемых концентраций (таблица 10.2).

При исследовании амида **5D** наблюдалась следующая динамика. Среднее число колониеобразующих единиц (КОЕ) штамма *S.typhimurium* ТА 100 на чашках с питательной средой с добавлением исследуемого соединения **5D** в дозе 50 мкг/мл составило 196, в дозе 500 мкг/мл – 180,7 и в дозе 1000 мкг/мл – 138,7. Средняя выживаемость ауксотрофного штамма *S.typhimurium* составила 98,99 %, 91,25 % и 70,03 % соответственно для исследуемых концентраций. Соединение с лабораторным шифром **5D** не показало токсических эффектов ни в одной из исследуемых концентраций.

При добавлении к питательной среде исследуемого амида с лабораторным шифром **S3** в дозе 50 мкг/мл среднее число КОЕ штамма *S.typhimurium* ТА 100 составило 189,3, в дозе 500 мкг/мл – 170 и в дозе 1000 мкг/мл – 159. Таким образом, средняя выживаемость исследуемого штамма сальмонеллы при добавлении исследуемого соединения оказалась >50 %, так как при добавлении 50 мкг/мл соединения **S3** средняя выживаемость штамма *S.typhimurium* составляла 95,62 %, 500 мкг/мл – 85,86 % и 1000 мкг/мл – 80,3 %. Соединение **S3** не показало токсических эффектов ни в одной из исследуемых концентраций.

Таблица 10.2 – Токсичность исследуемых соединений по отношению к штамму *S.typhimurium* ТА 100

Исследуемое соединение	Доза, мкг/мл	Среднее число микроорганизмов, КОЕ/чашка	Средняя выживаемость штамма, %
1	2	3	4
Контроль	-	197,7	100
7D	50	196,7±2,10	99,33
	500	196,7±8,47	99,33
	1000	121,7±4,58	61,45

1	2	3	4
5D	50	196±7,07	98,99
	500	180, 7±1,54	91,25
	1000	138, 7±1,54	70,03
S3	50	189,3±3,09	95,62
	500	170±4,63	85,86
	1000	159±1,52	80,30
HD	50	150±3,64	75,76
	500	140,7±8,16	71,04
	1000	143±11,44	72,22

Добавление к питательной среде для культивирования ауксотрофного штамма *S.typhimurium* исследуемого циклического амида с лабораторным шифром **HD** не показало токсических эффектов ни в одной из исследуемых концентраций. Так при добавлении изучаемого соединения **HD** в дозе 50 мкг/мл на чашках наблюдалось в среднем 150 КОЕ штамма *S.typhimurium* TA 100, в дозе 500 мкг/мл – 140,7 КОЕ и в дозе 1000 мкг/ мл – 143 КОЕ. Средняя выживаемость исследуемого штамма составила 75,76 %, 71,04 % и 72,22 % соответственно при использовании 50 мкг/мл, 500 мкг/мл 1000 мкг/мл соединения **HD**. Соответственно показатели средней выживаемости оказались >50 %.

Результаты, полученные при оценке токсичности исследуемых соединений в концентрациях 50, 500, 1000 мкг/чашка, свидетельствуют о том, что в данном диапазоне концентраций соединения с лабораторными шифрами **7D**, **5D**, **S3**, **HD** не вызывают существенного угнетения роста (более 50%) тест-штамма *Salmonella typhimurium* TA100. Это позволило использовать указанный диапазон концентраций в тесте Эймса.

10.3. Способность исследуемых соединений к индукции генных мутаций

Среднее число колоний His⁺ревертантов на питательной среде, содержащей 10 мкг азида натрия (положительный контроль), составило $511,3 \pm 19,73$. Среднее число колоний His⁺ревертантов на питательной среде, содержащей ДМСО (отрицательный контроль), составило $83,3 \pm 5,7$. При добавлении к питательной среде исследуемого циклического амида с лабораторным шифром **7D** в дозе 50 мкг/мл среднее число КОЕ His⁺ревертантов сальмонеллы составило $154,3 \pm 2,52$, в дозе 500 мкг/мл – $154,7 \pm 3,21$ и в дозе 1000 мкг/мл – $156,7 \pm 3,51$. Таким образом, число колоний-ревертантов штамма *S.typhimurium* TA 100 при добавлении исследуемого соединения не превышало в 2 раза число колоний-ревертантов в негативном контроле, так как при добавлении 50 мкг/мл соединения **7D** индекс мутагенности составил 1,85, 500 мкг/мл – 1,86 и 1000 мкг/мл – 1,88. Соединение с лабораторным шифром **7D** не показало мутагенной активности ни в одной из исследуемых концентраций (таблица 10.3).

При исследовании амида **5D** наблюдалась следующая динамика. Среднее число КОЕ His⁺ревертантов штамма *S.typhimurium* TA 100 на чашках с питательной средой с добавлением исследуемого соединения **5D** в дозе 50 мкг/мл составило $116,3 \pm 8,02$, в дозе 500 мкг/мл – $122,7 \pm 5,51$ и в дозе 1000 мкг/мл – $124 \pm 3,61$. Индекс мутагенности амида **5D** по отношению к ауксотрофному штамму *S.typhimurium* составил 1,4, 1,47 и 1,49 соответственно для исследуемых концентраций. Соединение с лабораторным шифром **5D** не показало мутагенной активности в исследуемом диапазоне концентраций.

При добавлении к питательной среде исследуемого амида с лабораторным шифром **S3** в дозе 50 мкг/мл среднее число КОЕ-ревертантов штамма *S.typhimurium* TA 100 составило $116,7 \pm 4,5$, в дозе 500 мкг/мл – $139,7 \pm 6,66$ и в дозе 1000 мкг/мл – $156 \pm 2,65$. Таким образом, индекс мутагенности исследуемого соединения оказался менее 2, так как при добавлении 50 мкг/мл **S3** этот показатель штамма *S.typhimurium* составлял 1,4, 500 мкг/мл – 1,68 и 1000 мкг/мл – 1,87. Соединение с лабораторным шифром **S3** не показало мутагенных эффектов

ни в одной из исследуемых концентраций, хотя индекс мутагенности дозозависимо увеличивался, но оставался в пределах нормы даже при 1000 мкг/мл.

Добавление к питательной среде для культивирования ауксотрофного штамма *S.typhimurium* исследуемого циклического амида с лабораторным шифром **HD** не показало мутагенной активности ни в одной из исследуемых концентраций. Так при добавлении исследуемого соединения **HD** в дозе 50 мкг/мл на чашках наблюдалось в среднем $73,3 \pm 4,73$ КОЕ His+ревертантов штамма *S.typhimurium* TA 100, в дозе 500 мкг/мл – $86,7 \pm 5,5$ КОЕ и в дозе 1000 мкг/мл – $102,3 \pm 3,06$ КОЕ. Индекс мутагенности исследуемого соединения составил 0,88, 1,04 и 1,23 соответственно при использовании 50 мкг/мл, 500 мкг/мл 1000 мкг/мл соединения **HD**. Соответственно индекс мутагенности оставался в пределах нормы.

Таблица 10.3 – Мутагенность исследуемых соединений по отношению к штамму *S.typhimurium* TA 100

Исследуемое соединение	Доза, мкг/мл	Среднее число колоний His+ревертантов/чашка	Превышение над спонтанным фоном мутирования
1	2	3	4
Негативный контроль		$83,33 \pm 5,69$	-
Позитивный контроль		$511,3 \pm 19,73$	6,14
7D	50	$154,3 \pm 2,52$	1,85
	500	$154,7 \pm 3,21$	1,86
	1000	$156,7 \pm 3,51$	1,88

1	2	3	4
5D	50	116,3±8,02	1,40
	500	122,7±5,51	1,47
	1000	124±3,61	1,49
S3	50	116,7±4,51	1,40
	500	139,7±6,66	1,68
	1000	156±2,65	1,87
HD	50	73,3±4,73	0,88
	500	86,7±5,51	1,04
	1000	102,3±3,06	1,23

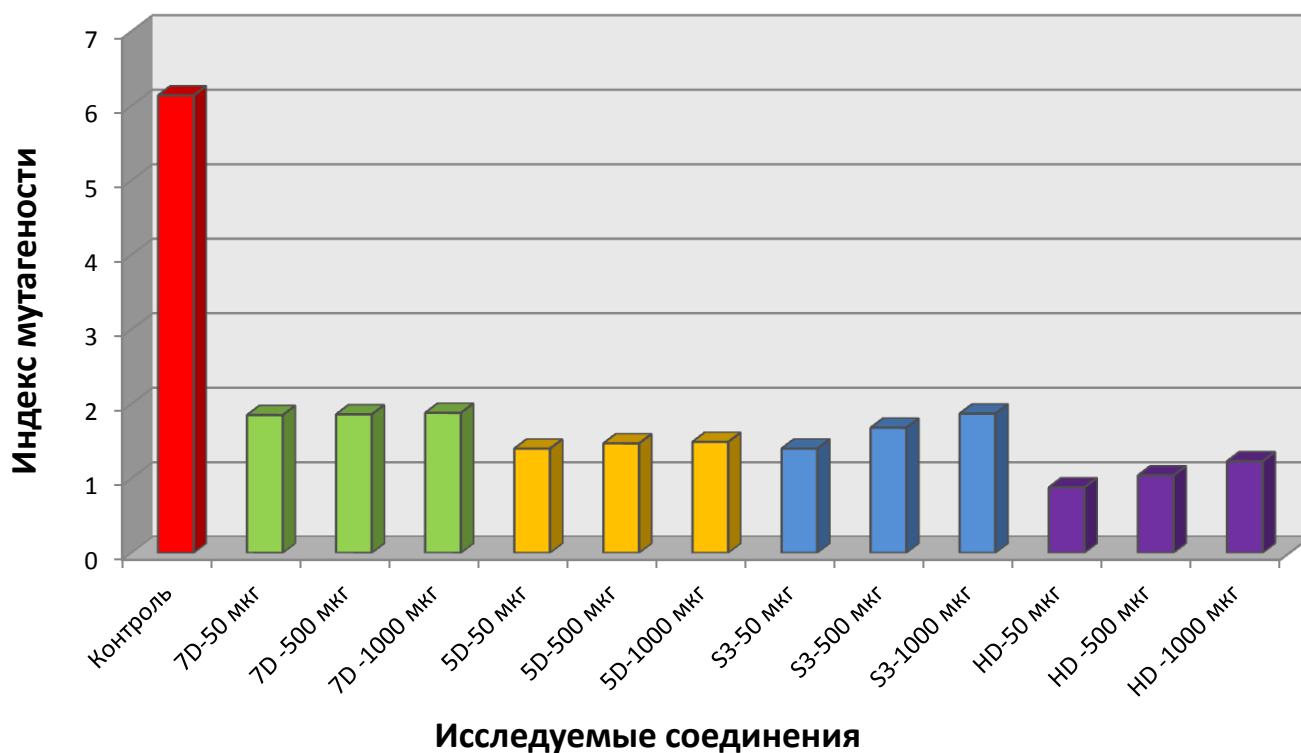


Рисунок 10.2 - Мутагенность исследуемых соединений по отношению к штамму *S.typhimurium* TA 100

При исследовании соединений **7D**, **5D**, **S3** и **HD** в тесте Эймса установлено, что ни одно из соединений не вызывает превышение числа колоний,

индуцированных His⁺-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, исключает мутагенное воздействие на прокариотические клетки и возможность индукции генных мутаций в прокариотической клетке.

ГЛАВА 11. ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ИССЛЕДУЕМЫХ СОЕДИНЕНИЙ *IN VIVO* НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХИРУРГИЧЕСКОЙ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ

В результате проведенного исследования определено, что не инфицированная экспериментальная хирургическая рана у мышей имеет обычную клиническую картину, связанную с неинфицированной раной открытого типа. Сразу после того, как был сделан разрез, было только минимальное кровотечение, и оно прекратилось спонтанно. Небольшие отек и эритема наблюдались на ранних стадиях заживления ран, которое быстро прогрессировало почти до полного восстановления целостности тканей через 2-3 недели.

Микроскопически неинфицированная рана первоначально демонстрировала классические признаки воспаления: отек, экстравазационные эритроциты и лейкоциты. Расширенные капилляры. В результате хирургической процедуры гибели животных не наблюдалось.

При инфицировании *S.aureus* и *P.aeruginosa*, клинические признаки инфекции присутствовали, но не были ярко выражены. По краям ран наблюдались незначительные отек и эритема, и на разведенной коже отмечалось нагноение. Заживление ран обычно требовало около 3-х недель с момента заражения. Гибель мышей, инфицированных *S.aureus* не наблюдалась. Гибель животных регистрировалась у мышей, инфицированных *P.aeruginosa*.

Для воспроизведения раневой инфекции использовали инокулюм микроорганизмов плотностью $1,5 \times 10^8$ КОЕ в МХБ (0,5 по Мак-Фарланду).

Исследуемые соединения использовали в виде растворов в глицерине (10 мг/мл). Для нанесения на раны использовали насадку-распылитель. Лечебная процедура включала орошение поверхности ран 2 раза в сутки в течение 5 дней: **5D**, **7D**, **S3** и **HD** для экспериментальных хирургических ран, инфицированных *S.aureus* ATCC 43300; **S3** и **HD** для экспериментальных хирургических ран, инфицированных *P.aeruginosa* ATCC 27853.

В качестве препарата сравнения использовали раствор диоксидина (10 мг/мл) для внутриполостного и наружного применения. Лечебная процедура включала орошение поверхности ран 2 раза в сутки в течение 5 дней.

В процессе эксперимента определено, что методика поверхностных смывов собирает из раны только поверхностно локализованные бактерии, тогда как метод гомогенизации оценивает, как поверхностные, так и тканево-локализованные микроорганизмы. Поэтому, более высокие показатели обсемененности раны, полученные методом гомогенизации, являются показателем инвазивности заражающего организма (таблицы 11.1, 11.2).

Таблица 11.1 – Показатели среднего микробного числа в процессе формирования экспериментальных хирургических ран, инфицированных *S.aureus* ATCC 43300

День после инфицирования	Среднее значение микробного числа (n=10)	
	Метод поверхностного смыва, Log КОЕ/рана($\pm m$)*	Метод гомогенизации, Log КОЕ/г($\pm m$)*
1	7,15 $\pm$ 1,4	8,41 $\pm$ 1,3
2	7,68 $\pm$ 1,5	8,26 $\pm$ 2,1
3	7,92 $\pm$ 2,1	8,47 $\pm$ 1,4
4	7,89 $\pm$ 3,0	8,36 $\pm$ 1,5
5	7,86 $\pm$ 2,0	8,13 $\pm$ 1,3
6	7,82 $\pm$ 1,0	7,95 $\pm$ 0,6
7	7,75 $\pm$ 1,4	7,93 $\pm$ 0,5
10	5,43 $\pm$ 0,4	5,56 $\pm$ 0,7
14	2,93 $\pm$ 2,4	3,32 $\pm$ 1,6

* – среднее отклонение.

Однако количество микроорганизмов раны, полученное методом поверхностного смыва, хотя и ниже, также точно отражает динамику общего

количества микроорганизмов раны, поверхностно- и тканево-локализованных бактерий в ходе инфекции.

Таблица 11.2 – Показатели среднего микробного числа в процессе формирования экспериментальных хирургических ран, инфицированных *P.aeruginosa* ATCC 27853

День после инфицирования	Среднее значение микробного числа (n=10)	
	Метод поверхностного смыва, Log КОЕ/рана($\pm m$)*	Метод гомогенизации, Log КОЕ/г($\pm m$)*
1	6,4 $\pm$ 1,4	6,94 $\pm$ 0,5
2	6,94 $\pm$ 1,5	8,38 $\pm$ 1,2
3	5,91 $\pm$ 2,1	9,37 $\pm$ 2,1
4	5,78 $\pm$ 3,0	8,89 $\pm$ 0,9
5	5,76 $\pm$ 2,0	7,98 $\pm$ 1,2
6	5,81 $\pm$ 1,0	7,95 $\pm$ 0,3
7	5,88 $\pm$ 1,4	7,93 $\pm$ 0,5
10	4,21 $\pm$ 2,5	4,98 $\pm$ 2,1
14	3,82 $\pm$ 1,0	3,88 $\pm$ 1,6

* – среднее отклонение.

Также была исследована возможность системного поражения в результате раневых инфекций, вызванных *P.aeruginosa* и *S.aureus*. Через различные промежутки времени после заражения исследованы внутренние органы и кровь для определения отсутствия или наличия тестируемого организма. Обе инфекции проявили некоторую степень системного участия довольно быстро после заражения.

В случае инфекции *S.aureus* тестируемый организм был обнаружен в печени, селезенке и почках у большинства мышей в течение 24 часов после инфицирования и определялся в течение первой недели (таблица 11.3). Однако,

когда органы исследовались через 2 недели после заражения, *S.aureus* выделялся только изредка. Из органов, взятых через 3-х и 4-недельные интервалы постинфекции, исследуемые микроорганизмы не выделялись. Несколько положительных культур крови были получены только в течение первой недели заражения, причем наибольшее количество было обнаружено после 24 часов культивирования. Во время всего эксперимента не было зафиксировано гибели экспериментальных животных после воспроизведения инфекционного процесса с *S.aureus*.

**Таблица 11.3 – Локализация микроорганизма во внутренних органах
после инфицирования экспериментальных хирургических ран
S.aureus ATCC 43300**

День после инфицирования	Количество инфицированных мышей / общее количество животных				Количество погибших животных / общее количество животных
	печень	селезенка	почки	кровь	
1	15/15	15/15	14/15	6/15	0/30
2	14/15	15/15	14/15	1/15	0/30
3	13/15	12/15	14/15	3/15	0/30
4	15/15	14/15	15/15	3/15	0/30
7	10/15	10/15	11/15	0/15	0/30
14	1/15	1/15	0/15	0/15	0/30
21	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
28	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30

При инфицировании *P.aeruginosa* через 3 дня после заражения почти 75 % мышей продемонстрировали присутствие микроорганизма в печени, почках и

селезенке, хотя культуры крови в большинстве случаев были отрицательными на протяжении всего эксперимента (таблица 11.4). *P.aeruginosa* сохранялся в органах экспериментальных животных до 7 дней, но редко выделялся впоследствии. Несколько случаев гибели животных были зарегистрированы в течение первой недели после заражения, но ни один из них не произошел позже 7 дня после инфицирования. *P.aeruginosa* была изолирована из всех внутренних органов, исследуемых мышей, которые умерли, что указывает на развитие генерализованной инфекции.

Таблица 11.4 – Локализация микроорганизма во внутренних органах после инфицирования экспериментальных хирургических ран
***P.aeruginosa* ATCC 27853**

День после инфицирования	Количество инфицированных мышей / общее количество животных				Количество погибших животных / общее количество животных
	печень	селезенка	почки	кровь	
1	4/15	2/15	4/15	0/15	0/40
2	6/15	2/15	7/15	0/15	0/40
3	13/15	10/15	10/15	3/15	2/30
4	10/15	7/15	7/15	1/15	3/30
7	6/15	7/15	7/15	0/15	5/30
14	1/15	2/15	1/15	0/15	0/30
21	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
28	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30

В эксперименте была оценена эффективность исследуемых соединений, применяемых с различной кратностью и различное количество дней. Наиболее

эффективным оказалось применение 2 раза в день в течение 5 дней. Терапия начиналась через 24 часа после инфицирования, путем орошения поверхности ран, исследуемыми соединениями.

Исследование глицерина свидетельствует об отсутствии роста, изучаемых тест-культур в нем и об отсутствии влияния растворителя на развитие экспериментального инфекционного процесса.

После инфицирования инокулятом, содержащим *S.aureus*, было обнаружено, что исследуемый микроорганизм хорошо размножается в тканях кожи. В первый день показатель бактериологического роста в ранах внутри группы экспериментальных животных ($n=10$) составил $14,1 \pm 1,4 \times 10^6$ КОЕ/рана (таблицы 11.5, 11.6; рисунок 11.1). Через три дня количество микроорганизмов в инфицированных ранах без терапии достигало пикового значения и составляло $82,3 \pm 2,1 \times 10^6$ КОЕ/рана. В последующие дни до седьмого показатели микробного роста оставались примерно на этом же уровне, хотя наблюдалась тенденция к снижению, после чего инфекция постепенно начинала разрешаться, к десятому дню количество бактерий составляло $27,2 \pm 0,4 \times 10^4$ КОЕ/рана, а к концу второй недели – $8,6 \pm 2,4 \times 10^2$ КОЕ/рана при макроскопической картине заживления.

Таблица 11.5 – Динамика показателей среднего микробного числа в ранах, инфицированных *S.aureus*, на фоне лечения исследуемыми соединениями (метод поверхностных смывов)

День после инфици- рования	Среднее значение микробного числа в смывах с ран, Log КОЕ/рана($\pm m$)*						
	Контроль	Глицерин	Диоксидин	Циклический амид 5 D	Амид S3	Циклический амид 7D	Циклический амид HD
1	7,15 $\pm$ 1,4	7,21 $\pm$ 0,4	-	-	-	-	-
2	7,68 $\pm$ 1,5	7,66 $\pm$ 1,6	6,66 $\pm$ 1,6	5,37 $\pm$ 0,7	6,19 $\pm$ 1,3	6,85 $\pm$ 0,8	5,99 $\pm$ 1,3
3	7,92 $\pm$ 2,1	7,97 $\pm$ 0,7	5,98 $\pm$ 0,7	4,94 $\pm$ 1,6	5,98 $\pm$ 2,0	6,03 $\pm$ 2,2	5,82 $\pm$ 0,9
4	7,89 $\pm$ 3,0	7,87 $\pm$ 1,3	5,87 $\pm$ 1,3	4,52 $\pm$ 1,6	5,75 $\pm$ 0,9	5,83 $\pm$ 1,4	5,38 $\pm$ 2,1
5	7,86 $\pm$ 2,0	7,84 $\pm$ 0,5	4,85 $\pm$ 0,5	4,26 $\pm$ 2,1	4,93 $\pm$ 1,5	5,32 $\pm$ 2,4	4,94 $\pm$ 1,5
6	7,82 $\pm$ 1,0	7,79 $\pm$ 1,3	4,41 $\pm$ 2,1	3,74 $\pm$ 0,8	4,54 $\pm$ 0,5	4,93 $\pm$ 0,9	4,21 $\pm$ 1,3
7	7,75 $\pm$ 1,4	7,73 $\pm$ 2,0	3,79 $\pm$ 1,3	2,87 $\pm$ 0,5	3,75 $\pm$ 1,3	3,88 $\pm$ 0,5	3,86 $\pm$ 2,1
10	5,43 $\pm$ 0,4	5,41 $\pm$ 2,1	-	-	-	-	-
14	2,93 $\pm$ 2,4	3,2 $\pm$ 0,4	-	-	-	-	-

* – среднее отклонение.

Таблица 11.6 – Динамика показателей среднего микробного числа в ранах, инфицированных *S.aureus*, на фоне лечения исследуемыми соединениями (метод гомогенизации)

День после инфици- рования	Среднее значение микробного числа, Log КОЕ/рана($\pm m$)*					
	Контроль	Диоксидин	Циклический амид 5 D	Амид S3	Циклический амид 7D	Циклический амид HD
1	7,15 $\pm$ 1,4	-	-	-	-	-
2	7,68 $\pm$ 1,5	6,31 $\pm$ 1,2	5,39 $\pm$ 1,0	6,22 $\pm$ 0,9	6,89 $\pm$ 1,4	5,97 $\pm$ 2,1
3	7,92 $\pm$ 2,1	5,98 $\pm$ 0,7	4,95 $\pm$ 1,3	5,86 $\pm$ 1,8	6,33 $\pm$ 0,8	5,89 $\pm$ 1,1
4	7,89 $\pm$ 3,0	5,94 $\pm$ 0,9	4,61 $\pm$ 0,9	5,8 $\pm$ 1,3	5,85 $\pm$ 2,1	5,55 $\pm$ 0,8
5	7,86 $\pm$ 2,0	5,61 $\pm$ 0,3	4,31 $\pm$ 1,2	5,29 $\pm$ 2,1	5,49 $\pm$ 0,8	4,97 $\pm$ 1,7
6	7,82 $\pm$ 1,0	4,9 $\pm$ 1,7	3,78 $\pm$ 1,1	4,73 $\pm$ 0,7	4,96 $\pm$ 1,5	4,48 $\pm$ 1,2
7	7,75 $\pm$ 1,4	4,21 $\pm$ 2,1	2,9 $\pm$ 1,5	3,8 $\pm$ 1,1	3,9 $\pm$ 0,4	3,89 $\pm$ 1,5
10	5,43 $\pm$ 0,4	-	-	-	-	-
14	2,93 $\pm$ 2,4	-	-	-	-	-

* – среднее отклонение.

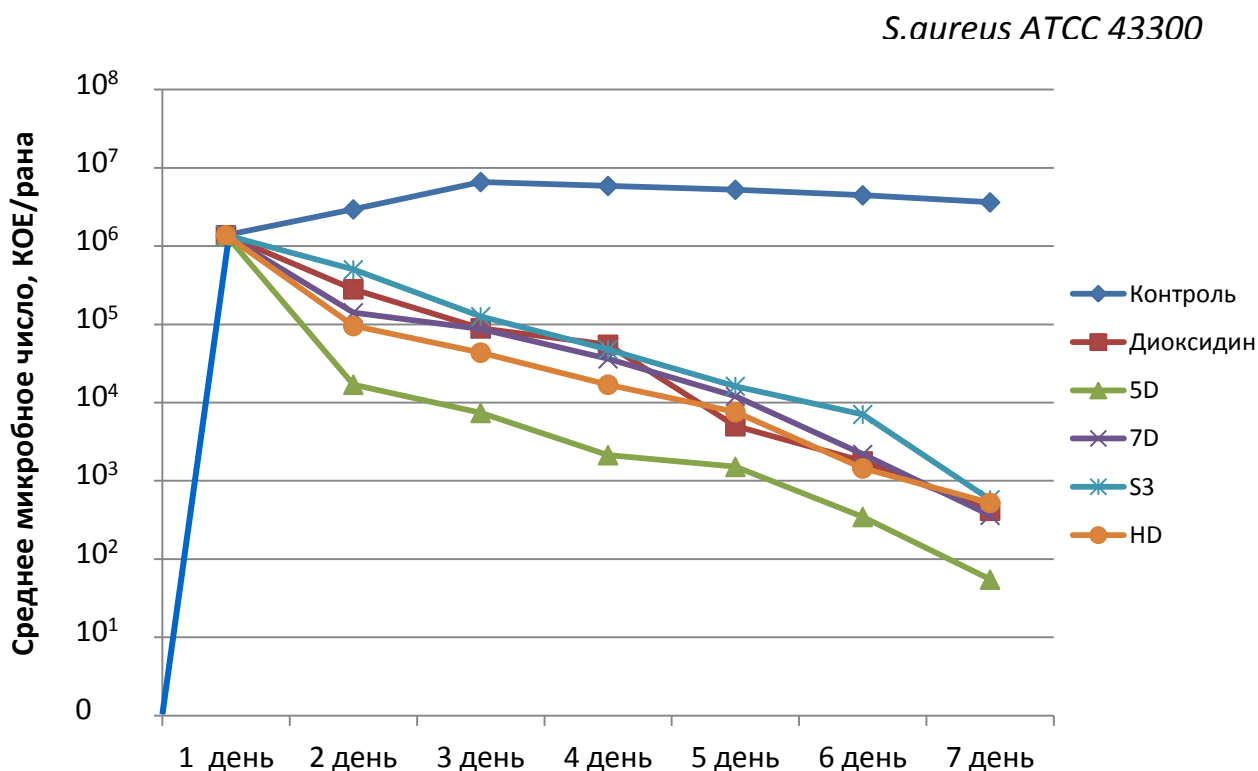


Рисунок 11.1 – Динамика показателей среднего микробного числа в ранах, инфицированных *S.aureus*, на фоне лечения исследуемыми соединениями (метод поверхностных смывов)

В течение первых 24 часов экспериментальные раны были закрытыми и сухими. По истечении двух дней, хотя кожа вокруг раны казалась неизменной снаружи, раны открылись, были влажными, с легким воспалением и начальным процессом образования гноя. Между вторыми и седьмыми сутками наблюдения никаких изменений в динамике развития экспериментального инфекционного процесса, кроме увеличения количества гноеобразования не обнаруживалось. С седьмого дня раны начинали очищаться и через десять дней признаков воспаления не визуализировалось, в экспериментальных ранах не было гноя, наблюдалось заживление.

Внешние макроскопические проявления ран, обработанных исследуемыми соединениями, были отличны от необработанных ран и ран, обработанных глицерином. Различия были в количестве образующегося гноя в

обработанных и необработанных ранах и выраженности признаков воспаления. В целом, в ранах, обработанных исследуемыми соединениями образования, гноя не наблюдалось, в отличие от необработанных и обработанных глицерином ран животных и отсутствовали признаки воспаления. Раны оставались сухими в течение всего периода наблюдения.

Данные, представленные в таблицах 11.5 и 11.6, свидетельствуют, что использование соединения с лабораторным шифром **5D** два раза в день в течение пяти дней уменьшало среднее количество микроорганизмов экспериментальной раны с $23,4 \pm 0,7 \times 10^4$ КОЕ/рана в начале терапии до $74,1 \pm 0,5 \times 10^1$ КОЕ/рана на седьмой день. С 6-го дня раны начинали заживать, что наблюдается в контрольной группе экспериментальных животных на второй неделе после заражения. Количество бактериальной популяции на 6-й день после терапии соединением с лабораторным шифром **5D** соответствует показателю 14-го дня экспериментальной инфекции в группе необработанных животных. Стафилококки, выделяемые в течение всего эксперимента из ран, не показывали изменения чувствительности к циклическому амиду **5D** (МПК 7,8 мкг/мл).

Тестируемый микроорганизм был обнаружен в печени, селезенке и почках у большинства мышей в течение 24 часов после инфицирования. После начала терапии исследуемый микроорганизм высевался из ткани печени, почек и селезенки экспериментальных животных в течение первых 2-4 дней (таблица 11.7). Последующее исследование внутренних органов через 1 неделю после заражения и далее, не обнаружило обсемененности *S.aureus*. Не были также получены положительные культуры крови на фоне терапии. Во время проведения эксперимента не было зафиксировано гибели экспериментальных животных после воспроизведения инфекционного процесса с *S.aureus*.

Таблица 11.7 – Локализация исследуемого микроорганизма во внутренних органах в процессе формирования экспериментальных хирургических ран, инфицированных *S.aureus* и последующей терапии соединением с лабораторным шифром 5D

День после инфицирования	Количество инфицированных мышей / общее количество животных				Количество погибших животных / общее количество животных
	печень	селезенка	почки	кровь	
1	15/15	15/15	14/15	6/15	0/30
2	7/15	6/15	7/15	0/15	0/30
3	5/15	4/15	5/15	0/15	0/30
4	2/15	0/15	2/15	0/15	0/30
7	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
14	0/15	/15	0/15	0/15	0/30
21	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
28	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30

Орошение экспериментальных ран соединением с лабораторным шифром **S3** два раза в день в течение пяти дней уменьшало среднее количество микроорганизмов экспериментальной раны с $15,5 \pm 1,3 \times 10^5$ КОЕ/рана в начале терапии до $56,5 \pm 1,3 \times 10^2$ КОЕ/рана на седьмой день (таблицы 11.5, 11.6). *S.aureus*, выделенные из ран, не обнаруживали изменения чувствительности к амиду **S3** (МПК 62,5 мкг/мл). С 6-7 дня раны начинали естественным образом заживать.

Тестируемый *S.aureus* обнаруживался в печени, селезенке и почках 50-53 % мышей по истечении 24 часов после начала терапии амидом **S3** (таблица 11.8).

Таблица 11.8 – Локализация микроорганизма во внутренних органах в процессе формирования экспериментальных хирургических ран, инфицированных *S.aureus* и последующей терапии соединением с лабораторным шифром S3

День после инфицирования	Количество инфицированных мышей / общее количество животных				Количество погибших животных / общее количество животных
	печень	селезенка	почки	кровь	
1	15/15	15/15	14/15	6/15	0/30
2	6/15	7/15	8/15	0/15	0/30
3	5/15	4/15	4/15	0/15	0/30
4	4/15	3/15	3/15	0/15	0/30
7	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
14	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
21	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
28	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30

В процессе терапии количество экспериментальных животных, у которых исследуемый микроорганизм высевался из ткани печени, почек и селезенки, снижалось и через 4 дня после инфицирования лишь 20 % обнаруживали тестируемый штамм во внутренних органах. Последующее исследование внутренних органов через неделю после заражения и далее, не обнаруживало в них наличия *S.aureus*. Положительные культуры крови на фоне терапии ран соединением с лабораторным шифром S3 не выявлялись. Во время всего эксперимента не было зафиксировано гибели экспериментальных животных после воспроизведения инфекционного процесса с *S.aureus*.

Согласно полученным данным (таблицы 11.5, 11.6) орошение ран соединением с лабораторным шифром **7D** два раза в день в течение пяти дней уменьшало среднее количество микроорганизмов экспериментальной раны с $70,3 \pm 0,8 \times 10^5$ КОЕ/рана в начале терапии до $76,2 \pm 0,5 \times 10^2$ КОЕ/рана на седьмой день после инфицирования. Раны начинали естественным образом заживать с 6 дня после инокуляции возбудителя, что наблюдается в контрольной группе экспериментальных животных на второй неделе после заражения. Количество бактериальной популяции на 6-й день после терапии соединением с лабораторным шифром **7D** соответствует показателю 14-го дня экспериментальной инфекции в группе необработанных животных. *S.aureus* ATCC 43300, выделенные из ран, сохраняли исходную чувствительность к циклическому амиду **7D** (МПК 125 мкг/мл).

Тестируемый *S.aureus* обнаруживался в печени, селезенке и почках 55 % мышей в течение 24 часов после начала лечения соединением с лабораторным шифром **7D** (таблица 11.9). В процессе терапии исследуемый микроорганизм высевался из ткани печени, почек и селезенки в течение первых 4 дней, но с явно выраженной динамикой к снижению. Последующее исследование внутренних органов через неделю после заражения и далее, не обнаружило наличия *S.aureus*. Положительные культуры крови на фоне терапии ран соединением с лабораторным шифром **7D** не получены. Гибель экспериментальных животных в течение всего эксперимента не фиксировалась.

Таблица 11.9 – Локализация микроорганизма во внутренних органах в процессе формирования экспериментальных хирургических ран, инфицированных *S.aureus* и последующей терапии соединением с лабораторным шифром 7D

День после инфицирования	Количество инфицированных мышей / общее количество животных				Количество погибших животных / общее количество животных
	печень	селезенка	почки	кровь	
1	15/15	15/15	14/15	6/15	0/30
2	8/15	9/15	8/15	0/15	0/30
3	5/15	2/15	3/15	0/15	0/30
4	3/15	2/15	2/15	0/15	0/30
7	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
14	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
21	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
28	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30

Терапия соединением с лабораторным шифром **HD** два раза в день в течение пяти дней уменьшала среднее количество микроорганизмов экспериментальной раны с $98,1 \pm 1,3 \times 10^4$ КОЕ/рана в начале терапии до $72,3 \pm 2,1 \times 10^2$ КОЕ/рана на седьмой день после инфицирования (таблицы 11.5, 11.6). С 6-7 дня раны начинали естественным образом заживать. *S.aureus*, выделенные из ран, не обнаруживали изменения чувствительности к циклическому амиду **HD** (МПК 59 мкг/мл).

Тестируемый микроорганизм был обнаружен в печени, селезенке и почках у 50 % мышей в течение 24 часов после начала терапии. В процессе терапии наблюдалось снижение количества экспериментальных животных, у которых

исследуемый микроорганизм высевался из ткани печени, почек и селезенки в течение первых 4 дней (табл. 11.10).

Таблица 11.10 – Локализация микроорганизма во внутренних органах в процессе формирования экспериментальных хирургических ран, инфицированных *S.aureus* и последующей терапии соединением с лабораторным шифром HD

День после инфицирования	Количество инфицированных мышей / общее количество животных				Количество погибших животных / общее количество животных
	печень	селезенка	почки	кровь	
1	15/15	15/15	14/15	6/15	0/30
2	7/15	6/15	7/15	0/15	0/30
3	3/15	2/15	4/15	0/15	0/30
4	1/15	0/15	1/15	0/15	0/30
7	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
14	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
21	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
28	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30

Через 7 дней после заражения и далее, исследование внутренних органов не выявляло наличие *S.aureus*. Положительные культуры крови на фоне терапии не обнаружены. Во время всего эксперимента не было зафиксировано гибели экспериментальных животных после воспроизведения инфекционного процесса с *S.aureus*.

Бактериологическая картина ран экспериментальных животных, полученная при исследовании методом гомогенизации, отражала динамику накопления и

распространения микроорганизмов, полученную методом поверхностных смывов (таблицы 11.5, 11.6). Поверхностно-локализованная обсемененность ран экспериментальных животных была конгруэнтна тканево-локализованной обсемененности. Полученные данные свидетельствуют о способности исследуемых соединений предотвращать распространение микроорганизмов из ворот инфекции (рисунки 11.1, 11.2).

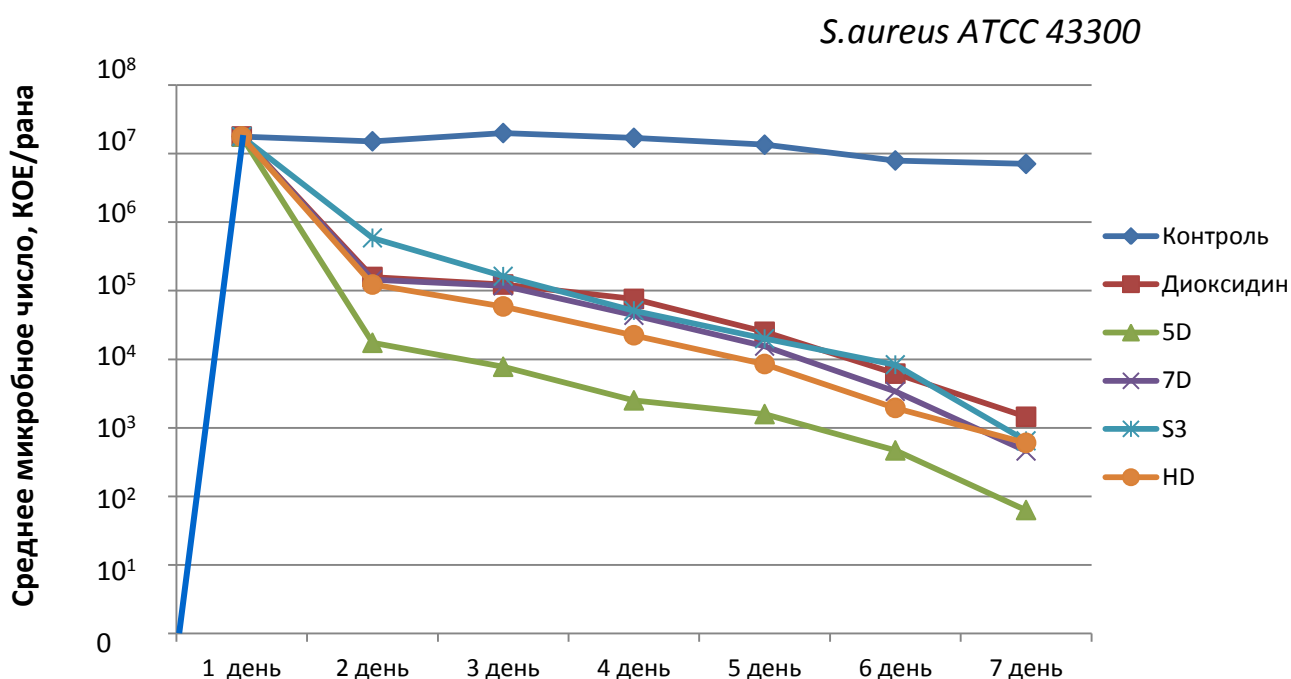


Рисунок 11.2 – Динамика показателей среднего микробного числа в ранах, инфицированных *S. aureus*, на фоне лечения исследуемыми соединениями (метод гомогенизации)

В данном эксперименте эффективность терапии исследуемых соединений сравнивалась непосредственно с терапией препаратом сравнения диоксидином. Как видно из таблиц 11.5 и 11.6 после двух дней терапии средний показатель бактериальной обсемененности ран животных, обработанных диоксидином, составлял $95,1 \pm 0,7 \times 10^4$ КОЕ/рана. Далее наблюдалось изменение показателя роста и размножения бактериальной популяции микроорганизмов ран обработанной

группы, и на шестой день после заражения этот показатель составил $54,6 \pm 0,8 \times 10^2$ КОЕ/рана, и в это время эти раны также начинали быстро заживать.

После инфицирования инокулятом, содержащим *P.aeruginosa*, было обнаружено, что исследуемый микроорганизм также хорошо растет в тканях кожи. В первый день показатель бактериологического роста внутри группы экспериментальных животных ($n=6$) составил $25,3 \pm 1,4 \times 10^5$ КОЕ/рана (таблица 11.11; рисунок 11.3). Через три дня количество микроорганизмов в инфицированных ранах без терапии составляло $81,8 \pm 2,1 \times 10^4$ КОЕ/рана. В последующие дни до седьмого показатели микробного роста оставались примерно на этом же уровне, хотя наблюдалась тенденция к снижению, после чего инфекция постепенно начинала разрешаться, к десятому дню количество бактерий составило $6,3 \pm 2,5 \times 10^3$ КОЕ/рана, а к концу второй недели – $67,5 \pm 1,0 \times 10^2$ КОЕ/рана при макроскопической картине заживления.

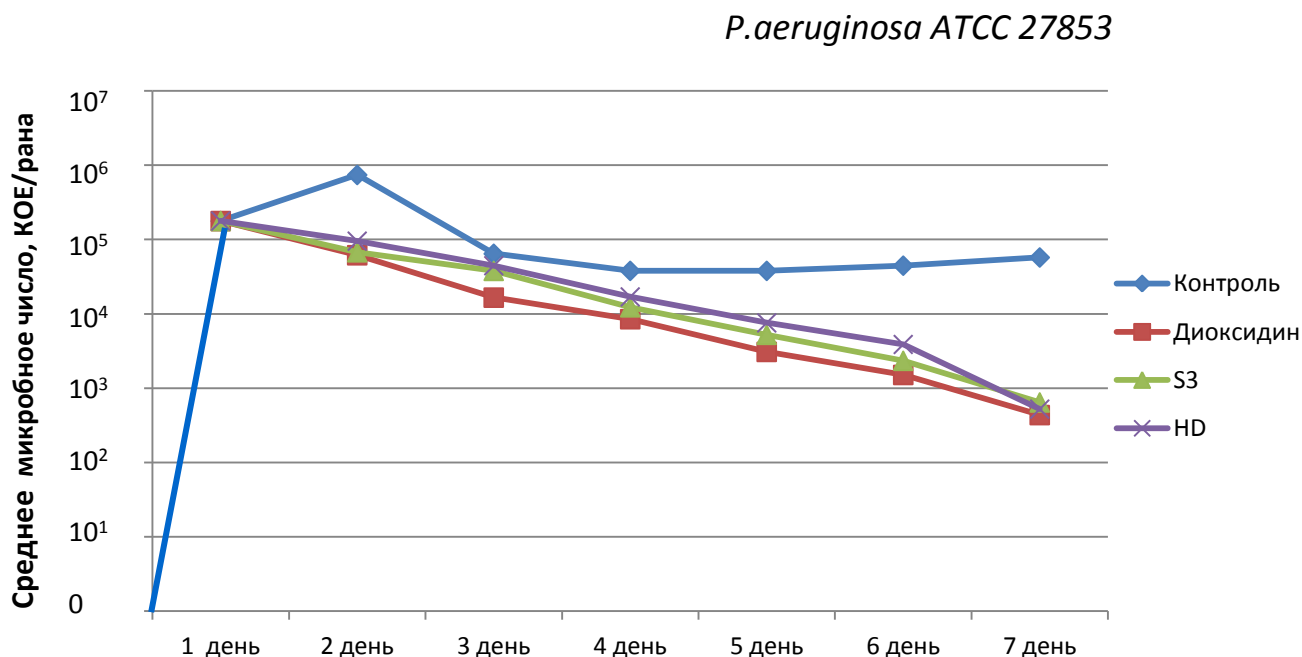


Рисунок 11.3 – Динамика показателей среднего микробного числа в ранах, инфицированных *P.aeruginosa*, на фоне лечения исследуемыми соединениями (метод поверхностных смывов)

Таблица 11.11 – 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($\pm m$)*				
	Контроль	Глицерин	Диоксидин	Амид S3	Циклический амид HD
1	6,4 $\pm$ 1,4	6,37 $\pm$ 1,2	-	-	-
2	6,94 $\pm$ 1,5	6,9 $\pm$ 1,3	5,9 $\pm$ 1,3	5,92 $\pm$ 2,2	5,99 $\pm$ 1,3
3	5,91 $\pm$ 2,1	5,92 $\pm$ 0,9	5,35 $\pm$ 1,3	5,76 $\pm$ 1,2	5,82 $\pm$ 0,9
4	5,78 $\pm$ 3,0	5,73 $\pm$ 2,1	4,97 $\pm$ 2,1	4,98 $\pm$ 0,6	5,38 $\pm$ 2,1
5	5,76 $\pm$ 2,0	5,69 $\pm$ 1,3	4,69 $\pm$ 1,3	4,86 $\pm$ 1,1	4,94 $\pm$ 1,5
6	5,81 $\pm$ 1,0	5,68 $\pm$ 1,5	4,27 $\pm$ 1,5	4,57 $\pm$ 0,7	4,78 $\pm$ 0,7
7	5,88 $\pm$ 1,4	5,73 $\pm$ 1,3	3,81 $\pm$ 0,7	3,91 $\pm$ 2,3	3,86 $\pm$ 2,1
10	4,21 $\pm$ 2,5	4,28 $\pm$ 0,9	-	-	-
14	3,82 $\pm$ 1,0	3,81 $\pm$ 0,7	-	-	-

* – среднее отклонение.

Таблица 11.12 – Динамика показателей среднего микробного числа в ранах, инфицированных *P.aeruginosa*, на фоне лечения исследуемыми соединениями (метод гомогенизации)

День после инфицирования	Среднее значение микробного числа, Log КОЕ/г(±m)*			
	Контроль	Диоксидин	Амид S3	Циклический амид HD
1	6,94±0,5	-	-	-
2	8,38±1,2	5,93±0,5	5,99±1,3	5,98±1,8
3	9,37±2,1	5,84±2,5	5,82±0,9	5,65±1,5
4	8,89±0,9	5,34±0,9	5,38±2,1	4,99±2,1
5	7,98±1,2	4,97±2,1	4,94±1,5	4,87±0,5
6	7,95±0,3	4,89±2,1	4,78±0,7	4,72±1,6
7	7,93±0,5	3,86±0,7	3,86±2,1	3,88±2,0
10	4,98±2,1	-	-	-
14	3,88±1,6	-	-	-

* – среднее отклонение.

Динамика общего количества микроорганизмов, полученная методом гомогенизации, была несколько иной. В первый день показатель бактериологического роста внутри группы экспериментальных животных ($n=6$) составил $87,5 \pm 0,5 \times 10^5$ КОЕ/г (таблица 11.12). Через три дня количество микроорганизмов в инфицированных ранах без терапии достигало пикового значения и составляло $23,5 \pm 2,1 \times 10^8$ КОЕ/рана. В последующие дни до седьмого показатели микробного роста снижались, но оставались на уровне 10^6 КОЕ/г, после чего инфекция постепенно начинала разрешаться к десятому дню. Как ранее упоминалось, это свидетельствует о высокой инвазивной способности исследуемого микроорганизма.

Обработка соединением с лабораторным шифром **S3** два раза в день в течение пяти дней снижала обсемененность экспериментальных ран с $83,8 \pm 2,2 \times 10^4$ КОЕ/рана в начале терапии до $81,7 \pm 2,3 \times 10^2$ КОЕ/рана на седьмой день после инфицирования (таблица 11.11). Раны начинали заживать к концу первой недели, что наблюдалось в контрольной группе экспериментальных животных лишь в конце второй недели после заражения. *P.aeruginosa*, выделенные из ран, не обнаруживали снижения чувствительности к амиду **S3** (МПК 62,5 мкг/мл).

При инфицировании *P.aeruginosa* через 2 дня после заражения и первого дня терапии почти 75 % мышей продемонстрировали отсутствие микроорганизма в печени, почках и селезенке, культуры крови были отрицательными на протяжении всего эксперимента (таблица 11.13). *P.aeruginosa* не выделялась из органов экспериментальных животных начиная с 3 дня после инфицирования. Случаев гибели животных на фоне терапии соединением с лабораторным шифром **S3** не зарегистрировано.

Таблица 11.13 – Локализация микроорганизма во внутренних органах после инфицирования экспериментальных хирургических ран *P.aeruginosa* и последующей терапии соединением с лабораторным шифром S3

День после инфицирования	Количество инфицированных мышей / общее количество животных				Количество погибших животных / общее количество животных
	печень	селезенка	почки	кровь	
1	4/15	2/15	4/15	0/15	0/30
2	2/15	0/15	2/15	0/15	0/30
3	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
4	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
7	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
14	0/15	0/15	0/15	0/15	0/40
21	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
28	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30

Как видно из таблицы 13.11 обработка соединением с лабораторным шифром **HD** два раза в день в течение пяти дней уменьшала среднее количество микроорганизмов экспериментальной раны с $98,1 \pm 1,3 \times 10^4$ КОЕ/рана в начале терапии до $72,3 \pm 2,1 \times 10^2$ КОЕ/рана на седьмой день после инфицирования. С 6-го дня раны начинали естественным образом заживать. *P.aeruginosa*, выделенные из ран, сохраняли исходную чувствительность к циклическому амиду **HD** (МПК 184 мг/л).

При инфицировании *P.aeruginosa* через 2 дня после заражения и первого дня терапии почти 85 % мышей также продемонстрировали отсутствие микроорганизма в печени, почках и селезенке, культуры крови были отрицательными на протяжении всего эксперимента (таблица 11.14). *P.aeruginosa*

не выделялась из органов экспериментальных животных начиная с 3 дня после инфицирования. Случаев гибели животных на фоне терапии соединением с лабораторным шифром **HD** не зарегистрировано.

Таблица 11.14 – Локализация микроорганизма во внутренних органах после инфицирования экспериментальных хирургических ран *P.aeruginosa* и последующей терапии соединением с лабораторным шифром S3

День после инфицирования	Количество инфицированных мышей / общее количество животных				Количество погибших животных / общее количество животных
	печень	селезенка	почки	кровь	
1	4/15	2/15	4/15	0/15	0/30
2	1/15	0/15	2/15	0/15	0/30
3	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
4	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
7	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
14	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
21	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30
28	0/15	0/15	0/15	0/15	0/30

В данном эксперименте эффективность терапии исследуемых соединений также сравнивалась непосредственно с терапией препаратом сравнения диоксидином. Как видно из таблицы 11.11 после двух дней терапии средний показатель бактериальной обсемененности ран животных, обработанных диоксидином, составлял $22,6 \pm 1,3 \times 10^4$ КОЕ/рана. После окончания терапии исследуемый показатель составлял $18,6 \pm 1,5 \times 10^3$ КОЕ/рана. С этого момента раны начинали быстро заживать.

Бактериологическая картина ран экспериментальных животных, полученная при исследовании методом гомогенизации, отражала динамику накопления и распространения микроорганизмов, полученную методом поверхностных смывов (таблицы 11.11, 11.12). Поверхностно-локализованная обсемененность ран экспериментальных животных была конгруэнтна тканево-локализованной обсемененности (рисунки 11.3, 11.4). Полученные данные свидетельствуют о способности исследуемых соединений предотвращать распространение микроорганизмов из ворот инфекции.

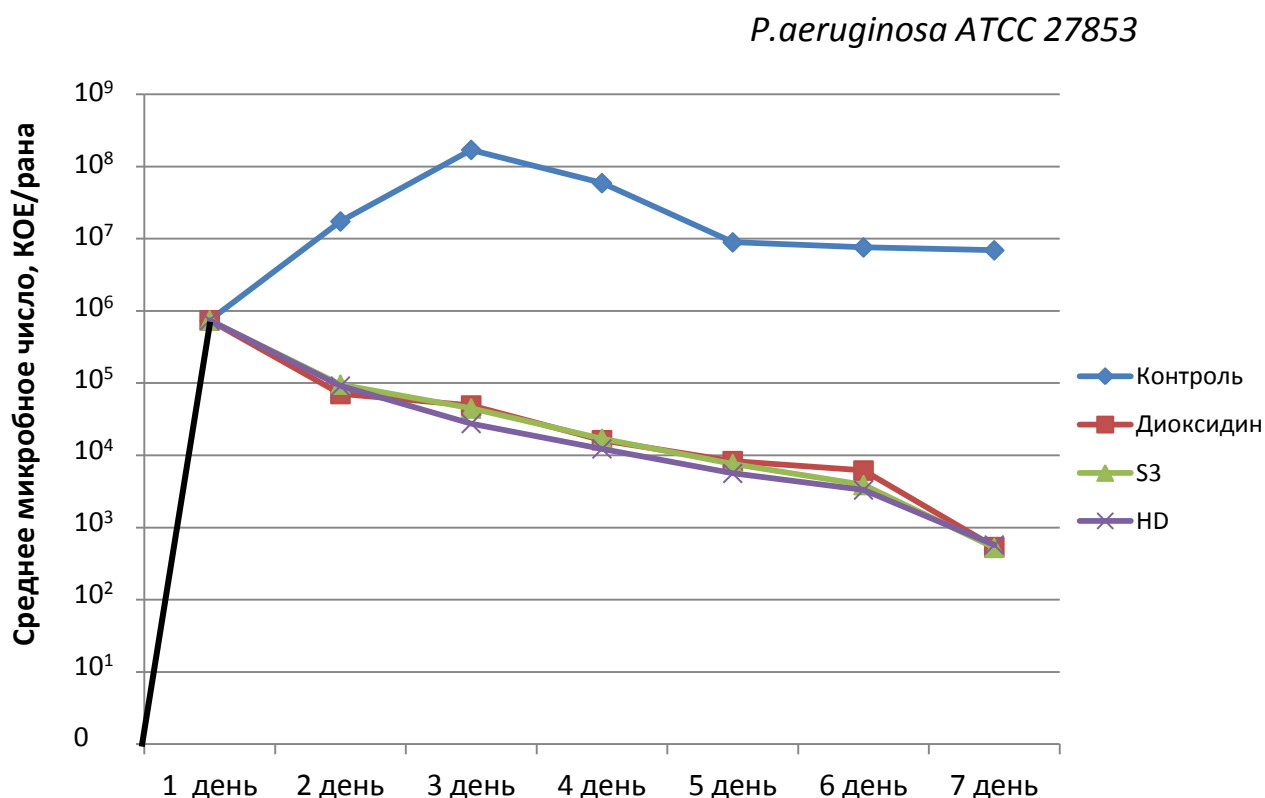


Рисунок 11.4 – Динамика показателей среднего микробного числа в ранах, инфицированных *P.aeruginosa*, на фоне лечения исследуемыми соединениями (метод гомогенизации)

Представленные исследования 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.

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. 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 [85; 95].

Эффективность исследуемых 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успешное использование противомикробных лекарственных средств для ингибирования и ликвидации инфекционных организмов сталкивается с определенными трудностями, поскольку микробные патогены развивают различные формы резистентности к лекарственным средствам. Использование антимикробных препаратов расширяется и, соответственно, увеличивается уровень и сложность резистентности. Возникновение резистентности к нескольким противомикробным агентам в микробных патогенах стало ведущей проблемой современного здравоохранения, поскольку существенно ограничивает (а, зачастую, нивелирует) количество доступных и эффективных противомикробных средств для лечения инфекций, вызванных этими патогенами.

Микробные патогены могут проявлять устойчивость к противомикробным агентам с помощью различных механизмов, таких как возникновение мутаций, селекция или получение резистентных генов от других микробиологических патогенов. Пациенты, инфицированные резистентными патогенами, часто страдают от неэффективного лечения, которое обычно имеет неблагоприятный исход, особенно в случае инфекционных процессов с тяжелым течением [406; 458; 49; 160; 135; 136; 387; 109].

В настоящее время наиболее широко используемые противомикробные агенты подвержены резистентности, и даже некоторые новые агенты сталкиваются с одной и той же проблемой. Преодоление резистентности обычно достигалось путем обнаружения новых природных противомикробных агентов или использованием производных, полученных синтетическим или полусинтетическим методами, которые не подвержены существующим механизмам устойчивости. В этой связи, поиск новых эффективных и безопасных соединений, понимание механизма действия препаратов и идентификация механизмов сопротивления микроорганизмов, проблемы, с которыми сталкивается химиотерапия инфекционных заболеваний, и способы решения этих

проблем, не только не теряют, но и приобретают все большую актуальность и в 21 веке [340; 50; 49; 519; 160; 135; 136; 399; 109].

Все противомикробные средства, используемые в настоящее время, можно разделить на две группы: препараты, применимые для устранения микроорганизмов вне организма человека, в окружающей среде (дезинфектанты и консерванты) и химиотерапевтические препараты, используемые для устранения микроорганизмов на поверхностях и в организме человека (антисептики и антибиотики).

В настоящее время доступно множество различных видов противомикробных препаратов (синтетических, полусинтетических, природных), которые служат различным целям в медицинских, ветеринарных, фармацевтических и других областях.

В ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва» и ФГБОУ ВО «МГПИ им. Е.Е. Евсевьева» на протяжении 30 лет проводятся научные исследования по разработке методов синтеза и получения трициклических азотосодержащих гетероциклов – пирролохинолонов. Многие используемые в медицине, асептике и дезинфектологии противомикробные препараты представляют собой гетероциклические соединения. И учитывая, что исследуемые соединения являются синтетическими аналогами пирролохинолинхинона, кофермента PQQ, витамина B₁₄, являющегося коферментом в окислительно-восстановительных реакциях в организме млекопитающих, обоснование противомикробной активности упомянутых соединений, является чрезвычайно актуальной научной проблемой, поскольку позволит предложить новый класс эффективных химиотерапевтических лекарственных средств.

В связи с этим, мы сформулировали основную цель настоящего исследования – получение и изучение новой группы соединений, способных оказывать неблагоприятное воздействие на прокариотические микроорганизмы и возможность использования выявленной противомикробной активности индоламинов и пирролохинолонов, полученных на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов, в терапии инфекционных процессов и заболеваний.

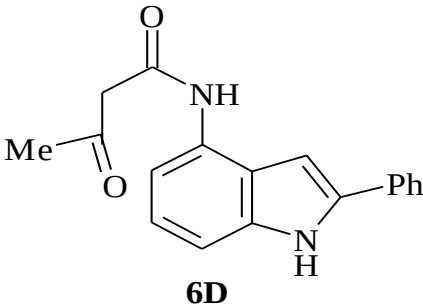
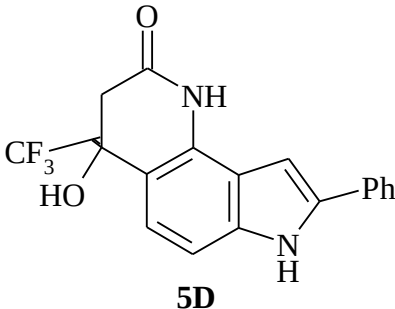
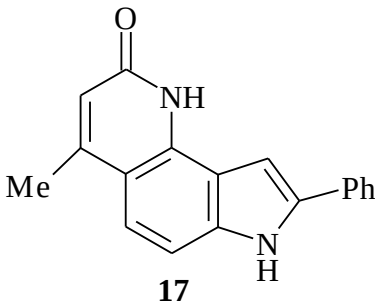
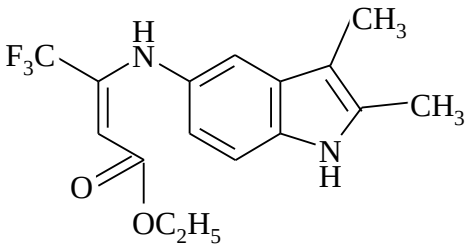
На химико-технологическом этапе исследования были разработаны методы получения и синтезированы 16 производных аминокиндолов и 32 производных индоламинов, енаминов и пиррохинолонов. Проведена оценка чистоты полученных субстанций.

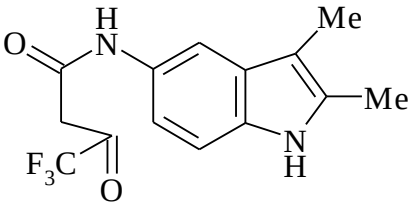
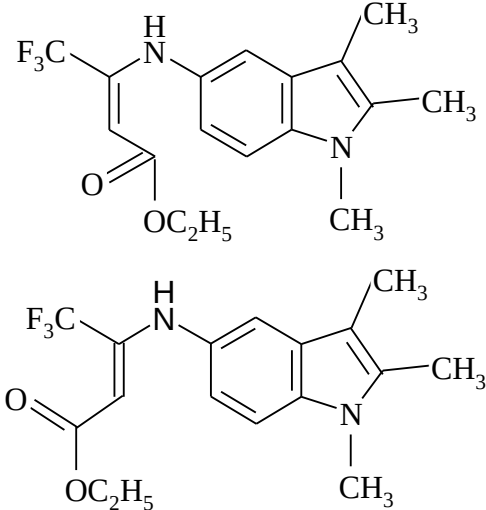
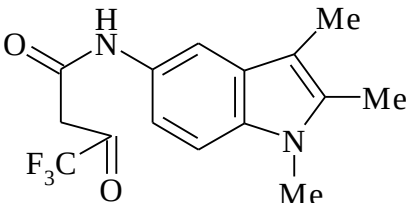
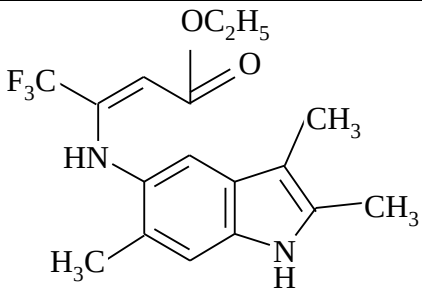
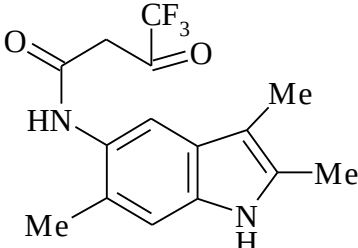
Поскольку в современной фармакологической науке доминируют подходы к разработке и отбору биологически активных молекул, основанные на многоэтапном процессе, одним из элементов которого является фармакологический скрининг, для снижения экономических затрат, гуманизации научных исследований с использованием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

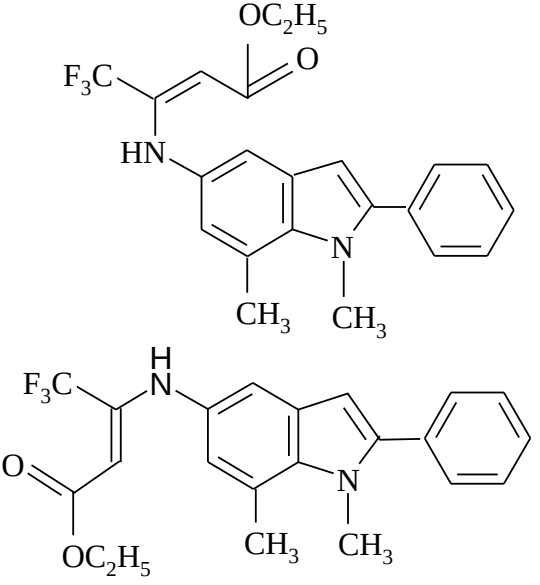
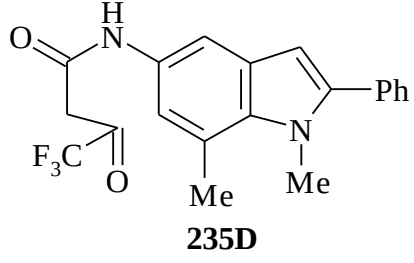
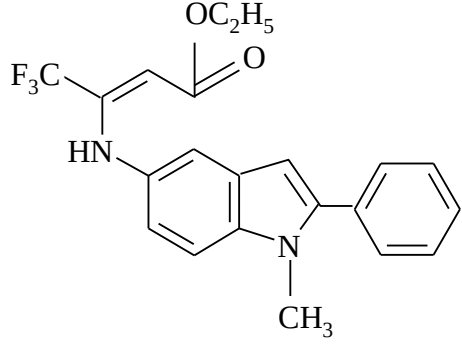
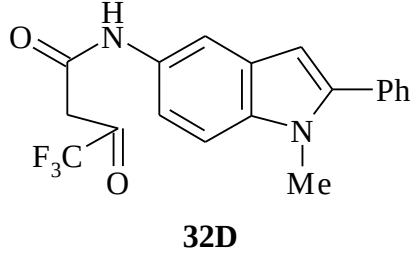
В настоящее время усилиями отечественных и зарубежных ученых создана компьютерная система прогнозирования биологической активности веществ PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) на основе анализа так называемых обучающих выборок, содержащих десятки тысяч молекул органических веществ различных химических классов, проявляющих множество видов биологической активности [145; 146; 495]. В своей работе мы использовали версию 9.1, зарегистрированную в 2007 году.

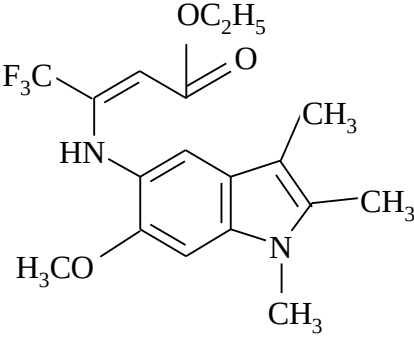
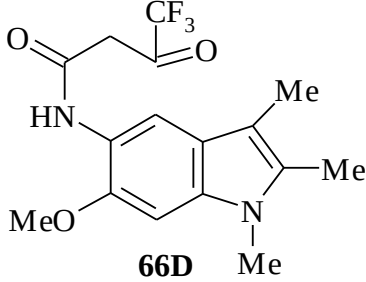
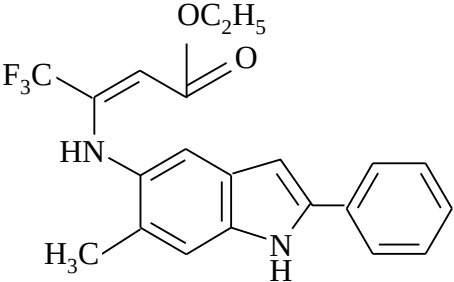
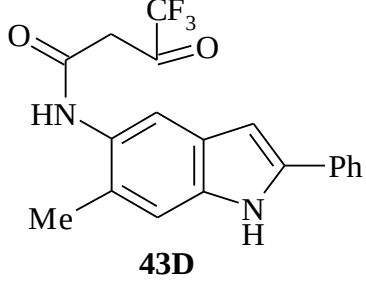
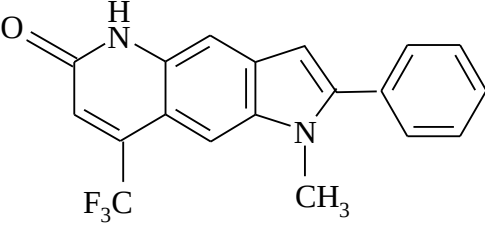
Для каждого из производных индолиламинов, енаминов и пиррохинолонов был рассчитан прогноз потенциальной фармакологической активности и токсичности. Прогноз наличия (Pa) или отсутствия (Pi) активности в ряду исследуемых замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминокиндолов являлся отправной точкой для последующих лабораторно-экспериментальных этапов нашей работы. Для экспериментального изучения были отобраны вещества с вероятностью наличия противомикробной активности в фармакологическом спектре более 50%, т.е. Pa более 0,500 вне зависимости от вероятности и прогнозной степени токсичности. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1.

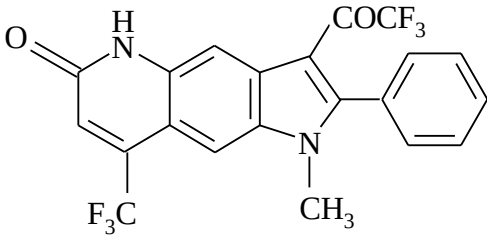
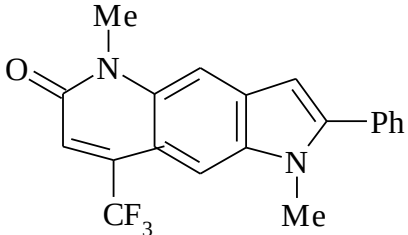
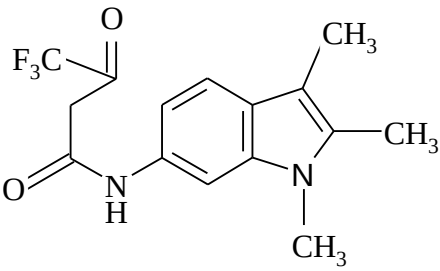
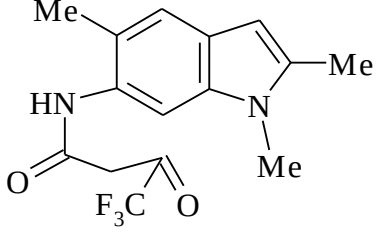
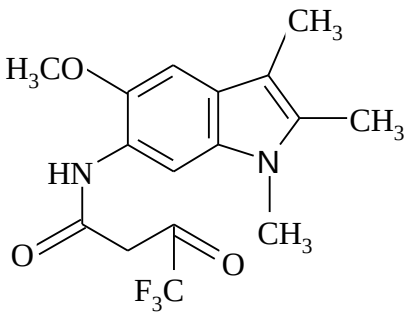
Таблица 1 – Неэкспериментальный прогноз противомикробной активности в рядах замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов

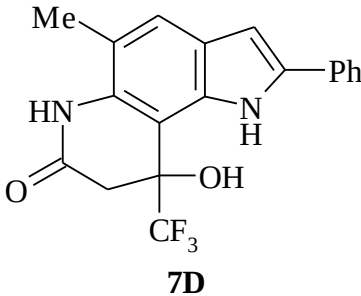
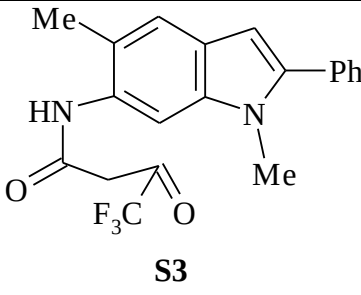
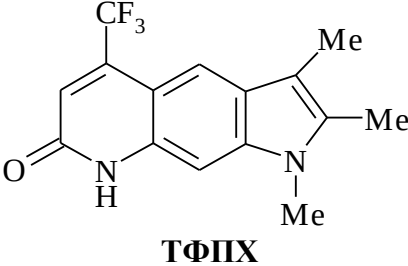
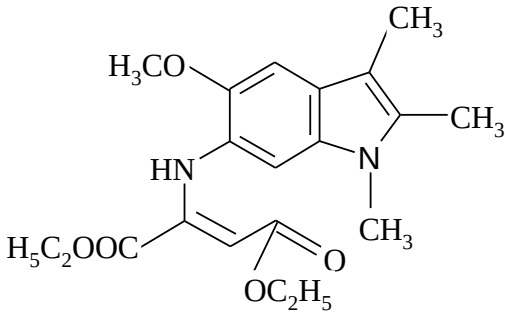
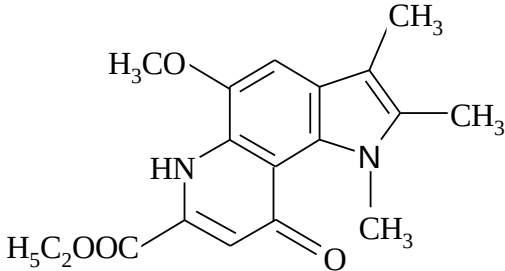
Соединение	Структурная формула	<i>Pa</i>
1	2	3
3-Оксо- <i>N</i> -(2-фенил-1 <i>H</i> -индол-4-ил)бутанамид (16-6D)	 6D	0,572
4-Гидрокси-8-фенил-4-(трифторметил)-1,3,4,7-тетрагидро-2 <i>H</i> -пирроло[2,3- <i>h</i>]-хинолин-2-он (18-5D)	 5D	0,832
4-Метил-8-фенил-1,7-дигидро-2 <i>H</i> -пирроло[2,3- <i>h</i>]-хинолин-2-он (17-17)	 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

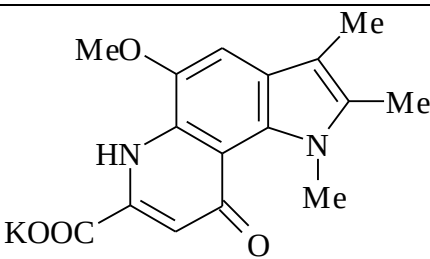
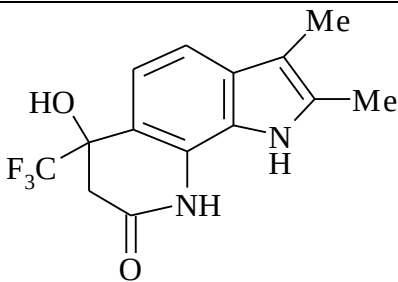
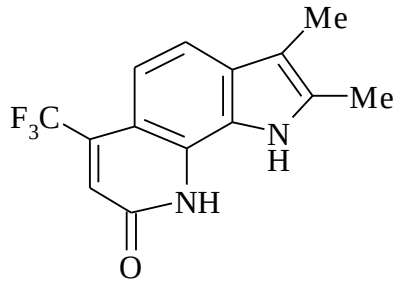
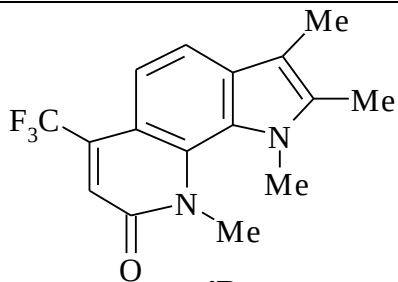
1	2	3
<i>N</i> -(2,3-диметил-1 <i>H</i> -индол-5-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (2c) (19-3D)	 3D	0,624
Этиловый эфир (<i>E,Z</i>)-4,4,4-трифтор-3-[(1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индолил-5)-амино]-2-бутеновой кислоты (1d)		0,452
4,4,4-трифтор-3-оксо- <i>N</i> -(1,2,3-триметил-1 <i>H</i> -индол-5-ил)бутанамид (2d) (20-2D)	 2D	0,553
Этиловый эфир (<i>Z</i>)-4,4,4-трифтор-3-[(2,3,6-триметил-1 <i>H</i> -индолил-5)-амино]-2-бутеновой кислоты (1e)		0,418
4,4,4-трифтор-3-оксо- <i>N</i> -(2,3,6-триметил-1 <i>H</i> -индол-5-ил)бутанамид (2e) (21-64D)	 64D	0,508

1	2	3
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 (1g)		0,409
<i>N</i>-(1,7-диметил-2-фенил-1<i>H</i>-индол-5-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (2g) (24-235D)	 235D	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 (1h)		0,335
<i>N</i>-(1-метил-2-фенил-1<i>H</i>-индол-5-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутанамид (2h) (22-32D)	 32D	0,536

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

1	2	3
1-метил-2-фенил-3-трифторацетил-8-(трифторметил)-1,5-дигидро-6 <i>H</i> -пирроло-[2,3- <i>g</i>]хинолин-6-он (2l)		0,374
1,5-Диметил-2-фенил-8-(трифторметил)-1,5-дигидро-6 <i>H</i> -пирроло-[2,3- <i>g</i>]хинолин-6-он (26-39D)	 39D	0,576
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 (27-243D)	 243D	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

1	2	3
9-Гидрокси-5-метил-2-фенил-9-(трифторметил)-1,6,8,9-тетрагидро-пирроло-[2,3- <i>f</i>]хинолин-7-он (30-7D)	 7D	0,851
<i>N</i> -(1,5-диметил-2-фенил-1 <i>H</i> -индол-6-ил)-4,4,4-трифтор-3-оксобутан-амид (28-S3)	 S3	0,909
1,2,3-Триметил-5-(трифторметил)-1,8-дигидро-7 <i>H</i> -пирроло[3,2- <i>g</i>]хи-нолин-7-он (29-ТФПХ)	 ТФПХ	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> -пир-роло[2,3- <i>f</i>]хинолин-9-он		0,056

1	2	3
Калиевая соль 7-гидроксикарбонил-1,2,3,-триметил-5-метокси-1 <i>H</i> -пирроло[2,3- <i>f</i>]хинолин-9-она (31-КПХ)	 КПХ	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 (32-HD)	 HD	0,817
2,3-Диметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8 <i>H</i> -пирроло[3,2- <i>h</i>]хинолин-8-он (34-1D)	 1D	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 (36-4D)	 4D	0,926

По результатам внеэкспериментального скрининга для последующих исследований на экспериментально-микробиологических и фармакологических этапах работы были отобраны вещества с лабораторными шифрами соединения **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.

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 внутрибрюшинном, внутривенном 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 ЛД₅₀, определенному у мышей и крыс при указанных путях введения (поступления) действующего вещества в организм животного.

В результате исследования представленной группы соединений мы установили следующее. Из подгруппы веществ, полученных на основе замещенного 4-амино-фенилиндола, соединение с лабораторным шифром **5D** (циклический амид), является наиболее активным (таблица 2). 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 (таблица 3). 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 ЛД₅₀ 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 внутривентрикулярном 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 высоких концентрация (от 250 мкг/мл). В то же время, соединение **39D** малоактивно 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 внутривентрикулярном введении мышам наблюдали закономерный рост показателя ЛД₅₀ 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 лабораторным шифром **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*. Циклический амид **7D** 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	МПК для <i>S.aureus</i> 29213 (мкг/мл)	МПК для <i>S.pyogenes</i> 1238 (мкг/мл)	МПК для <i>E.coli</i> 25922 (мкг/мл)	МПК для <i>B.cereus</i> 96 (мкг/мл)	МПК для <i>P.aeruginosa</i> 27853 (мкг/мл)
1	6 D	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 250
2	17	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 250
3	5 D	7,8	31,25	125	62,5	≤ 250
4	3 D	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 250
5	2 D	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 250
6	64 D	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 250
7	32 D	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 250
8	43 D	125	62,5	≤ 250	125	≤ 250
9	243 D	125	125	≤ 250	250	≤ 250
10	235 D	125	62,5	250	62,5	250
11	66 D	125	125	≤ 250	250	≤ 250
12	39 D	31,25	31,25	250	125	≤ 250
13	S 3	62,5	250	31,25	250	62,5
14	7 D	125	250	62,5	62,5	≤ 250
15	HD	59	117	108	117	184
16	1 D	≤ 250	125	≤ 250	125	≤ 250
17	4 D	125	125	125	125	≤ 250
18	КПХ	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 250
19	ТФПХ	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 250	≤ 250

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

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

При внутрибрюшинном введении соединения с лабораторным шифром **S3** и соединения с лабораторным шифром **7D** проявляли свойства умеренно токсичного вещества, тогда как при внутривентральном 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 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-8H-пирроло[3,2-*h*]хинолина-8-она (**HD**) и 1,2,3,9-тетраметил-6-(трифторметил)-1,9-дигидро-8H-пирроло[3,2-*h*]хинолин-8-он (**4D**). Как и амид **S3** и вещество **7D** исследуемые вещества проявили умеренные токсические свойства при внутрибрюшинном введении. При этом токсичность при внутривентральном введении и накожном способе нанесения для крыс определить не удалось по объективным причинам.

Полученные результаты изучения острой токсичности, в частности, невозможность установить показатель ЛД₅₀ 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 ЛД₅₀ (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.

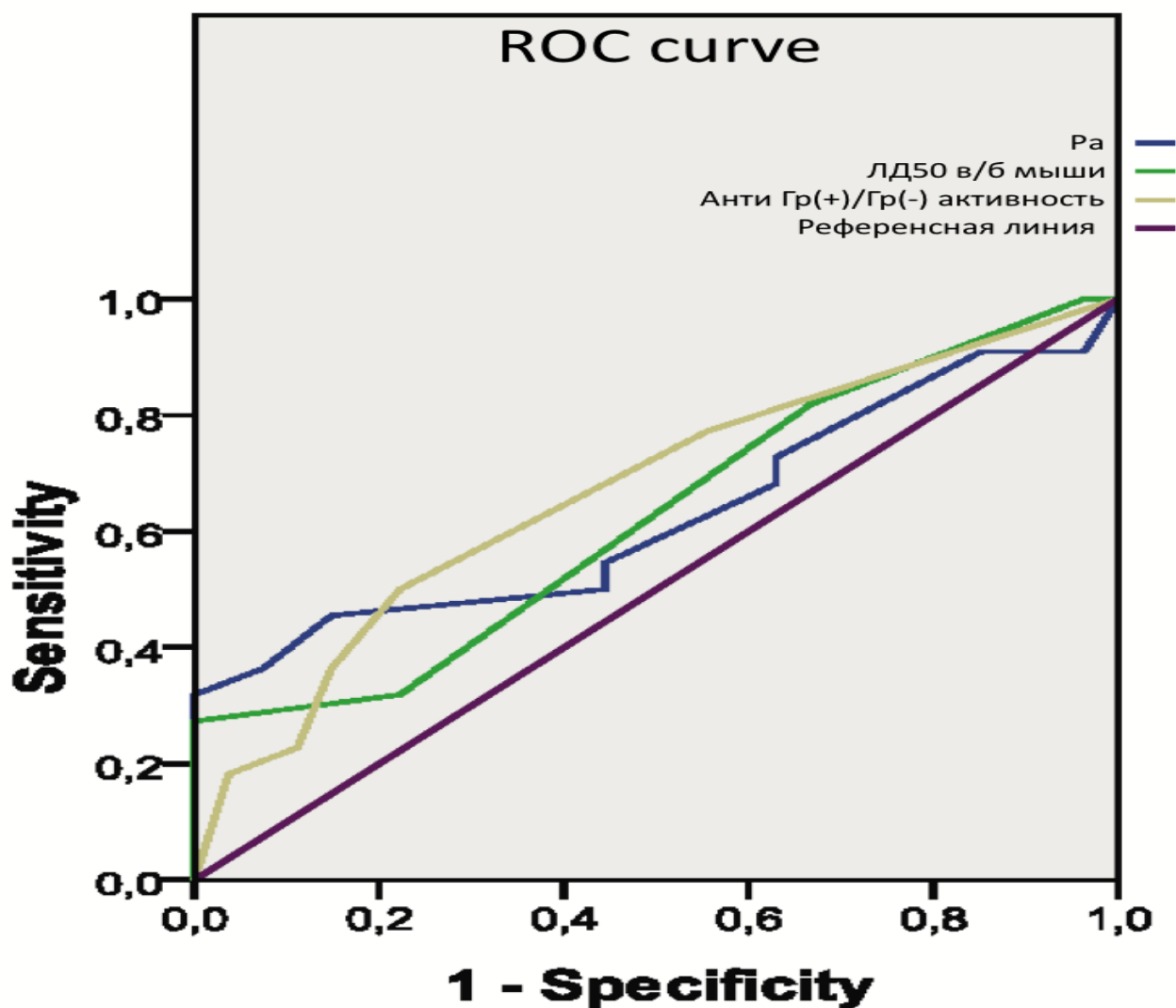


Рисунок 1 – ROC-кривые для изученных показателей активности соединений

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 ₅₀ при внутрибрюшинном 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 – среднеквадратичное 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**.

Наряду с этим, при исследовании зависимости биологической активности индолиламинов, 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.

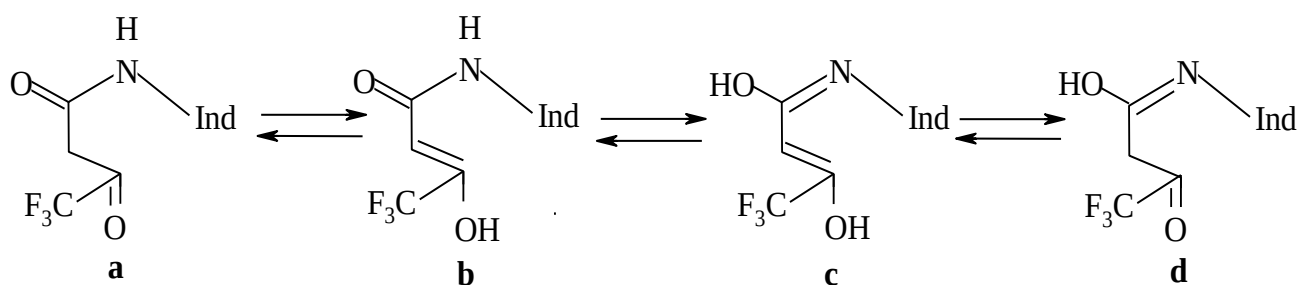
Противомикробная активность, полученных и изученных производных индола и пирролохинолина, из анализа результатов наших исследований и литературных данных обусловлена боковой цепью молекул.

Обнаружено, что противомикробной активностью обладают *N*-индолиламины, полученные из 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов и трифторацетоуксусного эфира, имеющие трифторметильный заместитель в амидной части молекулы (**5D**, **HD**, **235D**, **43D**, **S3**, **7D**).

Обнаруженная активность *N*-индолилтрифторацетоацетиламидов 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.

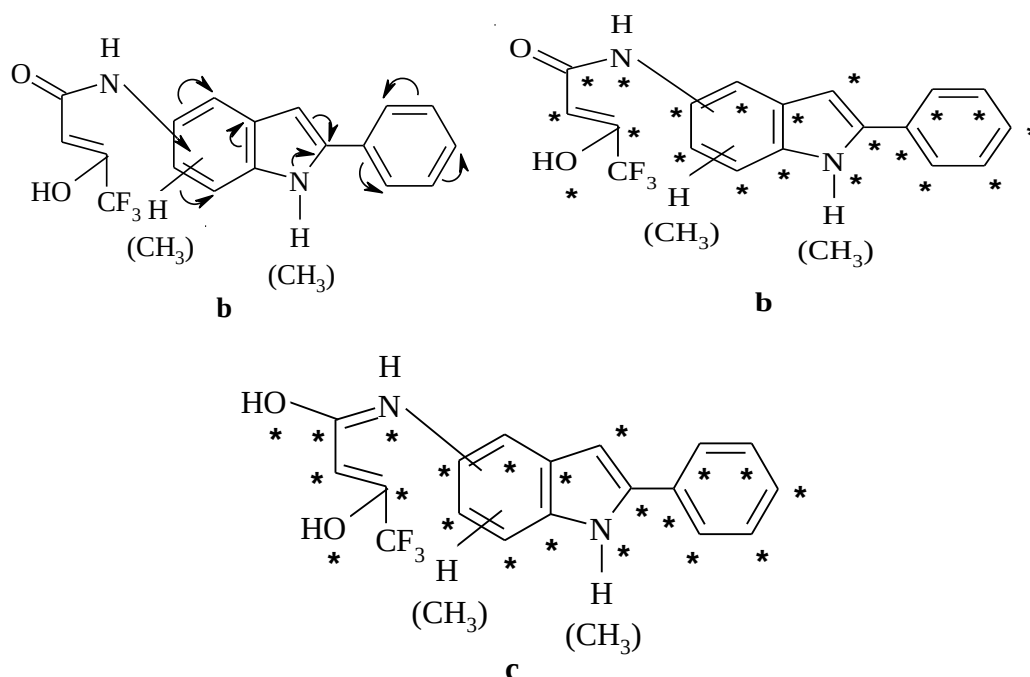
Спектрами ЯМР¹H установлено в растворе ДМСО (димексид) индолиламины нециклического строения образуют равновесную систему, состоящую из четырех возможных таутомеров: **a**, **b**, **c**, **d**.



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

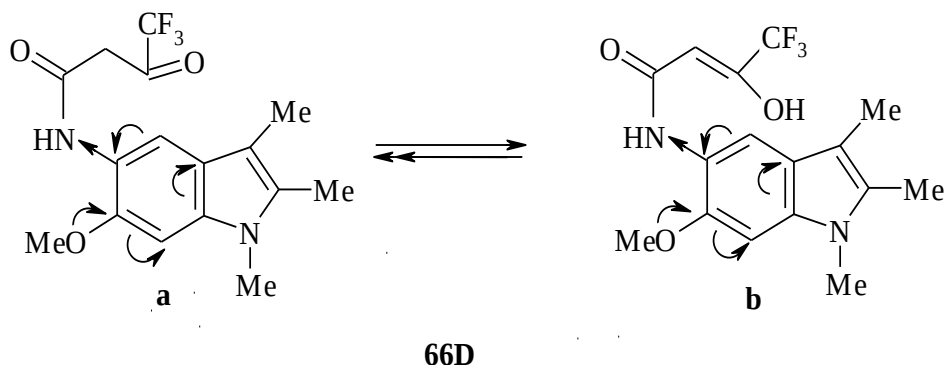
дестабилизирующим фактором для существования амидного фрагмента в **b** форме является электронно-донорное влияние замещенного индолильного радикала, причем это влияние больше в индолил-5-амидах, чем в амидах, на основе замещенных 6-аминоиндолов. Действительно более высокую активность в этом ряду показывают амиды на основе замещенных 6-аминоиндолов **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 5-, так и для 6-индолиламинов противомикробная активность усиливается с введением в α -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-CH₃.



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

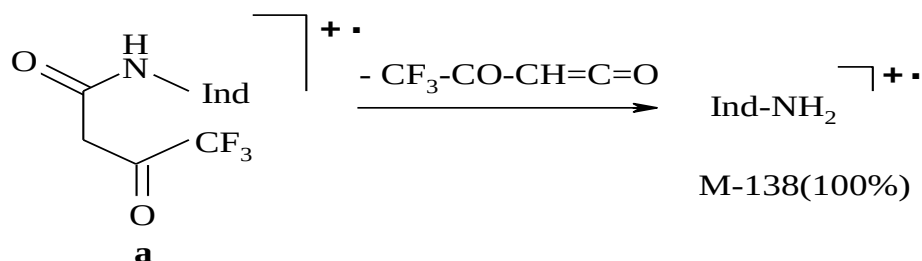
Исходя из изложенного, по-видимому, основная роль группы CF₃ в молекулах нециклических амидов как сильного акцепторного заместителя, способствующего енолизации трифторацетильной функции. Однако нельзя исключать противомикробный эффект соединений из-за наличия фторсодержащего заместителя как фторвысвобождающего. Так, противомикробная активность трифторметилпирролохинолонов в отличие от пирролохинолонов без заместителя CF₃ можно объяснить только этим.

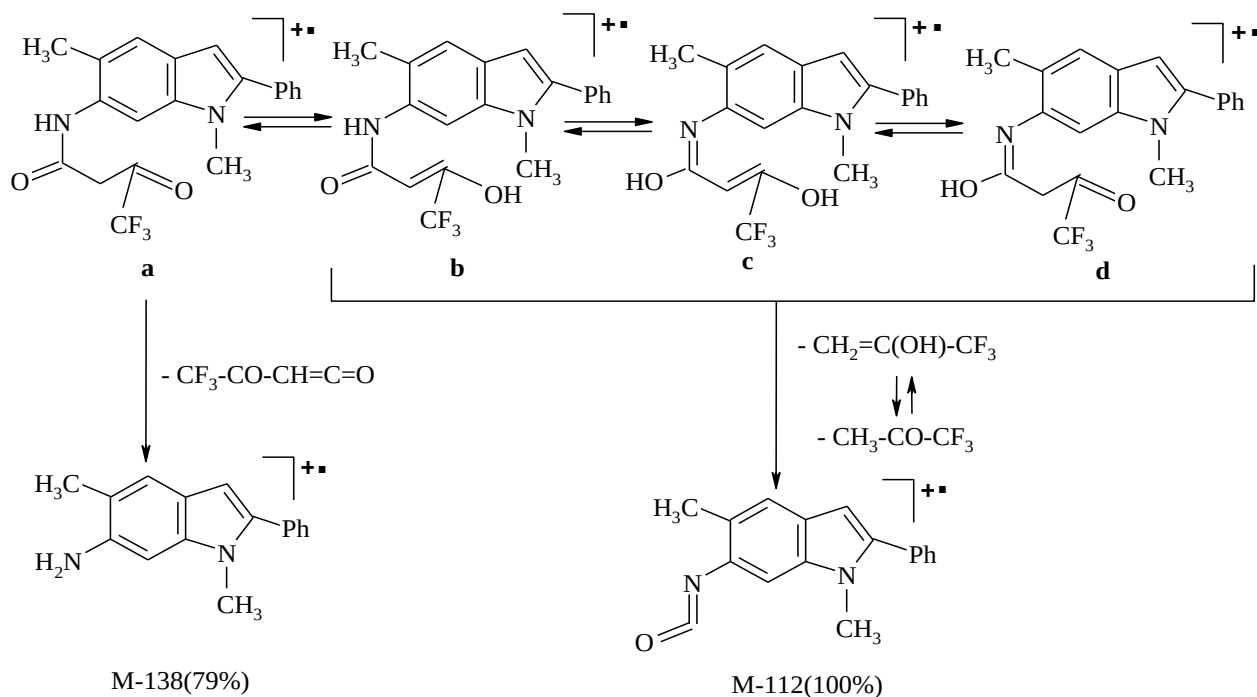
Замена трифторметильной группы в пирролохинолоне на калийкарбоксильную приводит (в случае, с **КПХ**) к изменению активности на стимулирующую.

У соединений без трифторметильной группы противомикробная активность не обнаружена.

Таким образом, трифторметилзамещенные индолиламидамы и пирролохинолины 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 ^1H в ДМСО- d_6 , где помимо сигнала протонов группы 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 индолиламидов. 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 по разработанным нами методикам с хорошими выходами и высокой степенью чистоты.

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.

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.

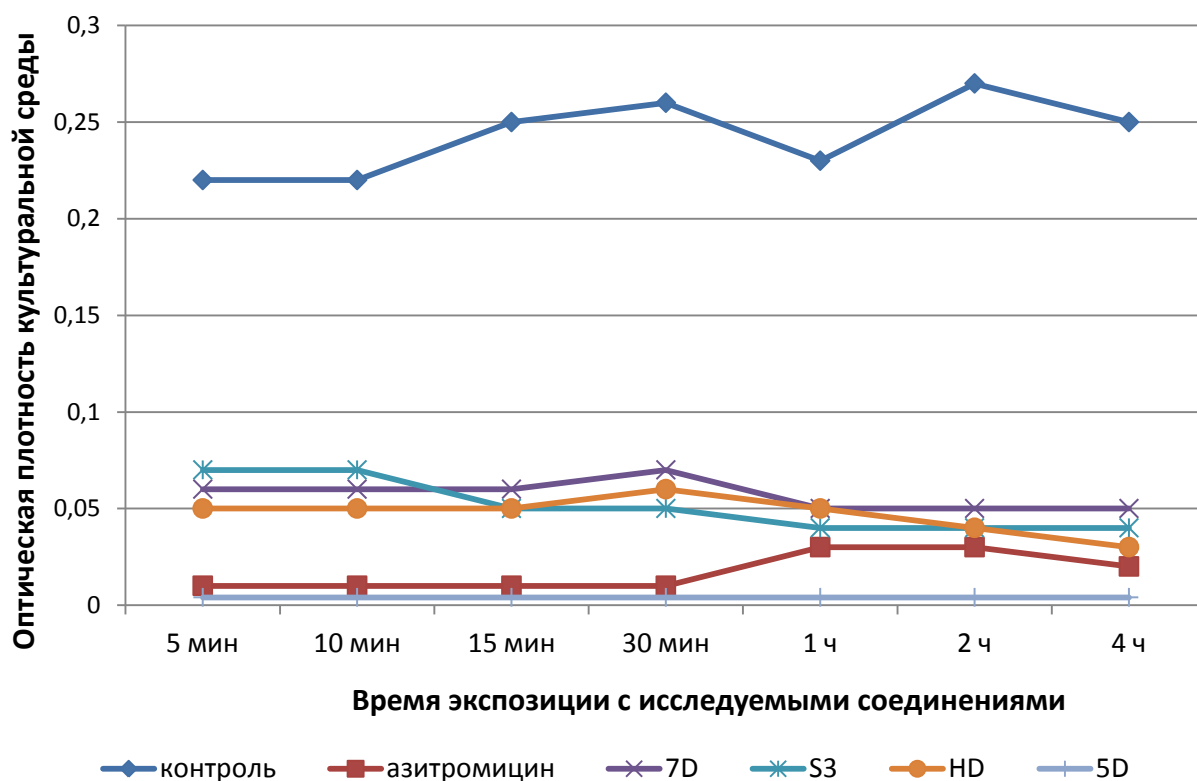


Рисунок 2 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus* ATCC 6538-*P* после экспозиций с исследуемыми соединениями и культивировании в течение 24 часов

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

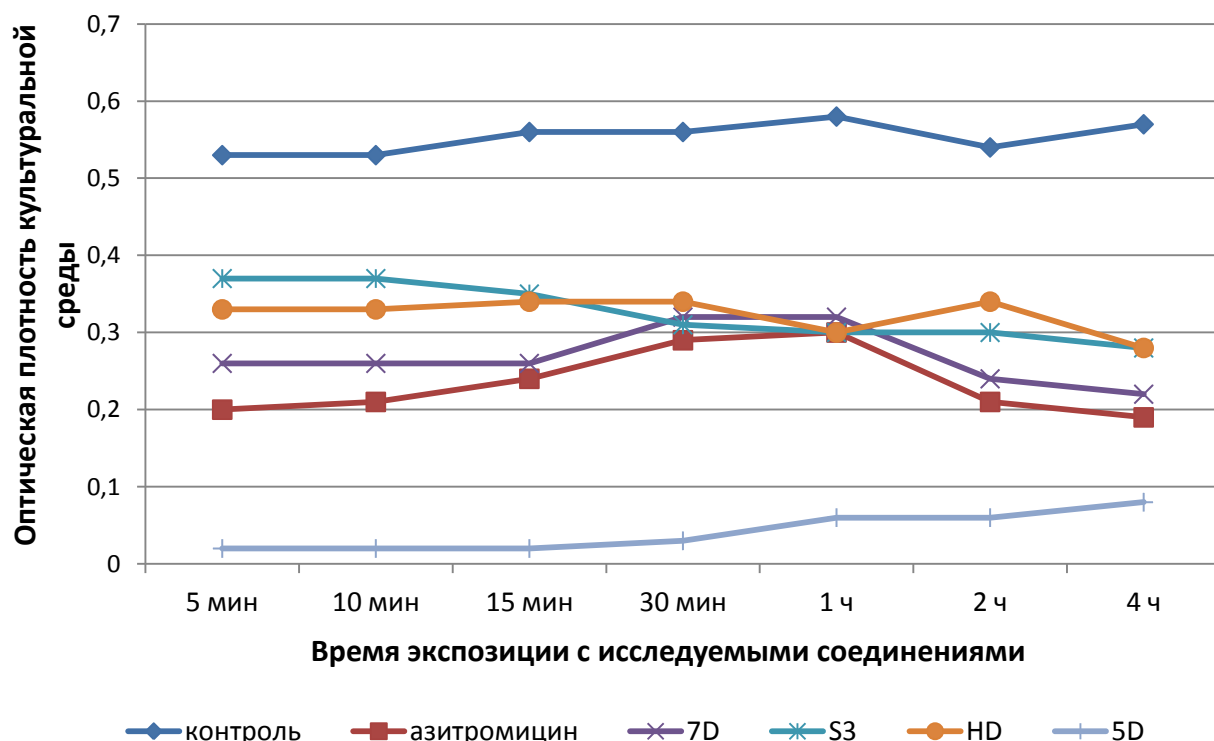


Рисунок 3 – Оптическая плотность культуральной среды со *S.aureus* ATCC 6538-*P* после экспозиций с исследуемыми соединениями и культивировании в течение 110 часов

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-Р обнуляется по показателям оптической плотности исследуемого соединения. Определяется оптическая плотность культуральной среды в присутствии штамма бактерий *Staphylococcus aureus* 6538-Р, 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.

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⁺-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

ДНК-повреждающего действия 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 ДНК-повреждающее действие, в бактериостатических концентрациях, вышеуказанные соединения, возможно, имеют дополнительный механизм, не сопровождающийся образованием разрывов ДНК.

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).

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($\pm m$)*					
	Контроль	Диоксидин	Циклический амид 5 D	Амид S3	Циклический амид 7D	Циклический амид HD
1	7,15 $\pm$ 1,4	-	-	-	-	-
2	7,68 $\pm$ 1,5	6,66 $\pm$ 1,6	5,37 $\pm$ 0,7	6,19 $\pm$ 1,3	6,85 $\pm$ 0,8	5,99 $\pm$ 1,3
3	7,92 $\pm$ 2,1	5,98 $\pm$ 0,7	4,94 $\pm$ 1,6	5,98 $\pm$ 2,0	6,03 $\pm$ 2,2	5,82 $\pm$ 0,9
4	7,89 $\pm$ 3,0	5,87 $\pm$ 1,3	4,52 $\pm$ 1,6	5,75 $\pm$ 0,9	5,83 $\pm$ 1,4	5,38 $\pm$ 2,1
5	7,86 $\pm$ 2,0	4,85 $\pm$ 0,5	4,26 $\pm$ 2,1	4,93 $\pm$ 1,5	5,32 $\pm$ 2,4	4,94 $\pm$ 1,5
6	7,82 $\pm$ 1,0	4,41 $\pm$ 2,1	3,74 $\pm$ 0,8	4,54 $\pm$ 0,5	4,93 $\pm$ 0,9	4,21 $\pm$ 1,3
7	7,75 $\pm$ 1,4	3,79 $\pm$ 1,3	2,87 $\pm$ 0,5	3,75 $\pm$ 1,3	3,88 $\pm$ 0,5	3,86 $\pm$ 2,1
10	5,43 $\pm$ 0,4	-	-	-	-	-
14	2,93 $\pm$ 2,4	-	-	-	-	-

* – среднее отклонение.

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).

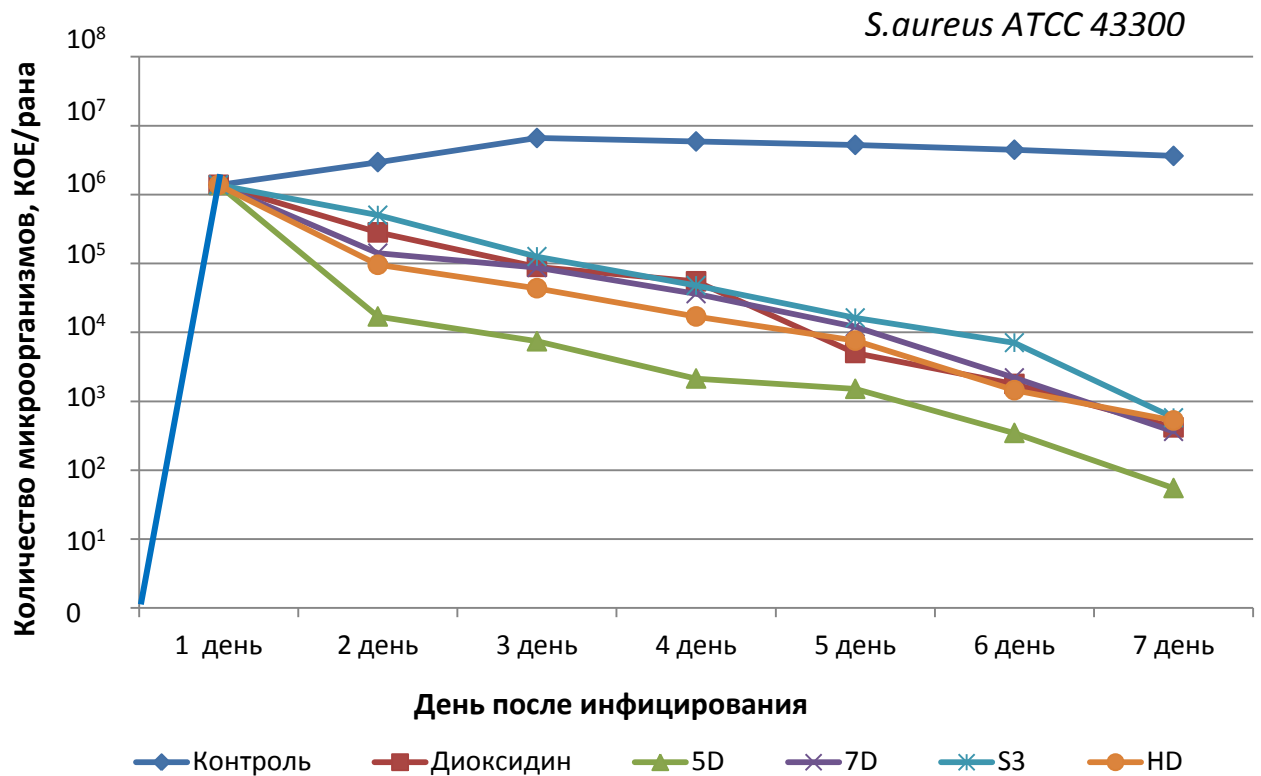


Рисунок 4 – Количественные показатели микроорганизмов в инфицированных ранах в процессе формирования экспериментальных хирургических ран, инфицированных *S.aureus* (метод поверхностных смывов)

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 S3	Циклический амид HD
1	2	3	4	5
1	6,4±1,4	-	-	-
2	6,94±1,5	5,9±1,3	5,92±2,2	5,99±1,3

1	2	3	4	5
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.

Исследуемые соединения эффективно препятствовали распространению микроорганизмов в подлежащие ткани и генерализации инфекционного процесса.

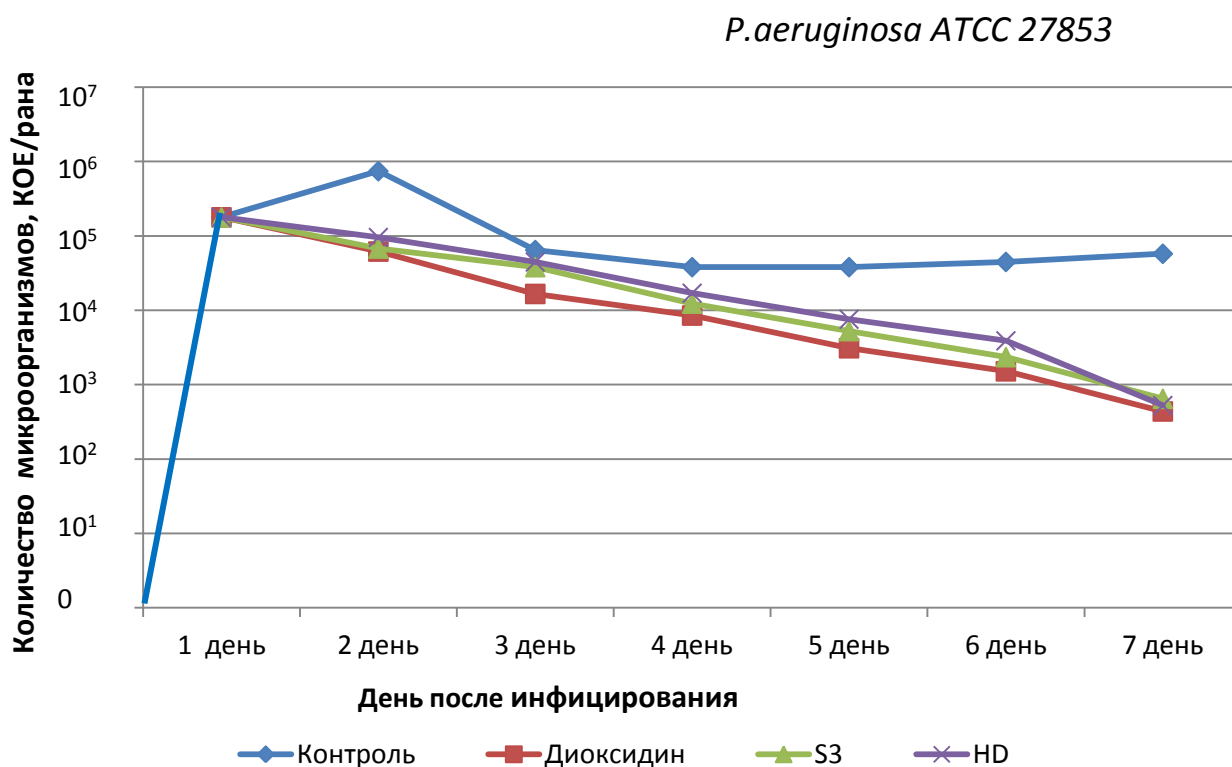


Рисунок 5 – Количественные показатели микроорганизмов в инфицированных ранах в процессе формирования экспериментальных хирургических ран, инфицированных *P.aeruginosa* (метод поверхностных смывов)

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 исследуемых 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.

ИТОГИ ВЫПОЛНЕНИЯ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Настоящее исследование было посвящено разработке и получению нового класса синтетических лекарственных средств, на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов, способных оказывать противомикробное действие на прокариотические микроорганизмы и научно-практическому обоснованию безопасного использования выявленной противомикробной активности индолиламинов и пирролохинолонов для повышения эффективности противомикробной химиотерапии.

На химико-технологическом этапе исследования были разработаны методы получения и синтезированы 16 аминоиндолов и 32 производных аминоиндолов – индоламинов, енаминов и пиррохинолонов.

С помощью компьютерной системы 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 произведен отбор 19 потенциально активных соединений.

Выявлено, что отобранная серия индолиламинов и пирролохинолонов на основе замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов способна оказывать противомикробное действие на тест-штаммы изученных условно-патогенных и некоторых патогенных прокариотических микроорганизмов и опытные штаммы условно-патогенных и некоторых патогенных микроорганизмов, представителей семейств *Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, что позволяет характеризовать ее как группу новых абиотических химических факторов.

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 внутрибрюшинном, внутрижелудочном введении и накожном нанесении. В результате исследования представленной группы соединений мы установили следующее, что 6 соединений на основе замещенных 4-, 6-, 7-аминоиндолов являются потенциальными противомикробными агентами – это циклические амиды **5D**, **7D**, **HD**, нециклический амид **S3** и пирролохинолоны **39D**, **4D**. Были показаны преимущества исследуемых соединений по сравнению с традиционно применяемыми антимикробными препаратами на примере антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов.

Наряду с этим, при исследовании зависимости биологической активности индолиламидов, енаминокетонов, пирролохинолинов 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. Было показано, что противомикробная активность соединений, на основе замещенных 4-,5-,6-,7-аминоиндолов, зависит от структуры молекулы и характера заместителей в исследуемых индолиламидах и пирролохинолонах.

Для дальнейшего углубленного изучения спектра противомикробной активности, механизмов антимикробного действия, эффективности на моделях экспериментальных инфекций в опытах *in vivo* с помощью функциональных возможностей метода бинарной логистической регрессии, на основании расчета показателей отношения шансов для коэффициента предикции активности (Pa), значения среднего межгруппового показателя ЛД₅₀ (среднее значение для самцов и самок мышей), активности в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов нами были отобраны 4 наиболее перспективных соединения – циклические амиды **5D**, **7D**, **HD** и нециклический амид **S3**. Эти соединения сочетают высокую антимикробную активность и низкую

токсичность, они довольно доступны, их можно синтезировать, по разработанным нами методикам, с хорошими выходами и высокой степенью чистоты.

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.

Установлено, что исследуемые соединения в минимальных подавляющих концентрациях оказывают бактериостатическое действие и наблюдается устойчивая тенденция к задержке роста и размножения тест-штаммов микроорганизмов в их присутствии.

Выявлено отсутствие токсического воздействия исследуемых соединений на клетки прокариот и эукариотические клетки *in vitro*.

Определена дозозависимая SOS-индуцирующая активность исследуемых соединений *in vitro*, что определяет один из механизмов их биологического действия на прокариотическую клетку – воздействие на ДНК.

Было показано, что 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 значительно ускоряли заживление зараженных ран.

На доклиническом этапе исследования разработаны методы получения и синтезирован новый класс синтетических лекарственных средств, на основе

замещенных 4-, 6-, 7-аминоиндолов, способных оказывать противомикробное действие на прокариотические микроорганизмы и обосновано безопасное использование выявленной противомикробной активности индолиламидов для повышения эффективности противомикробной химиотерапии.

ВЫВОДЫ

1. Реализованы синтетические возможности использования в качестве исходных соединений 16 замещенных 4-, 5-, 6-, 7-аминоиндолов и синтезирована серия из 32 индолиламинов, 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 LD₅₀ 596-1753 мг/кг при внутрибрюшинном введении, 751-1994 мг/кг – при внутривенном, при подкожном – 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_D**): **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 МПК₉₀ 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 МПК₉₀ 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** – МПК₉₀ 62,5-125 мкг/мл; **243D** **235D**, **43D**, **66D** – диапазон МПК₉₀ 125-250 мкг/мл; **2D**, **3D**, **32D**, **64D** – МПК $\leq$ 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.

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ДАЛЬНЕЙШЕГО РАЗВИТИЯ ТЕМЫ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

К синтезу новых органических соединений и особенно гетероциклического ряда всегда был повышенный интерес в научных кругах. Это связано с поиском биологически активных веществ с тем или иным фармакологическим действием – потенциальных лекарственных препаратов. Особенно эта проблема касается лекарственных средств противомикробного действия, обусловленная снижением или полной потерей активности в отношении микроорганизмов с течением времени их применения, т. е. резистентностью (привыканием). Поэтому используемые в лечебной практике антимикробные препараты требуют либо химической модификации, либо замены новыми.

Нами разработано новое научное направление по поиску и разработке методов получения новых соединений индольного ряда с противомикробным действием. Исследованиями установлено, что имеется тесная зависимость активности от элементного состава, строения, тонкой структуры индолиламинов и пирролохинолинов.

На данный момент начаты исследования по синтезу *N*-индолил-2,2,2-трифторацетамидов с использованием замещенных аминокислот индола и более доступного этилового эфира трифторуксусной кислоты. Научные изыскания в этом направлении будут продолжены с использованием серии различно замещенных 4-, 6-, 7-аминоиндолов. Полученные соединения будут исследованы на противомикробную активность.

На наш взгляд интересными в плане антимикробной активности должны быть амиды индольного ряда содержащие в качестве галогена хлор. В литературе известно много хлорпроизводных органических соединений, обладающих эффективным антимикробным действием. Поэтому перспективными являются исследования посвященные разработке методов синтеза из замещенных аминокислот индола и этилмоноклорацетата индолил-2-хлорацетамидов и исследование их действия на микроорганизмы. Работа в этом направлении уже проводится.

На следующем этапе планируется продолжение доклинических исследований в отношении изученных соединений по увеличению их биодоступности и возможности парентерального применения. Для этого планируются исследования по использованию полученных противомикробных соединений в системах направленного транспорта и созданию липосомальных форм индолиламидов.

Перспективным являются разработки по созданию лекарственных форм (противомикробные повязки) исследуемых соединений для профилактики и лечения загрязненных ран, полученных в ходе боевых действий в полевых условиях.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- EPA – Агентство по защите окружающей среды
- IF – фактор индукции
- MRSA – метициллинрезистентный *Staphylococcus aureus*
- MRSE – метициллинрезистентный *Staphylococcus epidermidis*
- NaДХЦ – дихлоризоцианурат натрия
- VRE – ванкомицинрезистентный энтерококк
- АОАС – ассоциация официальных аналитических химиков
- АПАВ – анионные поверхностно-активные вещества
- АТСС – Американская коллекция типовых культур
- БИТ – 1,2-Бензизотиазолин-3-он
- БХДМГ – N-бром-N-хлордиметилгидантоин
- ВЖК – высшие жирные кислоты
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
- ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита первого типа
- ГДТК – N-гидроксиэтилэтилендиамин-*NN'N'*-триуксусная кислота
- ДАУК – дегидроацетоуксусная кислота
- ДДМ – диско-диффузионный метод
- ДМГ – диметилгидантоином
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДМФА – N,N-диметилформамид
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДХМК – дихлормета-ксилол
- ДЦТК – транс-1, 2-диаминоциклогексан-*NNN'N'*-тетрауксусная кислота
- ИДК – иминодиуксусная кислота
- ИК – инфракрасная спектроскопия
- КАС – катионное моющее средство
- КМК – критическая концентрация мицелл
- КОЕ – колониеобразующая единица

КПАВ – катионные поверхностно-активные вещества

ЛПС – липополисахарид

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МИТ – 2-метил-4-изотиазолин-3-он

МПК – минимальная подавляющая концентрация

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид

МХА – Мюллер-Хинтон агар

МХБ – Мюллер-Хинтон бульон

НПАВ – неионные поверхностно-активные вещества

НТК – нитрилтриуксусная кислота

НТСФ – низкотемпературная паровая стерилизация с парами формальдегида

ОБПХФ – *орто*-бензилпара-хлорфенол

ОФА – *орто*-фталальдегид

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПГМБ – полигексаметилен бигуанид

ПЛЛ – поли-L-лизин

ПМС – промышленные метилированные спирты

ПХМК – *пара*-хлормета-ксилол

РНК – рибонуклеиновая кислота

TKID₅₀ – тканевая культура в инфицирующей дозе 50%

УФ – ультрафиолетовая электронная спектроскопия

ФРА – ацетат фенилртути

ФРН – нитрат фенилртути

ФЭК – фотоэлектроколориметр

ХМИТ – хлор-2-метил-4-изотиазолин-3-он

ЭГФГ – *N, N'*-этиленбис [2-(2-гидроксифенил)-глицин]

ЭДИК – этилендиоксибис(этилиминоди(уксусная кислота))

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЯМР – спектроскопия ядерного магнитного резонанса

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алимова Д. И., Ватина А. Б., Зулфугаров П. К., Минаева О. В., Семенова Е. В. Исследование цитотоксичности диметилсульфоксида с помощью МТТ-теста на культуре клеток L929 [Электронный ресурс] // Огарев-online. – **2018**. – №4. – Режим доступа: <http://journal.mrsu.ru/arts/issledovanie-citotoksichnosti-dimetilsulfoksida-s-pomoshhyu-mtt-testa-na-kulture-kletok-l929>.
2. Алямкина, Е. А. Использование 4-амино-2-фенилиндолов в синтезе пирролохинолинов по реакции Комба / Е. А. Алямкина, С. А. Ямашкин, Н. Н. Артаева, М. А. Юровская // Вестник Московского Университета. Сер. 2. Химия. – 2010. – Т. 51. – № 5. – С. 402-408.
3. Алямкина, Е. А. Соединения с потенциальной антибактериальной активностью на основе 4-амино-2-фенилиндола / Е. А. Алямкина, И. С. Степаненко, С. А. Ямашкин, М. А. Юровская // Вестник Московского Университета. Сер. 2. Химия. – **2016**. – Т. 57. – № 6. – С. 410-417.
4. Амирова, З. К. Новые стойкие органические супертоксиканты и их влияние на здоровье человека: монография / З. К. Амирова, О. А. Сперанская. – М. : Москва, **2016**. – 169 с.
5. Андреев, С. В. Методы определения альдегидов (аналитический обзор) / С. В. Андреев, Л. С. Федорова, Е. С. Беляев // Дезинфекционное дело. – **2015**. – Т. 94. – № 4. – С. 46-51.
6. Аникина, Л. В. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и ресазурина / Л. В. Аникина [и др.] // Фундаментальные исследования. – **2014**. – № 12-7. – С. 1423-1427.
7. Ахмедов, Р. М. Эффективность применения повидон-йода при обработке остаточной полости после эхинококкэктомии печени / Р. М. Ахмедов, Б. З. Хамдамов, Х. Х. Иноятов // Биология и интегративная медицина. – **2016**. – № 1. – С. 28-39.

8. Баландина, С. Ю. Сравнительная оценка эффективности дезинфицирующих средств при проведении текущей дезинфекции в стационаре для ВИЧ-инфицированных пациентов / С. Ю. Баландина [и др.] // Вестник пермского университета : Биология. – **2017**. – № 1. – С. 99-103.
9. Бауманни, Л. Косметическая дерматология. Принципы и практика / Л. Баумани, пер. с англ. под ред. Н. Н. Потекаева. – М. : МЕДпресс, 2013. – 669 с.
10. Белоусов, Ю. Б. Клиническая фармакология : национальное руководство / Ю. Б. Белоусов [и др.]. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 976 с.
11. Вавриневич, Е. П. Сравнительная эколого-гигиеническая оценка поведения и персистентности фунгицидов разных классов в почве / Е. П. Вавриневич, В. Г. Бардов, С. Т. Омельчук // Здоровье и окружающая среда. – **2014**. – Т. 1. – № 24. – С.138-143.
12. Василькевич, В. М. Некоторые аспекты экспериментального изучения и гигиенической оценки дезинфицирующих средств, используемых в организациях здравоохранения и пищевой промышленности / В. М. Василькевич, Ю. А. Соболев, В. П. Филонов // Здоровье и окружающая среда. – **2016**. – № 26. – С. 210-213.
13. Войткевич, С. А. Эфирные масла, ароматизаторы, консерванты / С. А. Войткевич. – М. : Пищевая промышленность, 2000. – 85 с.
14. Высоцкий, А. Э. Микобактерицидные свойства дезинфицирующего средства на основе надпропионовой кислоты // А. Э. Высоцкий // Российский журнал проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – **2017**. – № 2. – С. 37-41.
15. Гернет, М. В. Перспективы применения современных моющих и дезинфицирующих средств в пивобезалкогольной отрасли / М. В. Гернет, И. Н. Грибкова, В. Д. Атасунц // Пиво и напитки. – **2016**. – № 4. – С. 42-44.

16. Гомон, Ю. М. Анализ критериев эффективности при проведении фармакоэкономических исследований антимикробных лекарственных средств (данные ограничительных списков РФ в 2014-2016 гг.) [Текст] / Ю. М. Гомон, А. С. Колбин // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – **2017**. – Т. 19. – № 3. – С. 260-264.
17. Гончарук, В. В. Перспективные направления применения производных хинолина // В. В. Гончарук [и др.] // Медицинские новости. – **2018**. – № 2(281). – С. 18-23.
18. ГОСТ 20015-88. Хлороформ. Технические условия (с Изменением № 1). – Введ. 1990-01-01. – М. : ИПК Издательство стандартов, 1996. – Дата последнего изменения 11.01.**2018**. – 156 с.
19. ГОСТ Р 55517-2013 Добавки пищевые. Антиокислители пищевых продуктов. Термины и определения. – Введ. 2014-04-01. – М.: Стандартиформ, **2014**. – Дата последнего изменения 11.01.**2018**. – 7 с.
20. Государственная фармация Российской Федерации (ГФ РФ XIII издания) [Электронный ресурс]. – **2015**. – Режим доступа: Федеральная электронная медицинская библиотека (ФЭМБ). – 1294 с.
21. Гренкова, Т. А. Изучение эффективности некоторых субстанций, содержащих фенольный фрагмент, в отношении тестового штамма *Mycobacterium terrae* DSM 43227 / Т. А. Гренкова [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – **2016**. – № 4(89). – С. 37-41.
22. Гренкова, Т. А. Контроль за устойчивостью микроорганизмов к антибиотикам, антисептикам и дезинфицирующим средствам / Т. А. Гренкова [и др.] // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – **2014**. – № 1(74). – С. 29-33.
23. Гуцол, Л. О. Пострадиационное восстановление ДНК: учебное пособие / Л. О. Гуцол, С. Ф. Непомнящих. – Иркутск : ИГМУ, **2015**. – 55 с.
24. Давыдова, А. В. Дезинфекция и современные дезинфицирующие средства в ветеринарии / А. В. Давыдова // Молодежь и наука. – **2017**. – № 4.1. – С. 31-32.

25. Дайронас, Ж. В. Природные нафтохиноны: Перспективы медицинского применения : монография / Ж. В. Дайронас, И. Н. Зилфикаров. – М. : ООО «ОнтоПринт», 2011. – 252 с.
26. «Дезреестр» 2007-**2018** : Национальный справочно-аналитический портал о дезсредствах, зарегистрированных на территории РФ [Электронный ресурс]. – Режи доступа: <http://www.dezreestr.ru/>.
27. Дорожкин, В. И. Определение острой токсичности дезинфицирующего средства с моющим эффектом АБАЛДЕЗ / В. И. Дорожкин [и др.] // Российский журнал проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – **2017**. – № 3(23). – С. 106-108.
28. Дунаевский, А. М. Клиническое обоснование использования препарата Мирамистин в терапии инфекционно-воспалительных заболеваний респираторной системы / А. М. Дунаевский, И. М. Кириченко // Поликлиника. – **2015**. – № 5. – С. 6-12.
29. Евглевский, Д. А. Повышение бактерицидного, вирусоцидного и фунгицидного действия антибиотиков с помощью глутарового альдегида и этония / Д. А. Евглевский // Вестник курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – Т. 6. – № 6. – С. 73-74.
30. Ердакова, В. П. Консерванты и косметика / В. П. Ердакова, В. М. Позняковский, Л. Ф. Комарова // Ползуновский вестник. – 2008. – № 3. – С. 267-271.
31. Еремеева, Н. И. Рекомендации по выбору дезинфицирующих средств, эффективных в отношении *Mycobacterium tuberculosis* / Н. И. Еремеева [и др.] // Фтизиатрия и пульмонология. – **2017**. – Т. 16. – № 3. – С. 88-103.
32. Еремеева, Н. И. Состояние проблемы выбора дезинфицирующих средств для дезинфекции поверхностей объектов противотуберкулезного стационара / Н. И. Еремеева [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – **2015**. – № 2. – С. 12-19.

33. Ефимочкина, Н. Р. Антибиотикорезистентность штаммов *Campylobacter jejuni*, выделенных из пищевых продуктов / Н. Р. Ефимочкина [и др.] // Вопросы питания. – **2017**. – № 1. – С. 17-27.
34. Жернов, Ю. В. Анализ цитотоксичности гуминовых веществ пелоидов / Ю. В. Жернов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13. – № 1(8). – С. 1996-1998.
35. Жилинский, П. Б. Упаковка для мясных продуктов / П. Б. Жилинский, Т. И. Аксенова, Е. В. Павлова // Мясная индустрия. – 2010. – № 9. – С. 62-65.
36. Зеленая, К. В. Антибиотикорезистентность как глобальная проблема общества / К. В. Зеленая [и др.] // Научно-методический электронный журнал Концепт. – **2017**. – Т. 42. – С. 38-41.
37. Зуев, А. В. Первичная апробация коррозионной активности дезинфицирующего средства на основе глиоксаля / А. В. Зуев // Инновации в науке. – **2017**. – Т. 65. – № 4. – С. 38-42.
38. Иванова, А. С. Применение препаратов на основе перекиси водорода при санитарной обработке оборудования и поверхностей в убойном цехе [Текст] / А. С. Иванова, С. С. Козак // Все о мясе. – 2011. – № 3. – С. 29-31.
39. Иванова, Е. Б. Современные антисептические средства в профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи / Е. Б. Иванова // Практическая медицина. – **2016**. – № 5(97). – С. 140-144.
40. Инге-Вечтомов, С. Г. Экологическая генетика – что это такое? / С. Г. Инге-Вечтомов // Соросовский образовательный журнал. Биология. – 1998. – № 2. – С. 59-65.
41. Кадималиев, Д. А. Влияние различно замещенных пирролохинолонов на физиолого-биохимические характеристики лигнолитического гриба *Lentinus tigrinus* / Д. А. Кадималиев, И. С. Степаненко, О. С. Надежина, С. А. Ямашкин // Микология и фитопатология – **2014**. – Т. 48 – Вып. 5. – С. 309-314.
42. Как описывать статистику в медицине / Т. А. Ланг, М. Сесик; пер. с англ. под ред. В. П. Леонова. – М. : Практическая медицина, 2011. – 480 с.

43. Каменская, Т. Н. Применение нового йодсодержащего препарата Монклавит-1 в качестве антисептика в ветеринарной практике (в условиях Белоруссии) / Т. Н. Каменская [и др.] // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. Горки : БГСХА. – 2009. – № 12. – С. 228-235.
44. Канищев, В. В. Некоторые научно-практические аспекты эффективного использования в медицинских организациях дезинфицирующих средств без возможности адаптации к ним болезнетворных микроорганизмов [Текст] / В. В. Канищев, Н. И. Еремеева // Дезинфекционное дело. – **2017**. – Т. 102. – № 4. – С. 41-48.
45. Катола, В. М. Морфофункциональные особенности бактерий и микромицетов, вегетирующих в старых отходах золотодобычи / В. М. Катола // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – **2014**. – № 53. – С. 109-113.
46. Квашнина, Д. В. Оценка применения хлоргексидина как антисептического средства [Текст] / Д. В. Квашнина, О. В. Ковалишена // Медицинский альманах. – **2016**. – № 3(43). – С. 62-66.
47. Кобзев Е. Н. Формирование устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам и пути решения проблемы / Е. Н. Кобзев [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – **2015**. – Т. 19. – № 6. – С. 48-54.
48. Козлов Р. С. Цефтазидим-авибактам: новые «правила игры» против полирезистентных грамотрицательных бактерий / Р. С. Козлов, О. У. Стецюк, И. В. Андреев // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – **2018**. – Т. 20. – № 1. – С. 24-32.
49. Козлов, Р. С. Антибиотикорезистентность грамположительных возбудителей осложненных интраабдоминальных инфекций в России / Р. С. Козлов [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – **2015**. – Т. 17. – № 3. – С. 227-234.

50. Козлова, Н. С. Антибиотикорезистентность стафилококков, выделенных из крови / Н. С. Козлова, Е. П. Баранцевич, Н. Е. Баранцевич // Научное обозрение. – **2014**. – С. 184-189.
51. Королева, И. А. Место повидон-йода в офтальмологической практике / И. А. Королева, А. А. Кожухов // РМЖ. Клиническая офтальмология. – **2018**. – Том 19. – № 1. – С. 45-48.
52. Косинец, А. Н. Антибиотикорезистентность. Новые возможности антибактериального воздействия / А. Н. Косинец [и др.] // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – **2014**. – Т.13. – № 2. – С. 70-77.
53. Косяченко, Н. С. Изучение устойчивости спор *Bacillus anthracis* и близкородственных сапрофитов к табельным дезинфицирующим средствами / Н. С. Косяченко [и др.] // Инфекционные болезни. – **2015**. – Т. 15. – № S1. – С. 212-214.
54. Котькин, А. И. Изучение антимикробной активности некоторых фторзамещенных пирролохинолинов / А. И. Котькин, **И. С. Степаненко**, С. А. Ямашкин // Материалы Международной молодежной научно-практической конференции «Путь в науку» 22-26 апреля 2013 г./ гл. ред. Р. С. Бегунов. – Ярославль : ЯрГУ, 2013. – С. 28-29.
55. Котькин, А. И. Противомикробная активность азотистых гетероциклов / А. И. Котькин, **И. С. Степаненко**, С. А. Ямашкин // XLIII Огаревские чтения: материалы научной конференции в 3 ч. / отв. за вып. П. В. Сенин. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, **2015**. – Ч. 2 : Естественные науки – С. 6-9.
56. Крестьянинова, О. А. Полная энциклопедия современной косметологии : энциклопедия. – М. : Эксмо, 2003. – 533 с.
57. Кретинин, П. П. Эффективность применения отечественного дезинфицирующего средства для ухода за съемными зубными протезами / П. П. Кретинин // Молодой ученый. – **2016**. – Т. 108. – № 4. – С. 285-287.
58. Кудрявцева, Т. Н. Синтез и антимикробная активность производных акридинкарбоновых кислот, содержащих пиперазиновый фрагмент / Т. Н.

- Кудрявцева [и др.] // Известия Академии наук. Серия химическая. – **2017**. – № 1. – С. 123-128.
59. Кузикова, И. Л. Биodeградация нонилфенола и 4-трет-октилфенола грибами рода *Penicillium*, выделенными из донных осадков Финского залива / И. Л. Кузикова, А. Д. Руссу, Н. Г. Медведева // Микология и фитопатология. – **2018**. – Том 52. – № 2. – С. 134-143.
 60. Кузина, Ж. И. Регламентирование дезинфицирующих средств и пути повышения эффективности хлорсодержащих препаратов / Ж. И. Кузина [и др.] // Молочная промышленность. – **2017**. – № 8. – С. 52-54.
 61. Кузьменков, А. Ю. AMRmap: Интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности / А. Ю. Кузьменков [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – **2017**. – Т. 19. – № 2. – С. 84-90.
 62. Лаишевцев, А. И. Антибиотикорезистентность музейных штаммов бактерий рода *Klebsiella spp.* / А. И. Лаишевцев [и др.] // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – **2016**. – № 5. – С. 38-45.
 63. Ларионов, Г. А. Оценка эффективности применения современных дезинфицирующих средств для обработки вымени коров на молочно-товарной ферме [Текст] / Г. А. Ларионов, О. Ю. Чеченешкина // Известия международной академии аграрного образования. – **2018**. – № 38. – С. 130-132.
 64. Ласковый, В. Н. Формальдегид: метаболизм, антибактериальные, терапевтические и иммуномодулирующие свойства (обзор) / В. Н. Ласковый, В. Т. Ночевный, Б. В. Виолин // Аграрная наука. – 2005. – № 10. – С. 21-25.
 65. Логвиненко Л. А. Ароматические растения семейства *Lamiaceae* для фитотерапии / Л. А. Логвиненко, Л. А. Хлыпенко, Н. В. Марко // Фармация и фармакология. – **2016**. – Том 4. – № 4. – С. 34-47.

66. Ляпунов, Н. А. Поверхностно-активные, коллоидно-мицеллярные и антибактериальные свойства некоторых катионных антисептиков / Н. А. Ляпунов, А. В. Пуртов, Е. В. Дунай // Фармация. – 2013. – № 4. – С. 44-47.
67. Маневич, Б. В. Галоидактивные дезинфицирующие средства / Б. В. Маневич, Ж. И. Кузина, Т. В. Косьяненко // Молочная промышленности. – **2017**. – № 4. – С. 61-63.
68. Маргулис, А. Б. Методы генетической токсикологии / А. Б. Маргулис, Н. С. Карамова, О. Н. Ильинская // Учебно-методическое пособие. – Казань: КФУ, 2012. – 36 с.
69. Марушко, О. В. Опыт применения деквалиния хлорида и лизоцима в терапии заболеваний верхних дыхательных путей у детей / Ю. В. Марушко, О. Ф. Мельников, О. С. Мовчан // Современная педиатрия. – **2014**. – № 7(63). – С. 63.
70. Мельникова, Г. Н. Методические подходы к изучению антимикробной активности кожных антисептиков, принятые в России и странах Европейского союза / Г. Н. Мельникова, Т. Н. Шестопалова // Дезинфекционное дело. – **2017**. – № 2(100). – С. 14-18.
71. Методы лабораторных исследований и испытаний медико-профилактических дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности : Руководство (Р 4.2.2643-10). – Введ. 2010-06-02. – М. Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 615 с.
72. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Дж. Миллер. – М. : Мир, 1976. – 436 с.
73. Мишина, И. Ю. Антибиотикорезистентность: знания, отношения и практики применения антибиотиков пациентам с респираторной патологией / И. Ю. Мишина [и др.] // Молодой ученый. – **2017**. – № 5-2. – С. 22-26.
74. Насыбуллина, А. Ш. Оценка бактерицидных свойств четвертичных солей аммония, глутарового альдегида и их композиций относительно сульфатовосстанавливающих бактерий / А. Ш. Насыбуллина, М. Н.

- Мясоедов // Вестник казанского технологического университета. – 2011. – № 10. – С. 161-164.
75. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и информационный материал по ее положениям / В. И. Покровский [и др.]. – Н. Новгород : Ремедиум Поволжье, 2012. – 84 с.
 76. Нестерова, С. В. Сравнительная оценка антибактериальной активности двух антисептиков *in vivo* и *in vitro* / С. В. Нестерова, Т. В. Анохина, О. Г. Шаповал // Международный студенческий научный вестник. – **2018**. – № 1. – С. 41-42.
 77. Никулина, Н. Б. Применение перекиси водорода при острой форме бронхопневмонии телят [Текст] // Н. Б. Никулина, В. М. Аксенова // Ветеринария. – 2011. – № 6. – С. 46-48.
 78. Носик, Н. Н. Сравнительный анализ вирулицидной эффективности дезинфицирующих средств / Н. Н. Носик, Д. Н. Носик, А. И. Чижова / Вопросы вирусологии. – **2017**. – Т. 108. – № 1. – С. 41-45.
 79. Общие вопросы. Гигиена, токсикология, санитарная оценка токсичности и опасности дезинфицирующих средств (Методические указания МУК № 1.2.1105-02). Утверждены МЗ РФ 10.02.2002. – Москва, 2002. – 22 с.
 80. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2.1890-04) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. – Т. 6. – № 4.
 81. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации / Р. С. Козлов [и др.]. – Смоленск, **2018**. – 206 с.
 82. Орешкина, Е. А. Синтез пирроло[2,3-*h*]-, [3,2-*g*]-, [2,3-*f*]-хинолинов из замещенных 4- и 6-аминоиндолов : дис. ... канд. хим. наук : 02.03.03 / Орешкина Елена Андреевна. – М., 2005. – 126 с.

83. Орлова, О. А. Характеристика спектра устойчивости микрофлоры отделения хирургической реанимации к дезинфицирующим средствам / О. А. Орлова, В. Г. Акимкин // Дезинфекционное дело. – **2015**. – Т. 91. – № 1. – С. 25-32.
84. Орлова, О. А. Характеристика устойчивости микрофлоры отделения хирургической реанимации к дезинфицирующим средствам / О. А. Орлова, В. Г. Акимкин // Эпидемиология и инфекционные заболевания. Актуальные вопросы. – **2015**. – № 2. – С. 21-25.
85. Падейская, Е. Н. Антибактериальный препарат диоксидин: особенности биологического действия и значение в терапии различных форм гнойной инфекции / Е. Н. Падейская // Инфекции и антимикробная терапия. – 2011. – Т. 3 – № 5. – С. 105-155.
86. Парахонский, А. П. Проблемы формирования системы противомикробной защиты / А. П. Парахонский // Аспирант. – **2016**. – № 3(19). – С. 21-24.
87. Першин, Г. Н. Методы экспериментальной химиотерапии : практическое руководство / Г. Н. Першин [и др.]; под ред. Г. Н. Першина. – М : Медицина, 1971. – 541 с.
88. Петров, С. Ю. Консерванты в офтальмологических препаратах: от бензалкония хлорида к поликватернию / С. Ю. Петров, Д. М. Сафонова [Текст] // Глаукома. Журнал НИИ ГБ РАМН. – 2013. – № 4. – С. 82-96.
89. Печенкин, И. Г. Ртуть в духовной и материальной культуре общества / И. Г. Печенкин // Наука и технологические разработки. – 2012. – Том 91. – № 3. – С. 33-43.
90. Пинчукова, К. В. Исследование окислительной активности хлорсодержащих окислителей / К. В. Пинчукова, Я. В. Глазкова, З. Б. Кужугалдинова // Молодой ученый. – **2017**. – № 13. – С. 77-80.
91. Племенков, В. В. Введение в химию природных соединений / В. В. Племенков. – Казань, 2001. – 376 с.
92. Плеханов, С. Е. Научно-практические аспекты инактивации бактерий отдельными представителями фенотиазинов и акридинов / С. Е. Плеханов //

- Системный анализ и управление в биомедицинских системах. – **2016**. – Т. 15. – № 3. – С. 502-506.
93. Подолина, Е. А. Экстракционно-инструментальные способы определения фенолов в конденсированных средах / Е. А. Подолина, Е. Н. Грошев, О. Б. Рудаков // Конденсированные среды и межфазные границы. – 2011. – Т. 13. – № 1. – С. 72-79.
 94. Пономарева, Е. И. Применение эфирных масел в фармации / Е. И. Пономарева, Е. И. Молохова, А. К. Холов // Современные проблемы науки и образования. – **2015**. – № 4. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=21156>.
 95. Попов, Д. А. Диоксидин: антимикробная активность и перспективы клинического применения на современном этапе / Д. А. Попов [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2013. – № 58(3-4). – С. 37-42.
 96. Попов, Н. И. Экспериментальные испытания дезинфицирующего средства «НИКА-ВЕТПРОФИ» для ветеринарной практики / Н. И. Попов [и др.] // Российский журнал проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – **2016**. – № 1. – С. 34-38.
 97. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности. СП 1.2.036-95.
 98. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии [Электронный ресурс] / по ред. Л. С. Страчунского, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова. – НИИАХ СГМА. – 2000-2007. – Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/ab>.
 99. Приказ МЗ СССР №535 от 22.04.1985г. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».
 100. Пучкова, Т. В. Энциклопедия ингредиентов для косметики / Т. В. Пучкова, С. И. Дмитрук. – М. : Школа косметических химиков, 2006. – 334 с.

101. Пхакадзе, Т. Я. Антисептические и дезинфицирующие средства в профилактике нозокомиальных инфекций / Т. Я. Пхакадзе // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2002. – № 1. – С 42-48.
102. Радбиль, А. Б. Физико-химические закономерности получения монотерпеновых спиртов и оценка их биологической активности / А. Б. Радбиль [и др.] // Химия растительного сырья. – 2014. – № 4. – С. 235-242.
103. Распоряжение Правительства РФ от 25 сентября 2017 г. № 2045-р «О стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 г.».
104. Реестр дезсредств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.dezr.ru>. – Заглавие с экрана. – (Дата регистрации 30.04.2015, ЭЛ ФС 77-61614).
105. Реутов, О. А. Органическая химия / О. А. Реутов. – в 4 частях. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2004.
106. Роганова, Н. Б. Изменение ультраструктуры клеток *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* при воздействии дезинфицирующего средства на основе композиции соли алкилдиамин и четвертичного аммониевого соединения / Н. Б. Роганова [и др.] // Дезинфекционное дело. – 2017. – Т. 101. – № 3. – С. 9-17.
107. Родин, А. В. Применение повидон-йода для лечения и профилактики раневых инфекций в практике врача-хирурга / А. В. Родин, В. В. Привольнев, В. А. Савкин // Стационарозамещающие технологии: амбулаторная хирургия. – 2017. – № 3-4. – С. 34-51.
108. Розова, Л. В. Антибиотикорезистентность возбудителей хронического и посттравматического остеомиелита [Текст] / Л. В. Розова, Н. В. Годовых // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2016. – Т. 18. – № 1. – С. 63-68.

109. Романов, А. В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон» 2013-2014 / А. В. Романов [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – **2017**. – Т. 19. – № 1. – С. 57-62.
110. Романова, Г. А. Синтез функционально замещенных пирроло[3,2-*f*]-, [2,3-*g*]-, [3,2-*h*]хинолинов из 5- и 7-аминоиндолов : дис. ... канд. хим. наук : 02.00.03 / Романова Галина Анатольевна. – М., 2004. – 145 с.
111. Романова, Т. В. Дезинфицирующие средства для обеспечения инфекционной безопасности при эндоскопических вмешательствах / Т. В. Романова // Главная медицинская сестра. – **2017**. – № 5. – С. 80-85.
112. Романова, Т. В. Линейка дезинфицирующих средств компании ООО «Полисепт» новые возможности обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в медицинских организациях / Т. В. Романова // Главная медицинская сестра. – **2015**. – № 10. – С. 125-127.
113. Руководство по медицинской микробиологии. Книга III. Том второй. Оппортунистические инфекции: клинико-эпидемиологические аспекты / под ред. А. С. Лабинской, Е. Г. Волиной, Е. П. Ковалевой. – М. : БИНОМ, **2014**. – 880 с.
114. Руководство по медицинской микробиологии. Книга III. Том первый. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика / под ред. Н. Н. Костюковой. – М. : БИНОМ, 2013. – 752 с.
115. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга I / под ред. А. С. Лабинской, Е. Г. Волиной. – М. : БИНОМ, 2008. – 1080 с.
116. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Книга II / под ред. А. С. Лабинской, Н. Н. Костюковой, С. М. Ивановой. – М. : БИНОМ, 2010. – 1152 с.

117. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А. Н. Миронова [и др.]. – Часть первая. – М. : Гриф и К, 2012. – 944 с.
118. Рыбакова, Е. Ю. Подвижность зубов после пломбирования пастой, содержащей формальдегид / Е. Ю. Рыбакова // Dental forum. – 2011. – № 5. – С. 103-104.
119. Сальманова, Э. Р. Получение дезинфицирующего средства на основе йода однохлористого с использованием отходов производства ОАО «Башкирская содовая компания» / Э. Р. Сальманова, Д. Н. Родионов // Актуальные проблемы науки и техники – 2017. Материалы X Международной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы науки и техники – 2017». – Уфа, Уфимский государственный нефтяной технический университет, **2017**. – Том 2. – С. 68-70.
120. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». СП 1.3.2322-08.
121. Сафаров, М. Г. Гербициды: 2,4-Д / М. Г. Сафаров // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Том 7. – № 9. – С. 57-62.
122. Сафарова, А. Я. Получение салициламида МСТ-28 и изучение противогименолепидозной активности // А. Я. Сафарова [и др.] // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – **2015**. – № 2. – С. 41-42.
123. Селянинов, Ю. О. Фулгард – новое высокоэффективное средство для дезинфекции объектов ветеринарного надзора / Ю. О. Селянинов, А. А. Сазонов, Л. М. Кашковская // Ветеринария. – **2017**. – № 11. – С. 54-57.
124. Солдатенков, А. Т. Основы органической химии средств оздоровительной и декоративной косметики / А. Т. Солдатенков. – М. : Академкнига, 2008. – 352 с.

125. **Степаненко, И. С.** Биологическая активность 6-гидрокси-2,3-диметил-6-трифтор-6,7,8,9-тетрагидро-1Н-пирроло[3,2-*h*]хинолин-8-она / И. С. Степаненко, А. И. Котькин, С. А. Ямашкин // Материалы Международной научно-практической конференции 30 сентября 2013 в 34 частях. Часть 7. – Тамбов : ТРОО «Бизнес-Наука-Общество», 2013. – С. 140-141.
126. **Степаненко, И. С.** Биологическая активность и анализ масс-спектрального распада трифторметилпирролохинолонов / И. С. Степаненко, С. А. Ямашкин, А. И. Котькин // Успехи современного естествознания. – **2016**. – № 8. – С. 55-60.
127. **Степаненко, И. С.** Изучение противомикробной активности фторзамещенных пирролохинолинов / И. С. Степаненко, А. И. Котькин, С. А. Ямашкин // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 8. – С. 1406-1410.
128. **Степаненко, И. С.** Изучение противотуберкулезной активности 6-гидрокси-2,3-диметил-6-трифторметил-6,7,8,9-тетрагидро-1Н-пирроло [3,2-*h*]хинолин-8-она / И. С. Степаненко [и др.] // Современные проблемы науки и образования, **2014**. – № 6 (Электронный журнал) URL: www.science-education.ru/120-15881.
129. **Степаненко, И. С.** Изучение цитотоксичности производных аминокиндола 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.
130. **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 [и др.] // Медицинский альянс. – **2015**. – № 1. – С. 120-121.
131. **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, С. А. Ямашкин // Современные проблемы науки и образования. – № 5. – **2015**. – URL: www.science-education.ru/128-22043.

132. Степаненко, И. С. Противотуберкулезная активность некоторых производных аминокислоты и пирролохинолинов / И. С. Степаненко [и др.] // Проблемы медицинской микологии. – **2016**. – Т. 18. – № 2. – С. 116.
133. Стратегия и тактика применения антимикробных средств в лечебных учреждениях России: Российские национальные рекомендации / под ред. В. С. Савельева, Б. Р. Гельфанда, С. В. Яковлева. – Москва : ООО «Компания БОРГЕС», 2012. – 92 с.
134. Сухоруков, А. Ю. Уротропин: дремавшая история и пробуждение [Текст] / А. Ю. Сухоруков, С. Л. Иоффе // Вестник Российского фонда фундаментальных исследований. – **2017**. – № 4(96). – С. 20-31.
135. Сухорукова, М. В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Acinetobacter spp.* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон» 2013-2014 / М. В. Сухорукова [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – **2017**. – Т. 19. – № 1. – С. 42-48.
136. Сухорукова, М. В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон» 2013-2014 / М. В. Сухорукова [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – **2017**. – Т. 19. – № 1. – С. 49-56.
137. Татаринов, Д. А. Фосфорсодержащие производные хинолина: синтез и некоторые аспекты применения / Д. А. Татаринов, В. Ф. Миронов // Бутлеровские сообщения. – **2016**. – Т. 48. – № 11. – С. 51-57.
138. Тотолян, А. А. Прошлое и настоящее *Streptococcus pyogenes*: некоторые факторы патогенности и их генетическое детерминирование / А. А. Тотолян // Вестник РАМН. – **2015**. – № 1. – С. 63-69.
139. Травень, В. Ф. Органическая химия [Электронный ресурс] / В. Ф. Травень. – 4-е изд. – М. : БИНОМ, **2015**. – Т. 2. – 550 с.

140. Туманов, А. С. Изучение устойчивости к дезинфицирующим средствам бактерий, обладающих антибиотикорезистентностью / А. С. Туманов [и др.] // Дезинфекционное дело. – **2016**. – Т. 96. – № 2. – С. 17-27.
141. Ушаков, В. Ю. SOS-система репараций ДНК у бактерий (обзор) / В. Ю. Ушаков // Вестник пермского университета. – 2010. – Вып. 2. – С.19-30.
142. Фарзалиев, В. М. Соединения, содержащие связанный формальдегид, и их антимикробные свойства / В. М. Фарзалиев [и др.] // Технологии нефти и газа. – **2014**. – № 1(90). – С. 36-38.
143. Федеральный закон от 30.03.99 N 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (Редакция от 03.08.2018 – Действует с 21.10.**2018**)
144. Федорова, Л. С. Рациональное применение дезинфицирующих средств в медицинских организациях как одно из условий эффективной профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи / Л. С. Федорова // Дезинфекционное дело. – **2017**. – Т. 102. – № 4. – С. 72.
145. Филимонов, Д. А. Prediction of biological activity spectra for organic compounds / Д. А. Филимонов, В. В. Поройков // Российский химический журнал. – 2006. – Т. 50. – № 2. – С. 66-75.
146. Филимонов, Д. А. Предсказание спектров биологической активности органических соединений с помощью веб-ресурса PASS ONLINE / Д. А. Филимонов // Химия гетероциклических соединений. – **2014**. – № 3. – С. 483-499.
147. Фонштейн, Л. М. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем : методическое указание / Л. М. Фонштейн [и др.]. – М. : Медицина, 1985. – 34 с.
148. Ханумян, А. А. Применение дезинфицирующего средства «Стерицид форте 15» на предприятиях молочной промышленности / А. А. Ханумян // Молочная промышленность. – **2018**. – № 2. – С. 72-73.
149. Хейфиц, Л. А. Душистые вещества и другие продукты для парфюмерии / Л. А. Хейфиц, В. М. Дашунин. – М.: Химия, 1994. – 256 с.

150. Хубаева, Т. О. Изучение связи «структура-активность» в ряду производных бензимидазола и с фрагментом экранированного фенола / Т. О. Хубаева, И. В. Хубаева // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – **2015**. – № 2. – С. 46-50.
151. Хусниев, Ф. А. Местнораздражающее действие формальдегидсодержащего средства дезинфицирующего (ФСС-Д) на лабораторных животных / Ф. А. Хусниев // Ветеринарная медицина – агропромышленному комплексу России: материалы международной научно-практической конференции. – Троицк : Южно-Уральский государственный аграрный университет, **2017**. – С. 184-191.
152. Хуснитдинов, К. Р. Синтез и исследование гербицидной активности дигидроксипентильных производных хлорфенолов / К. Р. Хуснитдинов [и др.] // Вестник башкирского университета. – 2012. – № 4. – С. 1735-1738.
153. Шандала, М. Г. Дезинфектология как важная составляющая системы антимикробной защиты / М. Г. Шандала // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – **2014**. – № 3. – С. 4-7.
154. Шандала, М. Г. Создание единой системы антимикробной и микробной защиты как актуальная гигиеническая проблема / М. Г. Шандала // Гигиена и санитария. – **2015**. – Т. 94. – № 8. – С. 5-7.
155. Шестопалов, Н. В. Научно-методическое обоснование ротации дезинфицирующих средств в медицинских организациях на основе оценки чувствительности к ним госпитальных штаммов микроорганизмов / Н. В. Шестопалов, Л. С. Федорова, А. А. Серов // Дезинфекционное дело. – **2017**. – Т. 102. – № 4. – С. 28-32.
156. Шестопалов, Н. В. Федеральные клинические рекомендации по выбору химических средств дезинфекции и стерилизации для использования в медицинских организациях / Н. В. Шестопалов [и др.]. – Москва, **2015**. – 67 с.

157. Шилова, Е. Н. Дезинфицирующие средства ДЕО-ХЛОР, ДЕО-БАКТЕР ВЕТ и ДЕО-СТЕР для ветеринарии / Е. Н. Шилова, И. В. Вялых, А. Д. Алексеев // Ветеринария. – **2016**. – № 3. – С. 17-18.
158. Шкарин, В. В. Современные представления о механизмах устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам / В. В. Шкарин, А. С. Благонравова, О. В. Ковалишена // Эпидемиология и инфекционные заболевания. Актуальные вопросы. – 2011. – № 3. – С. 48-54.
159. Шкарин, В. В. Способ определения чувствительности бактерий к дезинфицирующим средствам при мониторинге устойчивости к антимикробным препаратам в медицинских организациях : Федеральные клинические рекомендации / В. В. Шкарин [и др.]. – Москва, **2015**. – 27 с.
160. Эйдельштейн, М. В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон» 2013-2014 / М. В. Эйдельштейн [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – **2017**. – Т. 19. – № 1. – С. 37-41.
161. Ямашкин С. А. Синтез функционально замещенных пирроло[3.2-*h*]хинолинов из 2,3-диметил- и 1,2,3-триметил-7-аминоиндолов / С. А. Ямашкин, Г. А. Романова, **И. С. Романова (И. С. Степаненко)**, М. А. Юровская // Химия гетероциклических соединений. – 2003. – № 8. – С. 1202-1211.
162. Ямашкин, С. А. Нитроиндолы, аминокиндоны, пирролохинолины / Избранные методы синтеза и модификации гетероциклов. В 3-х т. Т. 3. Химия синтетических индольных систем / под ред. В. Г. Карцева. – М. : ISBPRESS, 2004. – С. 472-498.
163. Ямашкин, С. А. О возможности использования 7-метил-, 1,7-диметил-2-фенил-5-аминоиндолов в синтезе пирролохинолинов / С. А. Ямашкин, В. В. Гнездилова, Н. В. Жукова // III Международная конференция «Химия гетероциклических соединений», 18–21 октября 2010 г [посвящ. памяти А. Н. Коста: материалы]. Моск. гос. ун-т им. М. В. Ломоносова,

- Исследовательский институт химического разнообразия. – М. : Изд-во Моск. гос. ун.-та, 2010. – С. 230.
164. Ямашкин, С. А. Реакции 2,3-диметил-, 1,2,3-триметил-6-аминоиндолов с этиловым эфиром 4-,4-,4-трифторацетоуксусной кислоты / С. А. Ямашкин, Е. А. Орешкина, М. А. Юровская // Вестник Московского Университета. Сер. 2. Химия. – 2007. – № 2. – С. 125-129.
 165. Ямашкин, С. А. Синтез замещенных 5-нитро-, 5-аминоиндолов и исследование их свойств / С. А. Ямашкин, О. В. Позднякова, Е. А. Алямкина // Современные проблемы науки и образования [Электронный журнал]. – 2011. – № 5. – URL: www.science-education.ru/99-4797.
 166. Ямашкин, С. А. Синтез и изучение реакций 2,5- и 1,2,5-замещенных 6-аминоиндолов / С. А. Ямашкин, Н. Н. Артаева, Е. А. Алямкина // Химия гетероциклических соединений. – 2010. – № 4. – С. 529-537.
 167. Ямашкин, С. А. Синтез метил-, метоксипирроло[3,2-*f*]хинолонов и их фторированных аналогов из 6-замещенных-5-аминоиндолов / С. А. Ямашкин, Г. А. Романова, М. А. Юровская // Вестник Московского Университета. Сер. 2. Химия. – 2004. – Т. 45. – № 1. – С. 12-18.
 168. Ямашкин, С. А. Синтез некоторых нитро- и аминоиндолов [Текст] / С. А. Ямашкин, М. А. Юровская // Химия гетероциклических соединений. – 1999. – № 12. – С. 1630-1636.
 169. Ямашкин, С. А. Синтез пирроло[2,3-*g*]- и пирроло[3,2- *f*]хинолинов из 5-амино-2,3-диметил- и 1,2,3- триметилиндолов и 4,4,4-трифторацетоуксусного эфира / С. А. Ямашкин, Е. А. Орешкина, **И. С. Романова (И. С. Степаненко)**, М. А. Юровская // Химия гетероциклических соединений. – 2006. – № 1. – С. 86-96.
 170. Ямашкин, С. А. Синтез пирроло[3,2-*f*]хинолинов из 1,5-диметил-, 1,2,5-триметил-6-аминоиндолов и β -кетозэфиров / С. А. Ямашкин, О. В. Позднякова, М. А. Юровская // Вестник Московского Университета. Сер. 2. Химия. – **2014**. – Т. 55. – № 1. – С. 31-36.

171. Ямашкин, С. А. Синтез пирролохинолинов из замещенных 6-аминоиндолов и щавелевоуксусного эфира / С. А. Ямашкин, Н. В. Жукова, **И. С. Романова (И. С. Степаненко)** // Химия гетероциклических соединений. – 2008. – № 7. – С. 991-1003.
172. Ямашкин, С. А. Синтез функционально замещенных пирроло[2,3-*g*]- и пирроло[3,2-*f*]хинолинов из 2-фенил- и 1-метил-2-фенил-5-аминоиндолов / С. А. Ямашкин, Г. А. Романова, **И. С. Романова (И. С. Степаненко)**, М. А. Юровская // Химия гетероциклических соединений. – 2003. – № 9. – С. 1354-1363.
173. Ямашкин, С. А. Синтез функционально замещенных пирроло[3,2-*f*]хинолонов из 6-метил-2-фенил- и 1,6-диметил-2-фенил-5-аминоиндолов / С. А. Ямашкин, Г. А. Романова, М. А. Юровская // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2004. – Т. 45. – № 1. – С. 6-11.
174. Ятусевич, И. А. Разработка и внедрение новых препаратов, обладающих антимикробным действием, на основе бронопола для ветеринарии [Текст] / И. А. Ятусевич, В. В. Петров // Учебные записки учреждения образования Витебская Ордена знак почета государственная академия ветеринарной медицины. – 2004. – Т. 40 – № 1. – С. 159-160.
175. Santiago Gudo, L. S. Изучение чувствительности *Atopobium vaginae* к деквалину хлориду / L. S. Santiago Gudo [и др.] // Здоровье женщины. – **2016**. – № 3(108). – С. 60.
176. Abbas, H. A. Phenotypic and Genotypic Detection of Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Urinary Tract Infections / H. A. Abbas, A. M. El-Ganiny, H. A. Kamel // African Health Sciences. – **2018**. – Vol. 18. – Issue 1. – P. 11-21.
177. Abdel-Magid, A. F. Inhibitors of DNA Gyrase-GyrB Subunit and/or Topoisomerase IV-ParE Subunit May Treat Infectious Diseases Caused by Antibiotic-Resistant Bacteria / A. F. Abdel-Magid // ACS Medicinal Chemistry Letters. – **2017**. – Vol. 8. – Issue 6. – P. 592-594.

178. Akamatsu, T. Evaluation of the Efficacy of a 3.2% Glutaraldehyde Product for Disinfection of Fibreoptic Endoscopes with an Automatic Machine / T. Akamatsu [et al.] // Journal of Hospital Infection. – 1997. – 35 (1). – P. 47-57.
179. Alakomi, H. L. Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane / H. L. Alakomi [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – 66 (5). – P. 2001-2005.
180. Alekshun, M. N. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance [Text] / M. N. Alekshun, S. B. Levy // Cell. – 2007. – Vol. 128. – P. 1037-1050.
181. Ali, J. Antimicrobial Resistance Mechanisms and Potential Synthetic Treatments / J. Ali, Q. A. Rafiq, E. Ratcliffe // Future Science OA. – **2018**. – Vol. 4. – Issue 4. – P. FSO290.
182. Allwood, M. C. Formaldehydereleasing Agents [Text] / M. C. Allwood, E. R. Myers // Society for Applied Bacteriology Technical Series. – 1981. – 16. – P. 69-76.
183. Al-Masaudi, S. B. Comparative Sensitivity to Antibiotics and Biocides of Methicillinresistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Saudi Arabia and Great Britain / S. B. Al-Masaudi, A. D. Russell, M. J. Day // Journal of Applied Bacteriology. – 1991. – Vol. 71. – P. 331-338.
184. Alousi, S. Genomic Characterization of MDR *Escherichia coli* Harboring bla_{OXA-48} on the IncL/M-type Plasmid Isolated from Blood Stream Infection / S. Alousi [et al.] // BioMed Research International. – **2018**. – Vol. 2018. – P. 3036-3044.
185. Alyamkina, E. A. 4-Amino-2-phenylindole, Amides, Antibacterial Activity, Ethyl 4,4,4-trifluoroacetate, Ethylacetoacetate, Pyrrolo[2,3-*h*]quinoline / E. A. Alyamkina, S. A. Yamashkin, **I. S. Stepanenko**, M. A. Yurovskaya // Moscow University Chemistry Bulletin. – **2017**. – Vol. 72. – № 1. – P. 24-28.
186. Ames, B. N. Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection / B. N. Ames; ed. A. Hollaender. – V. 1. – New York : Plenum Press, 1971. – P. 267-282.
187. Amsterdam, D. Antibiotics in Laboratory Medicine / D. Amsterdam. – New York : Lippincott Williams, **2014**. – Editions 6. – pp. 807.

188. Antisepsie et Desinfection / eds J. Fleurette, J. Freney, M. -E. Reverdy. – Paris : Editions ESKA, 1995. – pp. 360.
189. Aromatic Disinfectant Fluids. – BS 5197:1976, 1991.
190. Ayres, H. M. A Rapid Method of Evaluating Permeabilizing Activity Against *Pseudomonas aeruginosa* / H. M. Ayres, J. R. Furr, A. D. Russell // Letters in Applied Microbiology. – 1993. – Vol. 17. – P. 149-151.
191. Aziz, M. Natural Antimicrobial/antioxidant Agents in Meat and Poultry Products as well as Fruits and Vegetables: a Review [Text] / M. Aziz, S. Karboune // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – **2018**. – 58(3). – P. 486-511.
192. Babic, M. What's New in Antibiotic Resistance? Focus on Beta-lactamases / M. Babic, A. M. Hujer, R. A. Bonomo // Drug Resistant Update. – 2006. – Vol. 9. – P. 142-156.
193. Becker, B. Virucidal Efficacy of Peracetic Acid for Instrument Disinfection / B. Becker [et al.] // Antimicrobial Resistance and Infection Control. – **2017**. – Vol. 6. – P. 114.
194. Бек, Р. К. [et al.] (2009) Применение пирролохинолиновых соединений для уничтожения клинически латентных микроорганизмов. Патент на изобретение RU 2404982 C2 Приоритет: 08.11.2005 GB 0522715.2.
195. Bello, F. Phytochemicals as Potential Alternatives to Counteract Bacterial Antibiotic Resistance: A Mini-Review / F. Bello, A. Babandi, Y. Murtala // Bayero Journal of Medical Laboratory Sciences. – **2016**. – Vol. 1. – Issue 1. – P. 124-141.
196. Benjamin W. H. Jr. Identification of a Contaminating *Mycobacterium tuberculosis* Strain with a Transposition of an IS6110 Insertion Element Resulting in an Altered Spoligotype / W. H. Jr. Benjamin [et al.] // Journal Clinical Microbiology. – 2001. – 39(3). – P. 1092-1096.
197. Bergan, T. Chelating Agents / T. Bergan, J. Klaveness, A. J. Aasen // Chemotherapy. – 2001. – Vol. 47. – P. 10-14.

198. Berke, P. A. Imidazolidinyl Urea Activity Against *Pseudomonas* [Text] / P. A. Berke, W. E. Rosen // Journal of the Society of Cosmetic Chemists. – 1978. – Vol. 29. – P. 757-766.
199. Binda, E. Specificity of Induction of Glycopeptide Antibiotic Resistance in the Producing *Actinomycetes* / E. Binda, P. Cappelletti, F. Marinelli, G. L. Marcone // Antibiotics (Basel). – **2018**. – Vol. 7. – Issue 2. – P. E36
200. Binh, T. T. Search for Novel Candidate Mutations for Metronidazole Resistance in *Helicobacter pylori* Using Next-generation Sequencing / T. T. Binh [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – **2015**. – Vol. 59. – Issue 4. – P. 2343-2348.
201. Bloomfield, S. F. Mechanisms of Inactivation and Resistance of Spores to Chemical Biocides [Text] / S. F. Bloomfield, M. Arthur // Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement. – 1994. – Vol. 76. – P. 91S-104S.
202. Bonafede, M. Emerging Antibiotic Resistance / M. Bonafede, L. B. Rice // Journal of Laboratory and Clinical Medicine. – 1997. – Vol. 130. – P. 558-66.
203. Bradley, C. R. Evaluation of the Steris System 1 peracetic Acid Endoscope Processor / C. R. Bradley, J. R. Babb, G. A. J. Aycliffe // Journal of Hospital Infection. – 1995. – Vol. 29. – P. 143-151.
204. Bright, K. R. Rapid Reduction of *Staphylococcus aureus* Populations on Stainless Steel Surfaces by Zeolite Ceramic Coatings Containing Silver and Zinc Ions / K. R. Bright, C. P. Gerba, P. A. Rusin // Journal of Hospital Infection. – 2002. – Vol. 52. – P. 307-309.
205. British Pharmacopoeia. – London : TSO, **2018**.
206. Bromberg, L. E. Sustained Release of Silver from Periodontal Wafers for Treatment of Periodontitis / L. E. Bromberg [et al.] // Journal of Controlled Release. – 2000. – 68(1). – P. 63-72.
207. Brown, E. D. Antibacterial Drug Discovery in the Resistance Era / E. D. Brown, G. D. Wright // Nature. – **2016**. – Vol. 529(7586). – P. 336-343.

208. Bugg, T. D. H. Molecular Basis for Vancomycin Resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: Biosynthesis of a Depsipeptide Peptidoglycan Precursor by Vancomycin Resistance Proteins VanH and VanA / T. D. H. Bugg [et al.] // Biochemistry. – 1991. – Vol. 30. – P. 10408-10415.
209. Burt, S. A. Antibacterial Activity of Selected Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* O157:H7 [Text] / S. A. Burt, R. D. Reinders // Letters in Applied Microbiology. – 2003. – Vol. 36. – P. 162-167.
210. Byrnes, J. Pharmacologic Modeling of Primary Mitochondrial Respiratory Chain Dysfunction in Zebrafish / J. Byrnes [et al.] // Neurochemistry International. – **2018**. – Vol. 117. – P. 23-34.
211. Cabrera-Martinez, R. -M. Studies on the Mechanisms of the Sporicidal Action of *ortho*-phthalaldehyde / R. -M. Cabrera-Martinez, B. Setlow, P. Setlow // Journal of Applied Microbiology. – 2002. – Vol. 92. – P. 675-680.
212. Cancer Cell Culture : Methods and Protocols / ed. Simon P. Langdon. – Totowa, New Jersey : Humana Press, 2004. – P. 165-169.
213. Carson, C. F. Melaleuca Alternifolia (Tea Tree) Oil Gel (6%) for the Treatment of Recurrent Herpes Labialis / C. F. Carson [et al.] // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2001. – Vol. 48. – P. 445-458.
214. Casella, M. L. Disinfection with Gaseous Formaldehyde. Second Part: Influence of Test Materials on Formaldehyde Residues and the Bactericidal and Sporicidal Effectiveness [Text] / M. L. Casella, W. Schmidt-Lorenz // Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin. – 1989. – 188(5). – P. 449-465.
215. Chandra, H. Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials-A Review / H. Chandra [et al.] // Plants (Basel). – **2017**. – Vol. 6. – Issue 2. – P. 16-27.
216. Chang, F. K. Urinary Concentrations of Triclosan, Benzophenone-3, and Bisphenol A in Taiwanese Children and Adolescents / F. K. Chang, J. Shiea, H. J. Tsai // International Journal of Environmental Research and Public Health. – **2017**. – 14(12). – P. 1545. – doi: 10.3390/ijerph14121545.

217. Chatterjee, S. S. High Prevalence of Co-Expression of Newer beta-Lactamases (ESBLs, Amp-C-beta-Lactamases, and Metallo-beta-Lactamases) in Gram-Negative Bacilli / S. S. Chatterjee [et al.] // Indian Journal of Medical Microbiology. – 2010. – Vol. 28. – Issue 3. – P. 267-268.
218. Chatterji, M. Effect of Different Classes of Inhibitors on DNA Gyrase from *Mycobacterium smegmatis* / M. Chatterji, M. S. Unniraman, S. Mahadevan, V. Nagaraja // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2001. – Vol. 48. – P. 479-485.
219. Chawner, J. A. Interaction of the Bisbiguanides Chlorhexidine and Alexidine with Phospholipid Vesicles: Evidence for Separate Modes of Action [Text] / J. A. Chawner, P. Gilbert // Journal of Applied Bacteriology. – 1989. – Vol. 66. – P. 253-258.
220. Chemical Disinfectants and Antiseptics. Quantitative Suspension Test for the Evaluation of Bactericidal Activity of Chemical Disinfectants and Antiseptics Used in Food, Industrial, Domestic and Institutional Areas. Test Method and Requirements. – Phase 2 Step 1. – BS EN 1276:2009/AC:2010 D/E/F.
221. Chemical Germicides in Health Care / M. S. Favero; ed. W. A. Rutala. – Morin Heights : Polyscience Publications, 1995. – pp. 33-42.
222. Chen, A. Y. DNA Topoisomerases: Essential Enzymes and Lethal Targets / A. Y. Chen, L. F. Liu // Annual Review in Pharmacology and Toxicology. – 1994. – Vol. 34. – P. 191-218.
223. Chen, S. F. Structural Insights into the Gating of DNA Passage by the Topoisomerase II DNA-gate / S. F. Chen [et al.] // Nature Communications. – **2018**. – Vol. 9. – Issue 1. – P. 3085-3098.
224. Cheng, M. Ramoplanin at Bactericidal Concentrations Induces Bacterial Membrane Depolarization in *Staphylococcus aureus* / M. Cheng [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – **2014**. – Vol. 58. – Issue 11. – P. 6819-6827.
225. Chierici, R. Antimicrobial Actions of Lactoferrin / R. Chierici // Advances in Nutritional Research. – 2001. – Vol. 10. – P. 247-269.

226. Chouchani, C. Evolution of β -Lactams Resistance in Gram-Negative Bacteria in Tunisia / C. Chouchani, R. Marrakchi, A. E. Salabi // Critical Reviews in Microbiology. – 2011. – Vol. 37. – Issue 3. – P. 167-177.
227. Chu, Z. Characterization of Antimicrobial Poly (Lactic Acid)/Nano-Composite Films with Silver and Zinc Oxide Nanoparticles / Z. Chu [et al.] // Materials (Basel). – **2017**. – 10(6). – P. 659-672.
228. Cicek, A. C. OXA- and GES-Type β -Lactamases Predominate in Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates from a Turkish University Hospital / A. C. Cicek [et al.] // Clinical Microbiology and Infection. – **2014**. – Vol. 20. – Issue 5. – P. 410-415.
229. Ciumac, D. Influence of Acyl Chain Saturation on the Membrane-Binding Activity of a Short Antimicrobial Peptide / D. Ciumac [et al.] // ACS Omega. – **2017**. – Vol. 2. – Issue 11. – P. 7482-7492.
230. Clark, D. S. The Effect of Carbon Dioxide on the Growth of Slime Producing Bacteria on Fresh Beef [Text] / D. S. Clark, C. P. Lentz // Canadian Institute of Food Technology Journal. – 1996. – Vol. 2. – P. 72-75.
231. Coates, D. Sporicidal Activity of Sodium Dichloroisocyanurate, Peroxygen and Glutaraldehyde Disinfectants Against *Bacillus subtilis* / D. Coates // Journal of Hospital Infection. – 1996. – Vol. 32. – P. 283-294.
232. Cocito, C. Inhibition of Protein Synthesis by Streptogramins and Related Antibiotics / C. Cocito, M. Di Giambattista, E. Nyssen, P. Vannuffel // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 1997. – Vol. 39. – P. 7-13.
233. Codling, C. E. Performance of Contact Lens Disinfecting Solutions Against *Pseudomonas aeruginosa* in the Presence of Organic Load / C. E. Codling, J. -Y. Maillard, A. D. Russell // Eye and Contact Lens. – 2003. – Vol. 29. – P. 100-102.
234. Coffey, T. J. Genetics and Molecular Biology of β -Lactam-Resistant Pneumococci / T. J. Coffey, C. G. Dowson, B. G. Spratt // Microbiology and Drug Resistance. – 1995. – Vol. 1. – P. 29-34.
235. Collier, P. J. Chemical Reactivity of Some Isothiazolone Biocides / P. J. Collier [et al.] // Journal of Applied Bacteriology. – 1990. – Vol. 69. – P. 578-584.

236. Collin, F. Exploiting Bacterial DNA Gyrase as a Drug Target: Current State and Perspectives / F. Collin, S. Karkare, A. Maxwell // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 92. – P. 479-497.
237. Collins, J. The Use of Glutaraldehyde in Laboratory Discard Jars / J. Collins // *Letters in Applied Microbiology*. – 1986. – Vol. 2. – P. 103-105.
238. Conly, J. Antimicrobial Resistance in Canada / J. Conly // *Canadian Medical Association Journal*. – 2002. – Vol. 167. – Issue 8. – P. 885-891.
239. Cooper, M. A. Binding of Vancomycin Group Antibiotics to D-Alanine and D-Lactate Presenting Self-Assembled Monolayers / M. A. Cooper, M. T. Fiorini, C. Abell, D. H. Williams // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2000. – Vol. 8. – P. 2609-2616.
240. Cosmetic and Drug Preservation: Principles and Practice / J. J. Kabara; ed. J. J. Kabara. – New York : Marcel Dekker, 1984. – P. 275-304.
241. Cosmetics Directive. – 76/768/EEC, 2002; 2010/4/EU.
242. Coussens, N. P. Better Living Through Chemistry: Addressing Emerging Antibiotic Resistance / N. P. Coussens [et al.] // *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N. J.). – **2018**. – Vol. 243. – Issue 6. – P. 538-553.
243. Dai, T. Animal Models of External Traumatic Wound Infections / T. Dai [et al.] // *Virulence*. – 2011. – Vol. 2. – Issue 4. – P. 296-315.
244. David, B. PBP2b Plays a Key Role in Both Peripheral Growth and Septum Positioning in *Lactococcus lactis* / B. David [et al.] // *PLoS One*. – **2018**. – Vol. 13. – Issue 5. – P. 0198014.
245. de Groot A. C. Formaldehyde-Releasers in Cosmetics: Relationship to Formaldehyde Contact Allergy. Part 1. Characterization, Frequency and Relevance of Sensitization, and Frequency of Use in Cosmetics / A. C. de Groot [et al.] // *Contact Dermatitis*. – 2010. – 62(1). – P. 2-17.
246. Diarra, M. S. Effect of Lactoferrin in Combination with Penicillin on the Morphology and the Physiology of *Staphylococcus aureus* Isolated From Bovine Mastitis / M. S. Diarra, D. Petitclerc, P. Lacasse // *Journal of Dairy Science*. – 2002. – Vol. 85. – P. 1141-1149.

247. Diehl, M. A. A New Preservative for High pH Systems / M. A. Diehl // Household and Personal Products Industry (HAPPI). – 2002. – 39(8). – P. 72-74.
248. Dinos, G. P. The Macrolide Antibiotic Renaissance / G. P. Dinos // British Journal of Pharmacology. – **2017**. – Vol. 174. – Issue 18. – P. 2967-2983.
249. Disinfectants – Their Value and Uses / W. E. Finch. – London : Chapman and Hall, 1958. – pp. 188.
250. Disinfection in Veterinary and Farm Animal Practice / eds A. H. Linton, W. B. Hugo, A. D. Russell. – Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1987. – P. 12-42.
251. Disinfection, Sterilization, and Preservation / P. A. Goddard, K. A. McCue; ed. S. S. Block. – 5th edn. – Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2001. – 1481 pp.
252. Docquier, J-D. An Update on β -Lactamase Inhibitor Discovery and Development / J-D. Docquier, S. Mangani // Drug Resistance Updates. – **2018**. – Vol. 36. – P. 13-29.
253. Dominelli-Whiteley, N. Strong Short-Range Cooperativity in Hydrogen-Bond Chains / N. Dominelli-Whiteley [et al.] // Angewandte Chemie International Edition. – **2017**. – Vol. 56. – Issue 26. – P. 7658-7662.
254. Dowson, C. G. Penicillin-Binding Protein 2 Genes of Non-beta-Lactamase-Producing, Penicillin-Resistant Strains of *Neisseria gonorrhoeae* / C. G. Dowson, A. E. Jephcott, K. R. Gough, B. G. Spratt // Molecular Microbiology. – 1989. – Vol. 3. – Issue 1. – P. 35-41.
255. Duan, Y. Properties of an Enzyme Based Low Level Iodine Disinfectant / Y. Duan [et al.] // Journal of Hospital Infection. – 1999. – Vol. 43. – P. 219-229.
256. Durcik, M. New N-Phenylpyrrolamide DNA Gyrase B Inhibitors: Optimization of Efficacy and Antibacterial Activity / M. Durcik [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – **2018**. – Vol. 154. – P. 117-132.
257. Džidic, S. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects / S. Džidic, J. Šuškovc, B. Kos // Food Technology and Biotechnology. – 2008. – Vol. 46. – P. 11-21.

258. Ebrahim-Saraie, H. S. Detection of Antimicrobial Susceptibility and Integrins Among Extended-Spectrum β -Lactamase Producing Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates in Southwestern Iran / H. S. Ebrahim-Saraie [et al.] // Oman Medical Journal. – **2018**. – Vol. 33. – Issue 3. – P. 218-223.
259. Ehmann, D. E. Novel Compounds Targeting Bacterial DNA Topoisomerase / DNA Gyrase / D. E. Ehmann, S. D. Lahiri // Current Opinion in Pharmacology. – **2014**. – Vol. 18. – P. 76-83.
260. El-Ahl, A. A. Synthesis and Antibacterial Eesting of Some New Quinolines, Pyridazinoquinolines and Spiroindoloquinolines / A. A. El-Ahl, M. M. Mashaly, M. A. Metwally // Bollettino Chimico Farmaceutico. – 1996. – Vol. 135. – P. 297-300.
261. Elgendy, E. A. Effect of Local Application of Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil Gel on Long Pentraxin Level Used as an Adjunctive Treatment of Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Clinical Study / E. A. Elgendy, S. A. Ali, D. H. Zineldeen // Journal of Indian Society of Periodontology. – 2013. – 17(4). – P. 444-448.
262. Elsmore, R. Development of Bromine Chemistry in Controlling Microbial Growth in Water Systems / R. Elsmore // International Biodeterioration and Biodegradation. – 1995. – Vol. 36. – P. 245-253.
263. Ernst, R. E. Biological Effects of Surfactants: Part 6 - Effects of Anionic, Non-Ionic and Amphoteric Surfactants on a Green Alga (*Chlamydomonas*) / R. E. Ernst, C. J. Gonzales, J. Arditti // Environmental Pollution. – 1983. – Series A. – Vol. 31. – P. 159-175.
264. Fan, L. Interaction of Ozone and Negative Air Ions to Control Microorganisms / L. Fan [et al.] // Journal of Applied Microbiology. – 2002. – Vol. 93. – P. 114-148.
265. Ferguson, D. Phenotypic, Molecular and Antibiotic Resistance Profiling of Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Two Irish Hospitals / D. Ferguson, O. J. Cahill, B. Quilty // Journal of Medicine. – 2007. – Vol. 1. – Issue 1. – P. 1-14.

266. Figueiredo, A. C. L. Antibacterial Efficacy of Nisin, Bacteriophage P100 and Sodium Lactate Against *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Sliced Pork Ham [Text] / A. C. L. Figueiredo, R. C. C. Almeida // Brazilian Journal of Microbiology. – **2017**. – 48(4). – P. 724-729.
267. Fihman, V. Appearance of *aac(6')-Ib-cr* Gene Among Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in a French Hospital / V. Fihman [et al.] // Journal of Infection. – 2008. – Vol. 56. – Issue 6. – P. 454-459.
268. Fine, D. H. Comparative Antimicrobial Activities of Antiseptic Mouthwashes Against Isogenic Planktonic and Biofilm Forms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* / D. H. Fine, D. Furgang, M. L. Barnett // Journal of Clinical Periodontology. – 2001. – Vol. 28. – P. 697-700.
269. Fine, D. H. Effect of an Essential Oil Containing Antiseptic Mouthrinse on Plaque and Salivary *Streptococcus mutans* Levels / D. H. Fine [et al.] // Journal of Clinical Periodontology. – 2000. – Vol. – P. 157-161.
270. Finley, R. Declines in Outpatient Antimicrobial Use in Canada (1995-2010) / R. Finley [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – Issue 10. – P. e76398.
271. Food Preservatives / eds N. J. Russell, G. W. Gould. – New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. – pp. 370.
272. Forbes, S. Formulation of Biocides Increases Antimicrobial Potency and Mitigates the Enrichment of Nonsusceptible Bacteria in Multispecies Biofilms / S. Forbes [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – **2017**. – 83(7). – doi: 10.1128/AEM.03054-16.
273. Forough Reyhani, M. Antibacterial Effect of Different Concentrations of Sodium Hypochlorite on *Enterococcus faecalis* Biofilms in Root Canals / M. Forough Reyhani [et al.] // Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects. – **2017**. – 11(4). – P. 215-221.
274. Franco-Ulloa, S. Novel Bacterial Topoisomerase Inhibitors Exploit Asp83 and the Intrinsic Flexibility of the DNA Gyrase Binding Site / S. Franco-Ulloa, G. La Sala, G. P. Miscione, M. De Vivo // International Journal of Molecular Sciences . – **2018**. – Vol. 19. – Issue 2. – P. 453-465.

275. Freese, E. Action Mechanisms of Preservatives and Antiseptics / E. Freese, B. C. Levin // *Developments in Industrial Microbiology*. – 1978. – Vol. 19. – P. 207-227.
276. Freudenthal, O. Discrepancies between Cyclic and Linear Antimicrobial Peptide Actions on the Spectrochemical and Nanomechanical Fingerprints of a Young Biofilm / O. Freudenthal, F. Quilès, G. Francius // *ACS Omega*. – **2017**. – Vol. 2. – Issue 9. – P. 5861-5872.
277. Fyfe, C. Resistance to Macrolide Antibiotics in Public Health Pathogens / C. Fyfe, T. H. Grossman, K. Kerstein, J. Sutcliffe // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – **2016**. – Vol. 6. – Issue 10. – P. a025395.
278. Gavin, J. Efficacy of Standard Disinfectant Test Methods for Contact Lens-Care Solutions / J. Gavin [et al.] // *International Biodeterioration and Biodegradation*. – 1996. – Vol. 36. – P. 431-440.
279. Giedraitien, A. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria / A. Giedraitien, A. Vitkauskien, R. Naginien, A. Pavilonis // *Medicina (Kaunas)*. – 2011. – Vol. 47. – Issue 3. – P. 137-146.
280. Gilbert, P. Barrier Properties of the Gram-Negative Cell Envelope Towards High Molecular Weight Polyhexamethylene Biguanides / P. Gilbert, D. Pemberton, D. E. Wilkinson // *Journal of Applied Bacteriology*. – 1990. – Vol. 69. – P. 585-592.
281. Gilbert, P. Synergism within Polyhexamethylene Biguanide Biocide Formulations / P. Gilbert, D. Pemberton, D. E. Wilkinson // *Journal of Applied Bacteriology*. – 1990. – Vol. 69. – P. 593-598.
282. Girou, E. Efficacy of Handrubbing with Alcohol Based solution Versus Standard Handwashing with Antiseptic Soap: Randomised Clinical Trial / E. Girou [et al.] // *British Medical Journal*. – 2002. – Vol. 325. – P. 362-365.
283. Goldstone, R. J. A Population Genomics Approach to Exploiting the Accessory 'Resistome' of *Escherichia coli* / R. J. Goldstone, D. G. E. Smith // *Microbial Genomics*. – **2017**. – Vol. 3. – Issue 4. – P. 1-15.

284. Gomes, P. F. A. In Vitro Antimicrobial Activity of Several Concentrations of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate in the Elimination of *Enterococcus faecalis* / P. F. A. Gomes [et al.] // International Journal of Endodontics. – 2001. – Vol. 34. – P. 424-428.
285. Gómez-Eichelmann, M. C. DNA Supercoiling and Topoisomerases in *Escherichia coli* / M. C. Gómez-Eichelmann, R. Camacho-Carranza // Revista latinoamericana de microbiología. – 1995. – Vol. 37. – Issue 3. – P. 291-304.
286. Govinden, U. Geographical Evolution of the CTX-M β -Lactamase: an Update / U. [et al.] // Govinden African Journal of Biotechnology. – 2007. – Vol. 6. – P. 831-839.
287. Grebe, T. Penicillin-Binding Proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are Primary Resistance Determinants for Different Classes of β -Lactam Antibiotics / T. Grebe, R. Hakenbeck // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1996. – Vol. 40. – P. 829-834.
288. Grzybowski, J. Antimicrobial Properties of Copper-Coated Electroconductive Polyester Fibers [Text] / J. Grzybowski, E. A. Trafny // Polimers in Medicine. – 1999. – Vol. 29. – P. 27-33.
289. Guide to Microbial Control in Pharmaceutical / S. P. Denyer, K. H. Wallhausser; eds S. P. Denyer, R. M. Baird. – Chichester : Ellis Horwood, 1990. – P. 251-273.
290. Guilhelmelli, F. Antibiotic Development Challenges: the Various Mechanisms of Action of Antimicrobial Peptides and of Bacterial Resistance / F. Guilhelmelli [et al.] // Frontiers of Microbiology. – 2013. – Vol. 4. – P. 353-365.
291. Guillard, T. Antibiotic Resistance and Virulence: Understanding the Link and its Consequences for Prophylaxis and Therapy / T. Guillard [et al.] // Bioessays. – **2016**. – Vol. 38. – Issue 7. – P. 682-693.
292. Gurley, B. Ozone: Pharmaceutical Sterility of the Future? / B. Gurley // Journal of Parenteral Science and Technology. – 1985. – Vol. 39. – P. 256-261.
293. Guthrie, W.G. Bronopol – the Answer to Preservative Problems / W.G. Guthrie // SOFW Journal. – 1999. – Vol. 125. – P. 67-71.

294. Haburcak, R. Ligand-Receptor Interaction Modulates the Energy Landscape of Enzyme-Instructed Self-Assembly of Small Molecules / R. Haburcak [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – **2016**. – Vol. 138. – Issue 47. – P. 15397-15404.
295. Hamilton, J. L. Polymeric Nanocarriers for the Treatment of Systemic Iron Overload [Text] / J. L. Hamilton, J. N. Kizhakkedathu // Molecular and Cellular Therapies. – **2015**. – Vol. 3. – P. 3.
296. Handbook of Biocide and Preservative Use / G. Hill; ed. H. W. Rossmore. – London : Blackie Academic and Professional, 1995. – P. 349-415.
297. Handbook of Disinfectant and Antiseptics / ed. J. M. Ascenzi. – New York: Marcel Dekker, 1996. – pp. 300.
298. Harms, J. M. Alterations at the Peptidyl Transferase Centre of the Ribosome Induced by the Synergistic Action of the Streptogramins Dalfopristin and Quinupristin / J. M. Harms [et al.] // BMC Biology. – 2004. – Vol. 2. – 10 pp.
299. Hasdemir, U. The Role of Cell Wall Organization and Active Efflux Pump Systems in Multidrug Resistance of Bacteria / U. Hasdemir // Mikrobiyoloji Bülteni. – 2007. – Vol. 41. – Issue 2. – P. 309-327.
300. He, S. Mechanisms of Evolution in High-Consequence Drug Resistance Plasmids / S. He [et al.] // MBio. – **2016**. – Vol. 7. – Issue 6. – P. e01987-16.
301. Hildebrandt, C. *In Vitro* Analysis of the Microbicidal Activity of 6 Contact Lens Care Solutions / C. Hildebrandt [et al.] // BMC Infectious Diseases. – 2012. – Vol. 12. – P. 241.
302. Hodgson, I. Synergistic Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils and Parabens: Potential for the Preservation of Food / I. Hodgson, J. Stewart, L. Fyfe // International Biodeterioration and Biodegradation. – 1995. – Vol. 36. – P. 465.
303. Hooper, D. C. Mechanisms of Action of Antimicrobials: Focus on Fluoroquinolones / D. C. Hooper // Clinical Infectious Diseases. – 2001. – Vol. 32. – Suppl. 1. – P. S9-S15.
304. Howlett, R. Erratum: Streptomyces Coelicolor Strains Lacking Polyprenol Phosphate Mannose Synthase and Protein O-mannosyl Transferase are Hyper-

- susceptible to Multiple Antibiotics / R. Howlett [et al.] // Microbiology. – **2018**. – Vol. 164. – Issue 3. – P. 369-382.
305. Huang, F. C. The Effect of the Disulfideisomerase Domain Containing Protein in the Defense Against Polyhexamethylene Biguanide of Highly Tolerant *Acanthamoeba* at the Trophozoite Stage / F. C. Huang [et al.] // International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance. – **2016**. – 6(3). – P. 251-257.
 306. Hugo, W. B. The Degradation of Preservatives by Microorganisms / W. B. Hugo // International Biodeterioration and Biodegradation. – 1991. – Vol. 27. – P. 185-194.
 307. Iannelli, F. Type M Resistance to Macrolides Is Due to a Two-Gene Efflux Transport System of the ATP-Binding Cassette (ABC) Superfamily / F. Iannelli [et al.] // Frontiers in Microbiology. – **2018**. – Vol. 9. – P. 1670-1679.
 308. Ignak, S. Frequency of Antiseptic Resistance Genes in Clinical Staphylococci and Enterococci Isolates in Turkey / S. Ignak, Y. Nakipoglu, B. Gurler // Antimicrobial Resistance and Infection Control. – **2017**. – Vol. 6. – P. 88.
 309. Inhibition and Destruction of the Microbial Cell / D. J. Kushner; ed. W. B. Hugo. – London : Academic Press, 1971. – P. 259-283.
 310. Intorasoot, A. Bactericidal Activity of Herbal Volatile Oil Extracts against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* / A. Intorasoot [et al.] // Journal of Intercultural Ethnopharmacology. – **2017**. – 6(2). – P. 218-222.
 311. Jacoby, G. A. New Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents [Text] / G. A. Jacoby, G. L. Archer // The New England Journal of Medicine. – 1991. – Vol. 324. – Issue 9. – P. 60-612.
 312. Jacoby, G. A. The New β -Lactamases / G. A. Jacoby, L. S. Munoz-Price // New England Journal of Medicine. – 2005. – Vol. 352. – P. 380-391.
 313. Jarolim, K. Dual Effectiveness of *Alternaria* but not *Fusarium* Mycotoxins against Human Topoisomerase II and Bacterial Gyrase / K. Jarolim [et al.] // Archives of Toxicology. – **2017**. – Vol. 91. – Issue 4. – P. 2007-2016.

314. Jedrey, H. Ciprofloxacin Binding to GyrA Causes Global Changes in the Proteome of *Pseudomonas aeruginosa* / H. Jedrey, K. S. Lilley, M. Welch // FEMS Microbiology Letters. – **2018**. – Vol. 365. – Issue 13. – P. 134.
315. Jędrzejczyk, R. J. Antimicrobial Properties of Silver Cations Substituted to Faujasite Mineral // R. J. Jędrzejczyk [et al.] // Nanomaterials (Basel). – **2017**. – 7(9). – P. 240-251.
316. Jennings, M. C. Efflux Pumps May Not Be the Major Drivers of *qac* Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* / M. C. Jennings [et al.] // European Journal of Chemical Biology. – **2017**. – 18(16). – P. 1573-1577.
317. Jeong, E. K. Inactivation of Influenza A virus H1N1 by Disinfection Process / E. K. Jeong [et al.] // American Journal of Infection Control. – 2010. – 38(5). – P. 354-360.
318. Jones, J. A. Recent Advances in the Rational Design and Optimization of Antibacterial Agents / J. A. Jones, K. G. Virga, G. Gumina, K. E. Hevener // MedChemComm. – **2016**. – Vol. 7. – Issue 9. – P. 1694-1715.
319. Jroundi, F. Molecular Tools for Monitoring the Ecological Sustainability of a Stone Bio-Consolidation Treatment at the Royal Chapel, Granada / F. Jroundi [et al.] // PLoS One. – **2015**. – 10(7). – doi:10.1371/journal.pone.0132465.
320. Kabara, J. J. Structure-Function Relationships of Surfactants as Antimicrobial Agents / J. J. Kabara // Journal of the Society of Cosmetic Chemists. – 1978. – Vol. 29. – P. 733-741.
321. Kampf, G. Efficacy of Ethanol against Viruses in Hand Disinfection / G. Kampf // Journal of Hospital Infection. – **2018**. – 98(4). – P. 331-338.
322. Kapoor, G. Action and Resistance Mechanisms of Antibiotics: A guide for Clinicians / G. Kapoor, S. Saigal, A. Elongavan // Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology. – **2017**. – Vol. 33. – Issue 3. – P. 300-305.
323. Karatzas, A. K. The Combined Action of Carvacrol and High Hydrostatic Pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A / A. K. Karatzas [et al.] // Journal of Applied Microbiology. – 2001. – Vol. 90. – P. 463-469.

324. Karthikeyan, K. Emergence of a New Antibiotic Resistance Mechanism in India, Pakistan, and the UK: a Molecular, Biological, and Epidemiological Study / K. Karthikeyan [et al.] // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 10. – Issue 9. – P. 597-602.
325. Kensuke, B. M. Resistance to Macrolides in Clinical Isolates of *Streptococcus pyogenes* due to Ribosomal Mutations / B. M. Kensuke [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2002. – Vol. 49. – Issue 6. – P. 935–939.
326. Keshri, V. Phylogenomic Analysis of β -Lactamase in Archaea and Bacteria Enables the Identification of Putative New Members / V. Keshri [et al.] // *Genome Biology and Evolution*. – **2018**. – Vol. 10. – Issue 4. – P. 1106-1114.
327. Khadre, M. A. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: a Review / M. A. Khadre, A. E. Yousef, J. -G. Kim // *Journal of Food Science*. – 2001. – Vol. 66. – P. 1242-1252.
328. Khunkitti, W. *Acanthamoeba castellanii*: Growth, Encystment, Excystment and Biocide Susceptibility / W. Khunkitti [et al.] // *Journal of Infection*. – 1998. – Vol. 36. – P. 43-48.
329. Kim, J. G. Chlorine Dioxide Treatment of Seafoods to Reduce Bacterial Loads / J. G. Kim [et al.] // *Journal of Food Science*. – 1999. – Vol. 64. – P. 1089-1093.
330. Kim, S. I. New Topoisomerases Inhibitors: Synthesis of Rutaecarpine Derivatives and Their Inhibitory Activity against Topoisomerases / S. I. Kim [et al.] // *Archives of Pharmacal Research*. – 2012. – Vol. 35. – Issue 5. – P. 785-789.
331. Kim, Y. K. Purification and Characterization of an Erythromycin Esterase from an Erythromycin-Resistant *Pseudomonas spp.* / Y. K. Kim, C-J. Cha, C. E. Cerniglia // *FEMS Microbiology Letters*. – 2002. – Vol. 210. – P. 239-244.
332. Knott, A. G. Development of Resistance to Biocides During Sporulation of *Bacillus subtilis* / A. G. Knott, A. D. Russell, B. N. Dancer // *Journal of Applied Bacteriology*. – 1995. – Vol. 79. – P. 492-498.
333. Kohanski, M. A. How Antibiotics Kill Bacteria: from Targets to Networks / M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, J. J. Collins // *Nature Reviews Microbiology*. – 2010. – Vol. 8. – P. 423-435.

334. Kosowska, K. Alterations of Penicillin-Binding Proteins 1A, 2X, and 2B in *Streptococcus pneumoniae* Isolates for which Amoxicillin MICs are Higher than Penicillin MICs / K. Kosowska [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2004. – Vol. 48. – P. 4020-4022.
335. Kotra, L. P. β -Lactam Antibiotics, β -Lactamases and Bacterial Resistance / L. P. Kotra, S. Mobashery // Bulletin of Institute Pasteur. – 1998. – Vol. 96. – P. 139-150.
336. Krapivina, I. V. Antimicrobial Susceptibility and Molecular Mechanisms of Resistance to beta-Lactams of Gram-Negative Microorganisms – Causative Agents of Nosocomial Infections / I. V. Krapivina [et al.] // Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii. – 2007. – Vol. 5. – P. 16-20.
337. Krupovic, M. Polymyxin B Induces Lysis of Marine *Pseudoalteromonads* / M. Krupovic, R. Daugelavicius, D. H. Bamford // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2007. – Vol. 51. – Issue 11. – P. 3908-3914.
338. Kulczycka-Mierzejewska, K. Molecular Dynamics Simulations Suggest why the A2058G Mutation in 23S RNA Results in Bacterial Resistance Against Clindamycin / K. Kulczycka-Mierzejewska, J. Sadlej, J. Trylska // Journal of Molecular Modeling. – **2018**. – Vol. 24. – Issue 8. – P. 191-203.
339. Kuruvilla, J. R. Antimicrobial Activity of 2.5% Sodium Hypochlorite and 0.2% Chlorhexidine Gluconate Separately and Combined, as Endodontic Irrigants [Text] / J. R. Kuruvilla, M. P. Kamath // Journal of Endodontics. – 1998. – Vol. 24. – P. 472-476.
340. Lai, C. C. High Burden of Antimicrobial Drug Resistance in Asia / C. C. Lai [et al.] // Journal of Global Antimicrobial Resistance. – **2014**. – Vol. 2. – Issue 3. – P. 141-147.
341. Lambert, P. A. Bacterial Resistance to Antibiotics: Modified Target Sites / P. A. Lambert // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2005. – Vol. 57. – P. 1471-1485.
342. Lambert, P. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* / P. A. Lambert // Journal of Royal Society of Medicine. – 2002. – Vol. 95. – Suppl. 41. – P. 22-26.

343. Laouar, L. Yeast Response to Non-Ionic Surfactants / L. Laouar, K. C. Lowe, B. J. Mulligan // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1996. – Vol. 18. – P. 433-38.
344. Lee, J. Antimicrobial Peptides (AMPs) with Dual Mechanisms: Membrane Disruption and Apoptosis / J. Lee, D. G. Lee // *Journal of Microbiology and Biotechnology*. – **2015**. – Vol. 25. – Issue 6. – P. 759-64.
345. Leelaporn, A. Multidrug Resistance to Antiseptics and Disinfectants in Coagulase-Negative Staphylococci / A. Leelaporn [et al.] // *Journal of Medical Microbiology*. – 1994. – Vol. 40. – P. 214-220.
346. Leggett, M. J. Bacterial Spore Structures and their Protective Role in Biocide Resistance / M. J. Leggett [et al.] // *Journal of Applied Microbiology*. – 2012. – 113(3). – P. 485-498.
347. Leonhardt, A. Effect of Eitanium on Selected Oral Bacteria Species *in Vitro* [Text] / A. Leonhardt, G. Dahlen // *European Journal of Oral Science*. – 1995. – Vol. 103. – P. 382-387.
348. Levy, S. B. Antibacterial Resistance Worldwide: Causes, Challenges and Responses / S. B. Levy, B. Marshall // *Nature Medicine*. – 2004. – Vol. 10. – P. 122-129.
349. Lin, H. V. The *Vibrio cholerae* var Regulon Encodes a Metallo- β -Lactamase and an Antibiotic Efflux Pump, which are Regulated by VarR, a LysR-Type Transcription Factor / H. V. Lin [et al.] // *PLoS One*. – **2017**. – Vol. 12. – Issue 9. – P. 184-205.
350. Ling, L. L. A New Antibiotic Kills Pathogens without Detectable Resistance / L. L. Ling [et al.] // *Nature*. – **2015**. – Vol. 517. – P. 455–459.
351. Liu, L. F. Type II DNA Topoisomerases: Enzymes that can unknot a Topologically Knotted DNA Molecule via a Reversible Double-Strand Break / L. F. Liu, C-C. Liu, B. M. Alberts // *Cell*. – 1980. – Vol. 19. – P. 697-707.
352. Lv, C. Investigation on formaldehyde release from preservatives in cosmetics / C. Lv [et al.] // *International Journal of Cosmetic Science*. – **2015**. – 37(5). – P. 474-478.

353. Mannion, P. T. The Use of Peracetic Acid for the Reprocessing of Flexible Endoscopes and Rigid Cytoscopes and Laparoscopes / P. T. Mannion // Journal of Hospital Infection. – 1995. – Vol. 30. – P. 237-240.
354. March, J. K. The Differential Effects of Heat-Shocking on the Viability of Spores from *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, and *Clostridium sporogenes* after Treatment with Peracetic Acid and Glutaraldehyde-Based Disinfectants / J. K. March [et al.] // MicrobiologyOpen. – **2015**. – 4(5). – P. 764-773.
355. Maron, D. M. Revised Methods for *Salmonella* Mutagenicity Test [Text] / D. M. Maron, B. N. Ames // Mutation Research. – 1983. – Vol. 113. – P. 173-215.
356. Marouchoc, S. R. Classical Phenol Derivatives and their Uses / S. R. Marouchoc // Developments in Industrial Microbiology. – 1979. – Vol. 20. – P. 15-24.
357. Martinelli, M. Water and Air Ozone Treatment as an Alternative Sanitizing Technology / M. Martinelli [et al.] // Journal of Preventive Medicine and Hygiene. – **2017**. – 58(1). – P. 48-52.
358. Martinez, J. L. Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity and Antibiotic Resistance / J. L. Martinez, F. Baquero // Clinical Microbiology Review. – 2002. – Vol. 15. – Issue 4. – P. 647-679.
359. Martorell, P. A Nutritional Supplement Containing Lactoferrin Stimulates the Immune System, Extends Lifespan, and Reduces Amyloid β Peptide Toxicity in *Caenorhabditis Elegans* / P. Martorell [et al.] // Food Sciences and Nutrition. – **2017**. – 5(2). – P. 255-265.
360. May, J. Time-Kill Studies of Tea Tree Oils on Clinical Isolates / J. May [et al.] // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2000. – Vol. 45. – P. 639-643.
361. McDonnell, G. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance [Text] / G. McDonnell, A. D. Russell // Clinical Microbiology Reviews. – 1999. – Vol. 12. – P. 147-179.
362. McKee, E. E. Inhibition of Mammalian Mitochondrial Protein Synthesis by Oxazolidinones / E. E. McKee, M. Ferguson, A. T. Bentley, T. A. Marks // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2006. – Vol. 50. – Issue 6. – P. 2042-2049.

363. McKeegan, K. S. Microbial and Viral Drug Resistance Mechanisms / K. S. McKeegan, M. I. Borges-Walmsley, A. R. Walmsley // Trends in Microbiology. – 2002. – Vol. 10. – P. 8-14.
364. McManus, M. C. Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents / M. C. McManus // American Journal of Health-System Pharmacy. – 1997. – Vol. 54. – Issue 12. – P. 1420-1433.
365. McMurry, L. M. Genetic Evidence that InhA of *Mycobacterium smegmatis* is a Target for Triclosan / L. M. McMurry, P. P. McDermott, S. B. Levy // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1999. – Vol. 43. – P. 711-713.
366. Mersch-Sundermann, V. Genotoxicity of Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Related Structures on *Escherichia coli* PQ37 (SOS-Chromotest) / V. Mersch-Sundermann, S. Kern, F. Wintermann // Environmental and Molecular Mutagenesis. – 1991. – V. 18. – P. 41-50.
367. Methods in Molecular Biology / eds S. O'Hare, C. K. Atterwill. – Totowa, New Jersey : Humana Press, 1995. – Vol. 43. – P. 138-149.
368. Mishra, M. Multi-Drug Resistant Coliform: Water Sanitary Standards and Health Hazards / M. Mishra [et al.] // Frontiers in pharmacology. – **2018**. – Vol. 9. – P. 311-319.
369. Misra, R. Importance of Real-time Assays to Distinguish Multidrug Efflux Pump Inhibiting and Outer Membrane Destabilizing Activities in *Escherichia coli* / R. Misra, K. D. Morrison, H. J. Cho, T. Khuu // Journal of Bacteriology. – **2015**. – Vol. 197. – Issue 15. – P. 2479-2488.
370. Moadab, A. Effectiveness of a Nonrinse, Alcohol-free Antiseptic Hand Wash / A. Moadab, K. F. Rupley, P. Wadhams // Journal of the American Podiatric Medical Association. – 2001. – Vol. 91. – P. 288-293.
371. Mohammadinia, M. Contact Lens Disinfecting Solutions Antibacterial Efficacy: Comparison Between Clinical Isolates and the Standard ISO ATCC Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* / M. Mohammadinia [et al.] // Eye Journal (London). – 2012. – 26(2). – P. 327-330.

372. Mollenkopf, D. F. Variable within- and between-herd diversity of CTX-M cephalosporinase-bearing *Escherichia coli* isolates from dairy cattle / D. F. Mollenkopf [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2012. – Vol. 78. – Issue 13. – P. 4552-4560.
373. Mondello, E. *In Vitro* and *in Vivo* Activity of Tea Tree Oil against Azole-Susceptible and Resistant Human Pathogenic Yeasts / E. Mondello [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2003. – Vol. 51. – P. 1223-1229.
374. Moravej, H. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria / H. Moravej [et al.] // *Microbial Drug Resistance*. – **2018**. – Vol. 24. – Issue 6. – P. 747-767.
375. Morse, S. S. Factors and Determinants of Disease Emergence / S. S. Morse // *Revue scientifique et technique*. – 2004. – Vol. 23. – Issue 2. – P. 443-51.
376. Morse, S. S. Factors in the Emergence of Infectious Diseases / S. S. Morse // *Emerging Infectious Diseases*. – 1995. – Vol. 1. – Issue 1. – P. 7-15.
377. Mortelmans, K. The Ames *Salmonella*/Microsome Mutagenicity Assay [Text] / K. Mortelmans, E. Zeiger // *Mutation Research*. – 2000. – Vol. 455. – P. 29-60.
378. Moskalev, A. Novel Method of Indole Ring System Construction: One-Pot Synthesis of 4- and 6-Nitroindole Derivatives via Base Promoted Reaction Between 3-Nitroaniline and Ketones [Text] / A. Moskalev, M. Makosza // *Tetrahedron Lett.* – 1999. – Vol. 40. – P. 5395-5398.
379. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay / T. Mosmann // *Journal of Immunological Methods*. – 1983. – Vol. 65. – № 1-2. – P. 55-63.
380. Nagai, K. Effects of Amino Acid Alterations in Penicillin-Binding Proteins (PBPs) 1a, 2b, and 2x on PBP Affinities of Penicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Cefditoren, Cefuroxime, Cefprozil, and Cefaclor in 18 Clinical Isolates of Penicillin-Susceptible, -Intermediate, and -Resistant Pneumococci / K. Nagai, T. A. Davies, M. R. Jacobs, P. C. Appelbaum // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2002. – Vol. 46. – P. 1273-1280.

381. Nagaraja, V. DNA Topoisomerase I and DNA Gyrase as Targets for TB Therapy / V. Nagaraja, A. A. Godbole, S. R. Henderson, A. Maxwell // Drug Discovery Today. – **2017**. – Vol. 22. – Issue 3. – P. 510-518.
382. Nagarajan, R. Antibacterial Activities and Modes of Action of Vancomycin and Related Glycopeptides / R. Nagarajan // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1991. – Vol. 35. – Issue 4. – P. 605-609.
383. Naik, J. Hydrazino Dimethyl Substituted Quinolines as Antitubercular/Antibacterial Agents / J. Naik [et al.] // Asian Journal of Chemistry. – 1998. – Vol. 10. – P. 388-390.
384. Nakatsu, T. Biological Activity of Essential Oils and their Constituents / T. Nakatsu [et al.] // Studies in Natural Products Chemistry. – 2000. – Vol. 21. – P. 571-631.
385. Nasab, R. R. Synthesis, Antimicrobial Evaluation and docking studies of some novel quinazolinone Schiff base derivatives / R. R. Nasab, M. Mansourian, F. Hassanzadeh // Research in Pharmaceutical Sciences. – **2018**. – Vol. 13. – Issue 3. – P. 213-221.
386. Nash, A. Mims' Pathogenesis of Infectious Disease / A. Nash, R. Dalziel, J. Fitzgerald. – Academic Press, **2015**. – 6th Edition. – 364 pp.
387. Natan, M. From Nano to Micro: Using Nanotechnology to Combat Microorganisms and their Multidrug Resistance / M. Natan, E. Banin // FEMS Microbiology Reviews. – **2017**. – Vol. 41. – Issue 3. – P. 302-322.
388. Natural Food Antimicrobial Systems / N. Khanna, A. S. Naido; ed. A. S. Naido. – Boca Raton : CRC Press, 2000. – P. 739-781.
389. Nicoletti, G. The Antimicrobial Activity *in Vitro* of Chlorhexidine, a Mixture of Isothiazolines ('Kathon' CG) and Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB) / G. Nicoletti [et al.] // Journal of Hospital Infection. – 1993. – Vol. 23. – P. 87-111.
390. Nieto, G. Biological Activities of Three Essential Oils of the *Lamiaceae* family / G. Nieto // Medicines (Basel). – **2017**. – 4(3). – P. 63.
391. Nikaido, H. Multiple Antibiotic Resistance and Efflux / H. Nikaido // Current Opinion in Microbiology. – 1998. – Vol. 1. – P. 516-523.

392. Obayiuwana, A. Characterization of Bacterial Communities and Their Antibiotic Resistance Profiles in Wastewaters Obtained from Pharmaceutical Facilities in Lagos and Ogun States, Nigeria / A. Obayiuwana, A. Ogunjobi, M. Yang, M. Ibekwe // International Journal of Environmental Research and Public Health. – **2018**. – Vol. 15. – Issue 7. – P. 1365.
393. Oie, S. Disinfection Methods for Spores of *Bacillus atrophaeus*, *B.anthraxis*, *Clostridium tetani*, *C.botulinum* and *C.difficile* / S. Oie [et al.] // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2011. – 34(8). – P. 1325-1329.
394. Ong, H. S. Effect of Azithromycin on a Red Complex Polymicrobial Biofilm / H. S. Ong [et al.] // Journal of Oral Microbiology. – **2017**. – 9(1). – doi: 10.1080/20002297.2017.1339579.
395. Ono, B. -L. Role of Hydrosulfide ions (HS) in Methylmercury Resistance in *Saccharomyces cerevisiae* / B. -L. Ono [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 1991. – Vol. 57. – P. 3183-3186.
396. Pagliero, E. Biochemical Characterization of *Streptococcus pneumoniae* Penicillin-Binding Protein 2b and its Implication in beta-Lactam Resistance // E. Pagliero [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2004. – Vol. 48. – Issue 5. – P. 1848-1855.
397. Parhizgari, N. Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases in Iran / N. Parhizgari, M. M. Gouya, E. Mostafavi // Iranian Journal of Microbiology. – **2017**. – Vol. 9. – Issue 3. – P. 122-142.
398. Parija, S. Textbook of Microbiology and Immunology / S. Parija. – Elsevier India, **2016**. – 3rd Edition. – 640 pp.
399. Petchiappan, A. Antibiotic Resistance: Current Perspectives / A. Petchiappan, D. Chatterji // ACS Omega. – **2017**. – Vol. 2. – Issue 10. – P. 7400-7409.
400. Petrović, D. Conformational Dynamics and Enzyme Evolution / D. Petrović, V. A. Risso, S. C. L. Kamerlin, J. M. Sanchez-Ruiz // Journal of the Royal Society Interface. – **2018**. – Vol. 15. – Issue 144. – 18 pp.

401. Phillips, I. Acetic Acid in the Treatment of Superficial Wounds Infected by *Pseudomonas aeruginosa* / I. Phillips [et al.] // Lancet. – 1968. – Vol. 6. – P. 11-12.
402. Piktel, E. Sporicidal Activity of Ceragenin CSA-13 against *Bacillus subtilis* / E. Piktel // Scientific Reports. – **2017**. – Vol. 7. – doi: 10.1038/srep44452.
403. Pinheiro, S. L. Antimicrobial Efficacy of 2.5% Sodium Hypochlorite, 2% Chlorhexidine, and Ozonated Water as Irrigants in Mesio Buccal Root Canals with Severe Curvature of Mandibular Molars / S. L. Pinheiro [et al.] // European Journal of Dentistry. – **2018**. – 12(1). – P. 94-99.
404. Polikanov, Y. S. The Mechanisms of Action of Ribosome-Targeting Peptide Antibiotics / Y. S. Polikanov, N. A. Aleksashin, B. Beckert, D. N. Wilson // Frontiers in Molecular Biosciences. – **2018**. – Vol. 5. – P. 48-69.
405. Poole, K. Overcoming Antimicrobial Resistance by Targeting Resistance Mechanisms / K. Poole // Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2001. – Vol. 53. – Issue 3. – P. 283-94.
406. Pop-Vicas, A. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria among Patients who Require Chronic Hemodialysis / A. Pop-Vicas, J. Strom, K. Stanley, E. M. D'Agata // Clinical Journal of the American Society of Nephrology. – 2008. – Vol. 3. – Issue 3. – P.752-758.
407. Quillardet, P. SOS-Chromotest, a Direct Assay of a SOS-Function in *Escherichia coli* K12 to Measure genotoxicity / P. Quillardet, O. Huisman, R. D. Ari, M. Hofnung // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States. – 1982. – V. 79. – P. 5971-5975.
408. Quillardet, P. The SOS-Chromotest, a Colorimetric Bacterial Assay for Genotoxins: Procedures / P. Quillardet, M. Hofnung // Mutation Research. – 1985. – 147(3). – 65-78.
409. Rai, Y. Mitochondrial Biogenesis and Metabolic Hyperactivation Limits the Application of MTT Assay in the Estimation of Radiation Induced Growth Inhibition / Y. Rai [et al.] // Scientific Reports. – **2018**. – Vol. 8. – Issue 1. – P. 1531-1546.

410. Ramirez, M. S. Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects for Inhibition / M. S. Ramirez, M. E. Tolmasky // *Molecules*. – **2017**. – Vol. 22. – Issue 12. – P. E2267.
411. Ramiz, A. B. Antimicrobial Dyes and Mechanosensitive Channels / A. B. Ramiz // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2013. – Vol. 104. – Issue 2. – P. 155–167.
412. Ramos-Nino, M. E. Quantitative Structure Activity Relationship for the Effect of Benzoic Acids, Cinnamic Acids and Benzaldehydes on *Listeria monocytogenes* / M. E. Ramos-Nino, M. N. Clifford, M. R. Adams // *Journal of Applied Bacteriology*. – 1996. – Vol. 80. – P. 303-310.
413. Rediguieri, C. F. Ozone Gas as a Benign Sterilization Treatment for PLGA Nanofiber Scaffolds / C. F. Rediguieri [et al.] // *Tissue Engineering Part C: Methods*. – **2016**. – 22(4). – P. 338-347.
414. Reens, A. L. A Cell-Based Infection Assay Identifies Efflux Pump Modulators that Reduce Bacterial Intracellular Load / A. L. Reens [et al.] // *PLoS Pathogens*. – **2018**. – Vol. 14. – Issue 6. – 29 pp.
415. Reger, N. A. Antimicrobial Activity of Nitric Oxide-Releasing Ti-6Al-4V Metal Oxide / N. A. Reger, W. S. Meng, E. S. Gawalt // *Journal of functional biomaterials*. – **2017**. – Vol. 8. – Issue 2. – P. 20-36.
416. Reimer, K. Antimicrobial Effectiveness of Povidone-Iodine and Consequences for New Application Areas / K. Reimer [et al.] // *Dermatology*. – 2002. – Vol. 204. – P. 114-120.
417. Reinert, R. R. Ribosomal Mutations Conferring Resistance to Macrolides in *Streptococcus pneumoniae* Clinical Strains Isolated in Germany / R. R. Reinert [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2003. – Vol. 47. – P. 2319-2322.
418. Renslo, A. R. Antibacterial Oxazolidinones: Emerging Structure-Toxicity Relationships / A. R. Renslo // *Expert Review of Anti-infective Therapy*. – 2010. – Vol. 8. – Issue 5. – P. 565-574.
419. Richardson, E. L. Update: Frequency of Preservative Use in Cosmetic Formulas as Disclosed to FDA / E. L. Richardson // *Cosmetics and Toiletries*. – 1981. – Vol. 96. – P. 91-92.

420. Riedel, S. Determination of Disk Diffusion and MIC Quality Control Guidelines for High-Dose Cefepime-Tazobactam (WCK 4282), a Novel Antibacterial Combination Consisting of a β -Lactamase Inhibitor and a Fourth-Generation Cephalosporin / S. Riedel [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – **2017**. – Vol. 55. – Issue 10. – P. 3130-3134.
421. Roberts, M. C. Nomenclature for Macrolide and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Determinants / M. C. Roberts [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1999. – Vol. 43. – P. 2823-2830.
422. Romaniuk, J. A. Bacterial Cell Wall Composition and the Influence of Antibiotics by Cell-Wall and Whole-Cell NMR / J. A. Romaniuk, L. Cegelski // Philosophical Transactions of The Royal Society B. Biological Sciences. – **2015**. – Vol. 370. – Issue 1679. – 14 pp.
423. Rose, M. S. The Interaction of Triethyltin with a Component of Guinea-Pig Liver Supernatant [Text] / M. S. Rose, E. A. Lock // Biochemical Journal. – 1970. – Vol. 190. – P. 151-157.
424. Rosin, M. The Effect of a Polyhexamethylene Biguanide Mouthrinse Compared to an Essential Oil Rinse and a Chlorhexidine Rinse on Bacterial Counts and 4-Day Plaque Regrowth / M. Rosin [et al.] // Journal of Clinical Periodontology. – 2002. – Vol. 29. – P. 392-399.
425. Rossi-Fedele, G. Influence of pH Changes on Chlorine-Containing Endodontic Irrigating Solutions / G. Rossi-Fedele [et al.] // International Endodontic Journal. – 2011. – 44(9). – 792-799.
426. Rossmore, H. W. Applications and Mode of Action of Formaldehyde Condensate Biocides [Text] / H. W. Rossmore, M. Sondossi // Advances in Applied Microbiology. – 1988. – Vol. 33. – P. 223-277.
427. Rostami, H. Some Biological Activities of Pigments Extracted from *Micrococcus roseus* (PTCC 1411) and *Rhodotorula glutinis* (PTCC 5257) / H. Rostami, H. Hamed, M. Yolmeh // International Journal of Immunopathology and Pharmacology. – **2016**. – Vol. 29. – Issue 4. – P. 684-695.

428. Ruiz-Roldán, L. *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spanish Children: Occurrence in Faecal Samples, Antimicrobial Resistance, Virulence, and Molecular Typing / L. Ruiz-Roldán [et al.] // BioMed Research International. – **2018**. – Vol. 2018. – P. 8060178.
429. Rusin, P. Rapid Reduction of *Legionella pneumophila* on Stainless Steel with Zeolite Coatings Containing Silver and Zinc Ions / P. Rusin, K. Bright, C. Gerba // Letters in Applied Microbiology. – 2003. – Vol. 36. – P. 69-72.
430. Russell, A. D. Activity of Biocides against Mycobacteria / A. D. Russell // Journal of Applied Bacteriology, Symposium Supplement. – 1996. – Vol. 81. – P. 87S-101S.
431. Russell, A. D. Mechanisms of Bacterial Insusceptibility to Biocides / A. D. Russell // American Journal of Infection Control. – 2001. – 29(4). – P. 259-261.
432. Russell, A. D. Plasmids and Bacterial Resistance to Biocides / A. D. Russell // Journal of Applied Microbiology. – 1997. – Vol. 82. – P. 155-165.
433. Russell, A. D. Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization / A. D. Russell, W. B. Hugo, G. A. J. Ayliffe, eds A. P. Fraiese, P. A. Lambert. – 4th ed. – Massachussetts : Blackwell Publishing, 2004. – 689 pp.
434. Russell, A. D. Understanding Antibacterial Action and Resistance / A. D. Russell, I. Chopra. – 2nd edn. – Chichester : Ellis Horwood, 1996. – 292 pp.
435. Russell, A. D. Antibacterial Action and Activity of Silver [Text] / A. D. Russell, W. B. Hugo // Progress in Medicinal Chemistry. – 1994. – Vol. 31. – P. 351-371.
436. Sabalitschka, T. Chemical Constitution and Preservative Properties [Text] / T. Sabalitschka, R. K. Dietrich // Disinfection. – 1990. – Vol. 11. – P. 67-71.
437. Saenz-Méndez, P. Ligand Selectivity between the ADP-Ribosylating Toxins: An Inverse-Docking Study for Multitarget Drug Discovery / P. Saenz-Méndez, M. Eriksson, L. A. Eriksson // ACS Omega. – **2017**. – Vol. 2. – Issue 4. – P. 1710-1719.
438. Sakinc, T. Influence of a 23S Ribosomal RNA Mutation in *Helicobacter pylori* Strains on the *in Vitro* Synergistic Effect of Clarithromycin and Amoxicillin / T. Sakinc [et al.] // BMC Research Notes. – 2012. – Vol. 5. – P. 603.

439. Sanyal, G. Bacterial DNA Replication Enzymes as Targets for Antibacterial Drug Discovery / G. Sanyal, P. Doig // Expert Opinion on Drug Discovery. – 2012. – Vol. 7. – Issue 4. – P. 327-39.
440. Sartelli, M. Antimicrobials: a Global Alliance for Optimizing their Rational Use in Intra-Abdominal Infections (AGORA) / M. Sartelli [et al.] // World Journal of Emergency Surgery. – **2016**. – Vol. 11. – P. 33-65.
441. Savjani, J. K. Mechanisms of Resistance: Useful Tool to Design Antibacterial Agents for Drug - Resistant Bacteria / J. K. Savjani, A. K. Gajjar, K. T. Savjani // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. – 2009. – Vol. 9. – Issue 2. – P. 194-205.
442. Schanno, R. J. Evaluation of 1,3-Dimethylol-5,5-dimethylhydantoin as a Cosmetic Preservative / R. J. Schanno, J. R. Westlund, D. H. Foelsch // Journal of the Society of Cosmetic Chemists. – 1980. – Vol. 31. – P. 85-96.
443. Schedler, K. Proposed Phase 2/ step 2 *in Vitro* Test on Basis of EN 14561 for Standardised Testing of the Wound Antiseptics PVP-Iodine, Chlorhexidine Digluconate, Polihexanide and Octenidine Dihydrochloride / K. Schedler [et al.] // BMC Infectious Diseases. – **2017**. – 17(1). – P. 143.
444. Schweizer, I. New Aspects of the Interplay between Penicillin Binding Proteins, murM, and the Two-Component System CiaRH of Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Serotype 19A Isolates from Hungary / I. Schweizer [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – **2017**. – Vol. 61. – Issue 7. – P. e00414-00417
445. Septimus, E. J. Clinical Challenges in Addressing Resistance to Antimicrobial Drugs in the Twenty-First Century / E. J. Septimus, K. M. Kuper // International journal of clinical pharmacology and therapeutics. – 2009. – Vol. 86. – Issue 3. – P. 336-339.
446. Setlow, B. Mechanisms of Killing Spores of *Bacillus subtilis* by Acid, Alkali and Ethanol / B. Setlow [et al.] // Journal of Applied Microbiology. – 2002. – 92. – P. 362-375.

447. Shahsavan, S. Investigation of Efflux-Mediated Tetracycline Resistance in *Shigella* Isolates Using the Inhibitor and Real Time Polymerase Chain Reaction Method / S. Shahsavan [et al.] // Iranian Journal of Pathology. – **2017**. – Vol. 12. – Issue 1. – P. 53-61.
448. Sharifzadeh, S. Novel Electrophilic Scaffold for Imaging of Essential Penicillin-Binding Proteins in *Streptococcus pneumoniae* / S. Sharifzadeh [et al.] // ACS Chemical Biology. – **2017**. – Vol. 12. – Issue 11. – P. 2849-2857.
449. Sharma, C. Antimicrobial Resistance: Its Surveillance, Impact, and Alternative Management Strategies in Dairy Animals / C. Sharma [et al.] // Frontiers in veterinary science. – **2017**. – Vol. 4. – P. 237.
450. Sharma, N. A PiggyBac Mediated Approach for Lactoferricin Gene Transfer in Bovine Mammary Epithelial Stem Cells for Management of Bovine Mastitis / N. Sharma [et al.] // Oncotarget. – **2017**. – 8(61). – P. 104272-104285. – doi: 10.18632/oncotarget.22210.
451. Shaw, B. E. The synthesis of Nitro- and Aminoindoles Analogous to Serotonin [Text] / B. E. Shaw, D. W. Woolley // Journal of the American Chemical Society. – 1953. – Vol. 75. – № 8. – P. 1877-1881.
452. Shin, S. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its Synergism with Ketoconazole [Text] / S. Shin, C. -A. Kang // Letters in Applied Microbiology. – 2003. – Vol. 36. – P. 111-115.
453. Simon, E. W. Mechanisms of Dinitrophenol Toxicity / E. W. Simon // Biological Reviews. – 1953. – Vol. 28. – P. 453-479.
454. Simpson, G. D. Chlorine Dioxide: the 'Ideal' Biocide / G. D. Simpson [et al.] // Speciality Chemicals. – 2001. – Vol. 20. – P. 358-359.
455. Smith, A. M. Non-Penicillin-Binding Protein Mediated High-Level Penicillin and Cephalosporin Resistance in a Hungarian Clone of *Streptococcus pneumoniae* / A. M. Smith, K. P. Klugman // Microbiology and Drug Resistance. – 2000. – Vol. 6. – Issue 2. – P. 105-110.
456. Smith, P. J. Organotin Compounds and Applications [Text] / P. J. Smith, L. Smith // Chemistry in Britain. – 1975. – Vol. 11. – P. 208-212, 226.

457. Smyth, E. Prevalence of Resistant *Pseudomonas aeruginosa* with Elective and Rescue Intravenous Antibiotic Regimens in Children with Cystic Fibrosis / E. Smyth [et al.] // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2005. – Vol. 26. – Issue 1. – P. 95-96.
458. Snitkin, E. S. Tracking a Hospital Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumonia* with Whole-Genome Sequencing / E. S. Snitkin [et al.] // Science Translational Medicine. – 2012. – Vol. 4. – P. 148ra116. doi:10.1126/scitranslmed.3004129.
459. Soyege, A. O. Vancomycin and Oxacillin Co-Resistance of Commensal Staphylococci / A. O. Soyege [et al.] // Jundishapur Journal of Microbiology. – 2014. – Vol. 7. – Issue 4. – P. e9310.
460. Spacciapoli, P. Antimicrobial Activity of Silver Nitrate against Periodontal Pathogens / P. Spacciapoli [et al.] // Journal of Periodontal Research. – 2001. – Vol. 36. – 108-113.
461. Specification for Black and White Disinfectants. – BS 2462:1986, 1991.
462. Speier, J. L. Destruction of Microorganisms by Contact with Solid Surfaces [Text] / J. L. Speier, J. R. Malek // Journal of Colloid and Interfacial Science. – 1982. – Vol. 89. – P. 68-76.
463. Spotts, R. A. Effects of the Nonionic Surfactant Ag-98 on Three Decay Fungi of Anjou Pear [Text] / R. A. Spotts, L. A. Cervantes // Plant disease. – 1987. – Vol. 71. – P. 240-242.
464. Spratt, B. G. Hybrid Penicillin-Binding Proteins in Penicillin-Resistant Strains of *Neisseria gonorrhoeae* / B. G. Spratt // Nature. – 1988. – Vol. 332. – P. 173-176.
465. **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. Batarшева, M. A. Mironov // Research Results in Pharmacology. – 2018. – Vol. 4. – Issue 3. – P. 17-26.
466. **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.

467. Strateva, T. *Pseudomonas aeruginosa* a phenomenon of bacterial resistance / T. Strateva, D. Yordanov // Journal of Medical Microbiology. – 2009. – Vol. 58. – P. 1133-1148.
468. Suhr, K. I. Antifungal Activity of Essential Oils Evaluated by Two Different Application Techniques against Rye Bread Spoilage Fungi [Text] / K. I. Suhr, P. V. Nielsen // Journal of Applied Microbiology. – 2003. – Vol. 94. – P. 665-674.
469. Suner, A. Evaluation of Infectious Diseases and Clinical Microbiology Specialists' Preferences for Hand Hygiene: Analysis Using the Multi-Attribute Utility Theory and the Analytic Hierarchy Process Methods // A. Suner [et al.] // BMC Medical Informatics and Decision Making. – **2017**. – 17(1). – P. 129. – doi: 10.1186/s12911-017-0528-z.
470. Suresh, R. S. Pyrene Degradation by *Chlorella* sp. MM3 in Liquid Medium and Soil Slurry: Possible Role of Dihydrolipoamide Acetyltransferase in Pyrene Biodegradation / Suresh R. S. [et al.] // Algal Research. – **2017**. – Vol. 23. – P. 223-232.
471. Szczepanowski, R. Detection of 140 Clinically Relevant Antibiotic-Resistance Genes in the Plasmid Metagenome of Wastewater Treatment Plant Bacteria Showing Reduced Susceptibility to Selected Antibiotics / R. Szczepanowski [et al.] // Microbiology. – 2009. – Vol. 155. – Issue 7. – P. 2306-2319.
472. Tacconelli, E. Discovery, Research, and Development of New Antibiotics: the WHO Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria and Tuberculosis / E. Tacconelli [et al.] // The Lancet Infectious Diseases. – **2018**. – Vol. 18. – Issue 3. – P. 318-327.
473. Tariq, M. Treatment Modalities and Evaluation Models for Periodontitis / M. Tariq [et al.] // International Journal of Pharmaceutical Investigation. – 2012. – 2(3). – P. 106-122.
474. Tenover, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria / F. C. Tenover // The American Journal of Medicine. – 2006. – Vol. 119. – P. S3-S10.

475. Thampuran, N. Effect of Chemical Agents on Swarming of *Bacillus species* [Text] / N. Thampuran, P. K. Surendran // Journal of Applied Bacteriology. – 1996. – Vol. 80. – P. 296-302.
476. Thomson, J. M. The Threat of Antibiotic Resistance in Gram-Negative Pathogenic Bacteria: β -Lactams in Peril! / J. M. Thomson, R. Bonomo // Current Opinion in Microbiology. – 2005. – Vol. 8. – P. 518-24.
477. Tjotta, E. Survival of HIV-1 Activity after Disinfection, Temperature and pH Changes, or Drying / E. Tjotta, O. Hungnes, B. Grinde // Journal of Medical Virology. – 1991. – Vol. 35. – P. 223-227.
478. Toler, J. C. Preservative Stability and Preservative Systems / J. C. Toler // International Journal of Cosmetic Sciences. – 1985. – Vol. 7. – P. 157-164.
479. Tolmasky, M. E. Bacterial Resistance to Aminoglycosides and beta-Lactams: the Tn1331 Transposon Paradigm / M. E. Tolmasky // Frontiers of Bioscience. – 2000. – Vol. 5. – P. D20-29.
480. Tomberg, J. Alanine 501 Mutations in Penicillin-Binding Protein 2 from *Neisseria gonorrhoeae*: Structure, Mechanism, and Effects on Cephalosporin Resistance and Biological Fitness / J. Tomberg [et al.] // Biochemistry. – **2017**. – Vol. 56. – Issue 8. – P. 1140-1150.
481. Traore, O. Compariosn of *in Vivo* Antibacterial Activity of Two Skin Disinfection Procedures for Insertion of Peripheral Catheters: Povidone Iodine Versus Chlorhexidine / O. Traore [et al.] // Journal of Hospital Infection. – 2000. – Vol. 44. – P. 147-150.
482. Tsai, J. C. Antiseptic Effect of Conventional Povidone-Iodine Scrub, Chlorhexidine Scrub, and Waterless Hand Rub in a Surgical Room: a Randomized Controlled Trial / J. C. Tsai [et al.] // Infection Control and Hospital Epidemiology. – **2017**. – 38(4). – P. 417-422.
483. Tsai, L. -S. Prevention of Potato Spoilage during Storage by Chlorine Dioxide / L. -S. Tsai, C. C. Huxsoll, G. Robertson // Journal of Food Science. – 2001. – Vol. 66. – P. 472-477.

484. Tsutsumi, L. S. Progress in the Discovery of Treatments for *Cl.difficile* Infection: A Clinical and Medicinal Chemistry Review / L. S. Tsutsumi, Y. B. Owusu, J. G. Hurdle, D. Sun // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – **2014**. – Vol. 14. – Issue 1. – P. 152-75.
485. Tyler, R. Virucidal Activity of Disinfectants: Studies with the Poliovirus / R. Tyler, G. A. J. Ayliffe, G. Bradley // *Journal of Hospital Infection*. – 1990 – Vol. 15. – P. 339-345.
486. Ultee, A. The Phenolic Hydroxyl group of Carvacrol is Essential for Action against the Food Borne Pathogen *Bacillus cereus* / A. Ultee, M. H. J. Bennik, R. Moezelaar // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2002. – Vol. 68. – P. 1561-1568.
487. Uphoff, S. Real-Time Dynamics of Mutagenesis Reveal the Chronology of DNA Repair and Damage Tolerance Responses in Single Cells / S. Uphoff // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – **2018**. – Vol. 115. – Issue 28. – P. E6516-E6525.
488. Usary, J. Erythromycin Inhibition of 50S Ribosomal Subunit Formation in *Escherichia coli* Cells [Text] / J. Usary, W. S. Champney // *Molecular Microbiology*. – 2001. – Vol. 40. – Issue 4. – P. 951-962.
489. Vaara, M. Agents Increase the Permeability of the Outer Membrane / M. Vaara // *Microbiological Reviews*. – 1992. – Vol. 56. – P. 395-411.
490. van Bueren, J. Inactivation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Alcohols / J. van Bueren, D. P. Larkin, R. A. Simpson // *Journal of Hospital Infection*. – 1994. – Vol. 28. – P. 137-148.
491. Vannuffel, P. Identification of a Single Base Change in Ribosomal RNA Leading to Erythromycin Resistance / P. Vannuffel, M. Di Giambattista, E. A. Morgan, C. Cocito // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – Vol. 267. – P. 8377-8382.
492. Vannuffel, P. Mechanism of Action of Streptogramins and Macrolides / P. Vannuffel, C. Cocito // *Drugs*. – 1996. – Vol. 51. – P. S20-S23.

493. Varadan, P. Comparison of the Antibacterial Efficacy of Alexidine and Chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*: an *in Vitro* Study / P. Varadan [et al.] // *Cureus*. – **2017**. – 9(10). – doi: 10.7759/cureus.1805.
494. Vargason, A. M. Clinical Translation of Microbe-Based Therapies: Current Clinical Landscape and Preclinical Outlook / A. M. Vargason, A. C. Anselmo // *Bioengineering & Translational Medicine*. – **2018**. – Vol. 3. – Issue 2. – P. 124-137.
495. Varnek, A. Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening / eds. A. Varnek, A. Tropsha. – Cambridge (UK): RSC Publishing, 2008. – 335 pp.
496. Vázquez-Laslop, N. How Macrolide Antibiotics Work / N. Vázquez-Laslop, A. S. Mankin // *Trends in Biochemical Sciences*. – **2018**. – Vol. 43. – Issue 9. – P. 668-684.
497. Veidelek, Z. J. Über die Synthes von 2,3-Dialkylsubstituierten Bz-Aminoindolen und Bz-Methoxyindolen / Z. J. Veidelek // *Collection of Chemistry Communication*. – 1957. – Vol. 22. – № 6. – P. 1852-1858.
498. Wainwright, M. Acridine – a Neglected Antibacterial Chromophore / M. Wainwright // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2001. – Vol. 47. – P. 1-13.
499. Walsh, S. E. Mechanisms of Action of Selected Biocidal Agents on Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria / S. E. Walsh [et al.] // *Journal of Applied Microbiology*. – 2003. – Vol. 94. – P. 240-247.
500. Walsh, S. E. Possible Mechanisms for the Relative Efficacies of *ortho*-Phthalaldehyde and Glutaraldehyde against Glutaraldehyde-Resistant *Mycobacterium chelonae* / S. E. Walsh [et al.] // *Journal of Applied Microbiology*. – 2001. – Vol. 91. – P. 80-92.
501. Wang, C. X. Is the Stella™ 5L System an Effective Cold Sterilization Technique for Needle-Based Confocal Miniprobos? / C. X. Wang [et al.] // *Endoscopic Ultrasound*. – **2017**. – 6(3). – P. 201-204.

502. Wang, F. BrlR from *Pseudomonas aeruginosa* is a Receptor for Both Cyclic di-GMP and Pyocyanin / F. Wang [et al.] // Nature Communications. – **2018**. – Vol. 9. – Issue 1. – P. 2563-2577.
503. Wang, G. Site-Specific Mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* Confer Two Types of Resistance to Macrolide–Lincosamide–Streptogramin B Antibiotics / G. Wang, D. E. Taylor // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1998. – Vol. 42. – P. 1952-1958.
504. Wang, X. Antibiotic Use and Abuse: a Threat to Mitochondria and Chloroplasts with Impact on Research, Health, and Environment / X. Wang, D. Ryu, R. H. Houtkooper, J. Auwerx // BioEssays. – **2015**. – Vol. 37. – Issue 10. – P. 1045-53.
505. Wang, X. Design, Synthesis and Antibacterial Evaluation of some New 2-Phenyl-Quinoline-4-Carboxylic Acid Derivatives / X. Wang [et al.] // Molecules. – **2016**. – 21(3). – P. 340. – doi: 10.3390/molecules21030340.
506. Washington, M. A. First Description of a Cefixime- and Ciprofloxacin-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Isolate with Mutations in Key Antimicrobial Susceptibility-Determining Genes from the Country of Georgia / M. A. Washington [et al.] // New Microbes and New Infections. – **2018**. – Vol. 24. – P. 47-51.
507. Weinberg, E. D. Human Lactoferrin: a Novel Therapeutic with Broad Spectrum Potential / E. D. Weinberg // Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2001. – Vol. 53. – P. 1303-1310.
508. Weinberg, E. D. The Mutual Effect of Antimicrobial Compounds and Metallic Cations / E. D. Weinberg // Bacteriological Reviews. – 1957. – Vol. 21. – P. 46-68.
509. Weisblum, B. Erythromycin Resistance by Ribosome Modification / B. Weisblum // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1995. – Vol. 39. – P. 577-585.
510. Wickens, H. Understanding Antibiotic Resistance / H. Wickens, P. Wade // Pharmaceutical Journal. – 2005. – Vol. 274. – P. 501-504.

511. Wierzbowski, A. K. Macrolide Resistance Mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* Isolated over 6 years of Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study (CROSS) (1998 2004) / A. K. Wierzbowski [et al.] // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2007. – Vol. 60. – Issue 4. – P. 733-40.
512. Wijesiri, N. Photodynamic Inactivation of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Using Hybrid Photosensitizers Based on Amphiphilic Block Copolymer-Functionalized Gold Nanoparticles / N. Wijesiri [et al.] // ACS Omega. – **2017**. – Vol. 2. – Issue 9. – P. 5364-5369.
513. Wilke, M. S. β -Lactam Antibiotic Resistance: a Current Structural Perspective / M. S. Wilke, A. L. Lovering, N. C. J. Strynadka // Current Opinion in Microbiology. – 2005. – Vol. 8. – P. 525-533.
514. Willey, J. M. Prescott's Microbiology / J. M. Welley, L. M. Sherwood, C. J. Woolverton. – **2018**. – 9 ed. – New York : McGraw-Hill Companies. – 1139 pp.
515. Williams, D. H. An Analysis of the Origins of a Cooperative Binding Energy of Dimerization / D. H. Williams, A. J. Maguire, W. Tsuzuki, M. S. Westwell // Science. – 1998. – Vol. 280. – P. 711-714.
516. Williams, N. D. The Effects of some Halogen-Containing Compounds on *Bacillus subtilis* Endospores [Text] / N. D. Williams, A. D. Russell // Journal of Applied Bacteriology. – 1991. – Vol. 70. – P. 427-436.
517. Williamson, D. A. Current and Emerging Topical Antibacterials and Antiseptics: Agents, Action, and Resistance Patterns / D. A. Williamson, G. P. Carter, B. P. Howden // Clinical Microbiology Reviews. – **2017**. – 30(3). – P. 827-860.
518. Wolf, P. A. The Antimicrobial Activity of Several Substituted Pyrenes [Text] / P. A. Wolf, W. M. Westveer // Archives of Biochemistry. – 1950. – Vol. 28. – P. 201-206.
519. World Health Organization. The Top 10 Causes of Death. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html> (accessed 15 January **2015**).

520. Xia, J. Structure-Function Relationship of Acyl Amino Acid Surfactants: Surface Activity and Antimicrobial Properties / J. Xia, Y. Xia, I. A. Nnanna // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1995. – 43(4). – P. 867-871.
521. Xin, L. T. Discovery of DNA Topoisomerase I Inhibitors with Low-Cytotoxicity Based on Virtual Screening from Natural Products / L. T. Xin [et al.] // *Marine Drugs*. – **2017**. – Vol. 15. – Issue 7. – P. 217-226.
522. Xu, J. Primary Clofazimine and Bedaquiline Resistance among Isolates from Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis / J. Xu [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – **2017**. – Vol. 61. – Issue 6. – P. e00239-17.
523. Yadav, N. Graphene Oxide-Coated Surface: Inhibition of Bacterial Biofilm Formation due to Specific Surface-Interface Interactions / N. Yadav [et al.] // *ACS Omega*. – **2017**. – Vol. 2. – Issue 7. – P. 3070-3082.
524. Yamashkin, S. A. Reaction of 2,3-Dimethyl- and 1,2,3-Trimethyl-6-Amino-Indoles with Ethyl 4,4,4-Trifluoroacetoacetate / S. A. Yamashkin, E. A. Oreshkina, M. A. Yurovskaya // *Moscow University Chemistry Bulletin*. – 2007. – Vol. 62. – № 2. – P.105-108.
525. Yamashkin, S. A. Synthesis of Functionally Pyrrolo[3,2-h]quinjlines from 2,3-Dimetil- and 1,2,3-Trimetil-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.
526. Yamashkin, S. A. Synthesis of Pyrroloquinolines From Substituted 6-Aminoindoles and Oxalacetic Ester / S. A. Yamashkin, N. V. Zhukova, **I. S. Romanova (I. S. Stepanenko)** // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. – 2008. – Vol. 44. – № 7. – P.793-801.
527. Yamashkin, S. A. The Potential Use 6-Amino-5-Methoxy(Methyl)-2,3-Dimethyl- and 6-Amino-5-Methoxy(Methyl)-1,2,3-Trimethylindoles in Synthesis Pyrrolo[2,3-f]quinolines / S. A. Yamashkin, E. A. Oreshkina, **I. S. Romanova (I. S. Stepanenko)**, M. A. Yurovskaya // *Chemistry of Heterocyclic*. – 2006. – Vol. 42. – № 1. – P. 86-91.

528. Yang, C. Phytogetic Compounds as Alternatives to In-Feed Antibiotics: Potentials and Challenges in Application / C. Yang [et al.] // Journal of Pathogens. – **2015**. – 4(1). – P. 137-156.
529. Yim, J. Use of Ceftaroline Fosamil in Children: Review of Current Knowledge and its Application / J. Yim, L. M. Molloy, J. G. Newland // Infectious Diseases and Therapy. – **2016**. – Vol. 6. – Issue 1. – P. 57-67.
530. Yokoyama, M. Epistasis Analysis Uncovers Hidden Antibiotic Resistance-Associated Fitness Costs Hampering the Evolution of MRSA / M. Yokoyama [et al.] // Genome Biology. – **2018**. – Vol. 19. – Issue 1. – P. 94.
531. Yoshinari, M. Influence of Surface Modifications to Titanium on Antibacterial Activity *in Vitro* / M. Yoshinari [et al.] // Biomaterials. – 2001. – Vol. 22. – P. 2043-2048.
532. Zaragoza, M. Handwashing with Soap or Alcoholic Solutions? A Randomized Clinical Trial of its Effectiveness / M. Zaragoza [et al.] // American Journal of Infection Control. – 1999. – Vol. 27. – P. 258-261.
533. Zeelie, J. J. Effects of Copper and Zinc Ions on the Germicidal Properties of Two Popular Pharmaceutical Antiseptic Agents Etylpyridinium Chloride and Povidone-Iodine [Text] / J. J. Zeelie, T. J. McCarthy // Analyst. – 1998. – Vol. 123. – P. 503-507.
534. Zhao, J. Association of Furanone C-30 with Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* / J. Zhao [et al.] // Indian Journal of Medical Research. – **2018**. – Vol. 147. – Issue 4. – P. 400-406.
535. Zhuangzhuang, C. Characterization of Antimicrobial Poly (Lactic Acid)/Nano-Composite Films with Silver and Zinc Oxide Nanoparticles / C. Zhuangzhuang [et al.] // Materials. – **2017**. – Vol. 10. – P. 659-672.