

Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет

ДРОНОВА МАРІЯ ЛЕОНІДІВНА

УДК 615.015:547.435.4:615.281.9

ФАРМАКОДИНАМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ ДІЇ
НОВИХ ПОХІДНИХ АРИЛАЛІФАТИЧНИХ АМІНОСПИРТІВ

14.03.05 – фармакологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі фармакології протимікробних засобів
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»

**Науковий
керівник:**

доктор медичних наук
ВРИНЧАНУ Ніна Олексіївна,
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»,
завідувач відділу фармакології протимікробних засобів

**Офіційні
опоненти:**

доктор медичних наук, професор
ШТРИГОЛЬ Сергій Юрійович,
Національний фармацевтичний університет МОЗ України,
завідувач кафедри фармакології

доктор фармацевтичних наук, старший науковий співробітник
ГОРДІЄНКО Анатолій Дмитрович,
Харківська державна зооветеринарна академія МОН України,
професор кафедри фармакології і токсикології

Захист відбудеться " 11 " листопада 2016 року о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий " 8 " жовтня 2016 року.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради,
д. фарм. н., професор

Т. С. Сахарова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Впровадження в ХХ столітті у медичну практику перших антибактеріальних засобів (сальварсану, пеніциліну, стрептоміцину) дало надію на повне звільнення людства від інфекційних хвороб. Але, незважаючи на наявність в теперішній час у медичній практиці значної кількості антимікробних препаратів (понад 30 класів), проблема лікування пацієнтів із хворобами, викликаними мікроорганізмами, залишається актуальною (А.Г. Салманов та співавт., 2010; Н. Cadman et al., 2014). Так, за даними ВООЗ у 2012 р. смертність від інфекційних хвороб сягала 40,0 % (World health statistics, 2015), в Україні щорічно по медичну допомогу з приводу інфекційної патології звертається 8–9 млн. осіб (І.Г. Маркович, 2015).

Однією з причин недостатньої ефективності сучасних антимікробних препаратів є формування резистентності у мікроорганізмів. Швидке розповсюдження стійких штамів збудників дає підстави стверджувати про поглиблення кризи антибіотикотерапії та небезпеку повернення до «ери без антибіотиків» (S. Ashkenazi, 2013). Згідно з даними ВООЗ, резистентні штами бактерій та грибів виділяють з високою частотою в усіх країнах світу: до 100,0 % штамів *K. pneumonia* виявились резистентними до дії цефалоспоринів III покоління, *S. pneumonia* – до пеніцилінів, *S. aureus* – до бета-лактамінів, *E. coli*, *Salmonella* spp. та *Shigella* spp. – до фторхінолонів (Н. Cadman et al., 2014). Надзвичайно небезпечними є полірезистентні мікроорганізми (бета-лактамазо- та карбапенемазопродукуючі штами, *MRSA*, *MRSE*, *VRE* та інш.). Захворювання, спричинені стійкими до дії антибіотиків штамми, потребують значних матеріальних витрат на лікування, призводять до збільшення терміну перебування пацієнтів у стаціонарі та, найголовніше – до зростання смертності (W. Vereket, 2012). Так, летальність при бактеріємії, спричиненій бета-лактамазопродукуючими штамми ентеробактерій, сягає 30,9 % (Т.М. Ng, 2016).

Широке розповсюдження резистентності мікроорганізмів до антимікробних препаратів потребує запровадження невідкладних заходів. ВООЗ прийнято «Глобальний план дій щодо стримування стійкості до антимікробних препаратів» (2015 р.), в якому одним із шляхів боротьби з антибіотикорезистентністю є пошук та розробка нових препаратів. Проте, незважаючи на надзвичайну потребу у антимікробних засобах, за останнє десятиліття в медичну практику було впроваджено тільки 2 принципово нові класи антибіотиків: плевомутиліни та макроциклічні антибіотики (С.У. De Souza Mendes et al., 2013; Т.А. Бухтіарова, 2015).

Новим перспективним класом сполук є похідні арилаліфатичних аміноспиртів, оскільки вони виявляють широкий спектр біологічної активності (М.Г. Малакян и соавт., 2010; А. Rainer et al., 2011), зокрема і антибактеріальну та антифунгальну дію (О. Kondoh, 2005; М. Yerramilli, 2005). Оцінка перспективності сполук цього хімічного класу для створення нових ефективних та безпечних препаратів може бути здійснена після проведення цілеспрямованих досліджень з визначення спектру активності, фармакодинамічних особливостей їх дії, ефективності при місцевому та генералізованому інфекційних процесах, чому і була присвячена дисертаційна робота.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом науково-дослідних робіт відділу фармакології протимікробних засобів ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»: «Фармакодинамічні

аспекти протимікробної активності нових похідних арилаліфатичних аміноспиртів» (№ державної реєстрації 0112U000828) та «Дослідження впливу аміноспиртів з адамантильним або N-алкіларильним радикалом на процеси плівкоутворення монокультур бактерій, грибів та мікробних асоціацій» (№ державної реєстрації 0115U002442), співвиконавцем яких є дисертант.

Мета і задачі дослідження. Мета роботи – експериментально обґрунтувати доцільність розробки нових антибактеріальних засобів на підставі дослідження фармакодинаміки похідних арилаліфатичних аміноспиртів.

Для досягнення поставленої мети сформульовані такі задачі:

1. У скринінгових дослідженнях вивчити активність 42 похідних арилаліфатичних аміноспиртів по відношенню до еталонних тест-штамів мікроорганізмів та проаналізувати залежність антимікробної дії від хімічної структури сполук.
2. У експериментах *in vitro* визначити спектр антибактеріальної дії найактивніших сполук по відношенню до планктонних мікроорганізмів, чутливість біоплівкових форм, встановити особливості дії (бактерицидна чи бактериостатична), наявність постантибіотичного ефекту та можливість формування резистентності у бактерій.
3. Виділити найбільш активну сполуку, визначити її токсичність і безпеку, оцінити ефективність *in vivo* на моделях генералізованого та місцевих гнійно-запальних процесів.
4. Визначити зміни в ультраструктурі грампозитивних і грамнегативних бактерій при дії арилаліфатичних аміноспиртів.
5. Дослідити вплив найбільш активної сполуки на мембранний апарат бактерій (проникність цитоплазматичної мембрани, склад зовнішньої мембрани, ефлюкс).
6. Вивчити здатність найбільш активної сполуки впливати на показники метаболізму бактерій (жирнокислотний склад, вміст білка та нуклеїнових кислот, активність дихання).

Об'єкт дослідження – інфекційно-запальні процеси бактеріального генезу.

Предмет дослідження – антибактеріальні властивості нових похідних арилаліфатичних аміноспиртів.

Методи дослідження. Мікробіологічні, токсикологічні, імунологічні, фармакологічні, біохімічні, фізико-хімічні, електронно-мікроскопічні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше теоретично обґрунтовано та експериментально підтверджено доцільність розробки антимікробних препаратів серед похідних арилаліфатичних аміноспиртів: 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-3-аміно-2-пропанолів та четвертинних солей 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-3-(N-алкіламіно)-2-пропанолів.

Поглиблено наукові уявлення про фармакологічні властивості арилаліфатичних аміноспиртів, зокрема встановлена закономірність «хімічна структура–антимікробна дія», виявлено, що наявність 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенільного радикалу забезпечує сполукам широкий спектр антимікробної активності (антибактеріальна та антифунгальна). Розширено уявлення про токсикологічні властивості арилаліфатичних аміноспиртів, встановлено, що активні сполуки відносяться до III-VI класів токсичності і практично не виявляють місцевоподразнюючої дії (0,1 % та 0,25 % розчини).

Встановлено, що найбільш активна сполука 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-3-(N-бензилгексаметиленіміній)-2-пропанолу хлорид (шифр KBM-194) *in vitro* виявляє виразну інгібуючу дію відносно грампозитивних, грамнегативних бактерій та мікоплазм, включаючи біоплівкові форми. На моделі генералізованої синьогнійної інфекції у профілактичному режимі введення сполука запобігала загибелі 50 % інфікованих тварин (при 100 % летальності в контролі), на моделях місцевого шкірного ураження та кон'юнктивіту, викликаних *S. aureus*, сприяла скороченню терміну перебігу гнійно-запального процесу з 16 до 8 діб та з 7 до 4 діб відповідно у порівнянні з контролем. Встановлено, що стійкість *S. aureus* до сполуки KBM-194 *in vitro* не формується, її застосування не призводить до виникнення стійкості бактерій до дії фторхінолонів, макролідів, пеніцилінів і лінкозамідів.

Доповнено наукові дані про фармакодинаміку похідних арилаліфатичних аміноспиртів: бактерицидна дія обумовлена мембранотропними властивостями, що підтверджується підвищенням проникності цитоплазматичної мембрани, зміною кількісних співвідношень окремих компонентів ЛПС, пригніченням дихання, інгібуванням активності ефлюксних помп (на 37,9 % – 87,0 % у залежності від штаму).

Практичне значення одержаних результатів. За результатами досліджень встановлено, що похідні 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-3-аміно-2-пропанолу та четвертинні солі 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-3-(N-алкіламіно)-2-пропанолу є перспективними речовинами для розробки ефективних і безпечних лікарських засобів для профілактики та лікування захворювань бактеріального генезу (патент України на винахід № 109202 (2015 р.) та патент України на винахід № 109720 (2015 р.)). Впровадження в клінічну практику нових антимікробних препаратів підвищить ефективність терапії пацієнтів з гнійно-запальними процесами, зокрема викликаних резистентними до дії антибіотиків збудниками.

Отримані у дослідженнях дані дозволили з'ясувати механізм антибактеріальної активності похідних арилаліфатичних аміноспиртів, що забезпечить раціональне застосування препаратів, розроблених на їх основі (призначення в залежності від локалізації та тяжкості гнійно-запального процесу, коректне застосування у складі комбінованої антимікробної терапії).

Експериментально обґрунтована доцільність створення нових антимікробних засобів на основі арилаліфатичних аміноспиртів підтверджується нововведенням «Похідне четвертинних солей 4-(1,1,3,3-тетраметил бутил)фенокси-3-(N-алкіламіно)-2-пропанолу з антимікробною активністю», рекомендованим до впровадження у практику охорони здоров'я (Інформаційний бюлетень НАМН України, вип. 39, 2015 р.).

Окремі результати дисертаційної роботи впроваджено в науково-педагогічний процес кафедр фармакології ДЗ «Дніпропетровська медична академія», Харківського національного медичного університету та наукову діяльність Інституту високих технологій Київського національного університету ім. Т.Г. Шевченка і Запорізького державного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проведений інформаційний пошук, виконана експериментальна частина роботи, статистична обробка результатів, їх оформлення у вигляді таблиць та рисунків, сформульовані висновки,

з науковим керівником визначено мету та завдання дослідження. Електронно-мікроскопічні дослідження проведені при методичній та консультативній допомозі к. біол. н. Войчука С.І., дослідження впливу сполуки KBM-194 на ліпополісахариди та жирнокислотний склад *E. coli* – при методичній та консультативній допомозі д. біол. н., проф. Варбанець Л.Д. на базі ДУ «Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України», вивчення впливу сполуки на дихання бактерій – при методичній та консультативній допомозі к. біол. н. Носар В.І. на базі Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця, за що автор роботи щиро їм вдячна.

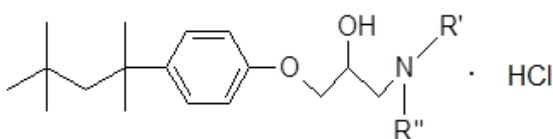
Апробація результатів дисертації. Основні фрагменти дисертаційної роботи доповідались на Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я» (Запоріжжя, 2015 р.), Міжнародній науково-практичній конференції «Медичні та фармацевтичні науки» (Київ, 2015 р.), XXII Російському національному конгресі «Человек и лекарство» (Москва, 2015 р.), XV науковій конференції студентів та молодих учених «Новини і перспективи медичної науки» (Дніпропетровськ, 2015 р.), XII Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2015 р.), 69-й науково-практичній конференції студентів та молодих вчених з міжнародною участю «Актуальные проблемы современной медицины и фармации-2015» (Мінськ, 2015 р.), VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини» (Вінниця, 2015 р.).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано у 22 роботах, з них: 9 статей у наукових журналах, рекомендованих МОН України (у тому числі 2 – у зарубіжних виданнях, 1 – у електронному фаховому виданні), 9 тез доповідей у матеріалах науково-практичних заходів, одержано 2 патенти України на винахід.

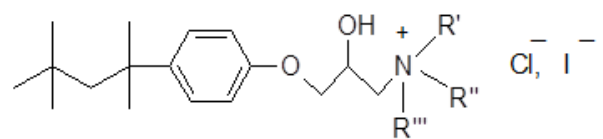
Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 181 сторінці комп'ютерного тексту, складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи дослідження», 4 розділів власних досліджень, розділу «Узагальнення результатів дослідження», висновків та списку використаних джерел (242 найменування, з них 51 кирилицею та 191 латиною). Робота містить 40 таблиць та 23 рисунки.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. В експериментах використано 42 похідних арилаліфатичних аміноспиртів – 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-3-аміно-2-пропаноли та четвертинні солі 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-3-(N-алкіламіно)-2-пропаноли (рис. 1).



4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси-3-аміно-2-пропаноли



Четвертинні солі 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси-3-(N-алкіламіно)-2-пропаноли

Рис. 1. Загальні формули нових похідних арилаліфатичних аміноспиртів

Сполуки синтезовані к. фарм. н. Коротким Ю.В. у Інституті органічної хімії НАН України.

У дослідженні використано мікроорганізми: 23 еталонних і 5 клінічних тест-штамів бактерій та грибів. Еталонні штами мікроорганізмів отримані з ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України», ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечнікова НАМН України», Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Клінічні штами виділені від хворих Національного інституту хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова НАМН України.

У роботі використано 230 білих нелінійних мишей та 25 кролів породи Шиншила, отриманих з віварію ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Експерименти з використанням тварин проводились відповідно до Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях (Страсбург, 1986). Дотримання біоетичних норм засвідчено висновком комісії з біоетики ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (протокол № 01/01/15 від 29.01.2015 р.).

Як препарати порівняння використані ципрофлоксацин («Ципринол», «KRKA», Словенія), тобраміцин («Бруламідин», «Teva Pharmaceutical Industries Ltd», Ізраїль), цефтриаксон («Цефтріаксон», ПАТ «Київмедпрепарат», Україна), сульфацил натрію («Сульфацил», ПАТ «Фармак», Україна) та субстанції мірамістину (ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна), резерпіну («Sigma-Aldrich», США).

Чутливість тест-штамів мікроорганізмів до арилаліфатичних аміноспиртів та антибактеріальних засобів *in vitro* визначали методом серійних розведень у рідкому поживному середовищі (з визначенням МІК) та диско-дифузійним методом згідно з державними та міжнародними стандартами (ISO 20776-1 (2006); Наказ МОЗ України № 167, 2007; Eucast EDef 7.2, 2012; Eucast disk diffusion manual, 2013).

Виявлення закономірностей «хімічна структура-антимікробна активність» здійснювали емпіричним методом з встановленням впливу замісників на прояв антимікробної дії та шляхом проведення кореляційно-регресійного аналізу залежності вираженості ефекту від характеристик молекулярної структури сполук, розрахованих *in silico* (М.Е. Соловьев, 2005).

Активність сполук та препаратів по відношенню до бактерій у стані біоплівки вивчали загальноприйнятими методами з використанням полістиролових планшетів та полівінілхлоридних катетерів (Ю.М. Романова, 2006).

ПАЕ визначали методом прямого висівання (W.J. Stubbings, 2004).

Формування резистентності бактерій до дії сполуки KBM-194 та референтних препаратів досліджували методом пасажів зі зростаючими субінгібуючими концентраціями сполуки з наступним визначенням чутливості тест-штаму до антибіотиків (ISO 20776-1 (2006); Eucast disk diffusion manual, 2013).

Антибактеріальну дію KBM-194 *in vivo* вивчали на моделях генералізованої інфекції білих мишей, місцевого шкірного ураження і бактеріального кон'юнктивіту кролів, ефективність визначали відносно групи тварин з контрольною патологією (групи контролю) (Н.В. Лазарев, 1954; Д.С. Саркисов, 1960; Г.Н. Першин, 1971).

Генералізовану інфекцію викликали *P. aeruginosa*, ефективність сполуки КВМ-194 вивчали в профілактичному (внутрішньоочеревинно одноразово, за 24 год до інфікування) та лікувально-профілактичному (внутрішньоочеревинно одноразово, одночасно з інфікуванням) режимах. Дози склали: 0,1 ЛД₅₀ (51,5 мг/кг); 0,01 ЛД₅₀ (5,15 мг/кг); 0,001 ЛД₅₀ (0,515 мг/кг) (О.В. Стефанов, 2001). Ефективність сполуки оцінювали за виживаністю тварин (Г.Н. Першин, 1971).

Лікувальну ефективність КВМ-194 при місцевій шкірній патології визначали, використовуючи сполуку у вигляді 0,25 % гідрофільної мазі (склад основи – ПЕО-400 : ПЕО-1500 у співвідношенні 4:1), при нанесенні 2 рази на день на уражену *S. aureus* шкіру кролів впродовж 6 діб, починаючи з наступного дня після інфікування (Б.М. Даценко и соавт., 1995). Терапевтичну ефективність при стафілококовому кон'юнктивіті вивчали при нанесенні 0,1 % розчину сполуки КВМ-194 5 разів на день (перша інстиляція – через 5 год після інфікування) і оцінювали за наявністю симптомів кон'юнктивіту з використанням бальної шкали (Н.В. Лазарев, 1954; Д.С. Саркисов, 1960).

Дослідження гострої токсичності обраних сполук проводили на статевозрілих білих нелінійних мишах при внутрішньоочеревинному, внутрішньошлунковому введенні та нашкірному нанесенні з визначенням ЛД₅₀ та класу токсичності (В.Б. Прозоровский, 1998; О.В. Стефанов, 2001). Імунотоксичність оцінювали за зміною індексу реакції гіперчутливості сповільненого типу та масою лімфоїдних органів (тимусу та селезінки) тварин (Э.В. Гюллинг, 1981). Місцевоподразнюючу дію досліджували при нанесенні на слизову оболонку ока кролів за загальноприйнятою методикою (В.П. Фисенко, 2000).

Для встановлення механізму дії арилаліфатичних аміноспиртів культури тест-штамів інкубували у середовищі, яке містило сполуки у концентраціях 0,5 МІК – 50,0 МІК (у залежності від методу), з використанням інтактної культури у якості контролю (Г.Н. Першин, 1971; Ф. Герхардт и соавт., 1984).

Ультраструктуру бактерій за умови впливу арилаліфатичних аміноспиртів вивчали методом трансмісійної електронної мікроскопії (J.J. Vazzola, 2007).

Вплив сполуки КВМ-194 на склад зовнішньої оболонки бактерій оцінювали за вмістом ЛПС та його складовими (моносахариди, жирні кислоти) у *E. coli*. Виділення ЛПС проводили за допомогою водно-фенольного методу Вестфалія і Яна з висушених ацетоном і ефіром клітин (Л.Д. Варбанец и соавт., 2006). Вміст вуглеводів визначали за М. Dubois (1956), білка – за О. Lowry (1951), моносахаридний склад ЛПС – за Р. Albershein (1976), жирнокислотний склад ЛПС та загальний жирнокислотний склад клітин – за З.П. Васюренко (1982).

Порушення проникності ЦПМ бактерій при дії сполуки КВМ-194 визначали спектрофотометрично за наявністю у супернатанті ендогенних речовин, які абсорбують світло з довжиною хвилі 260 нм (W.G. Chou et al., 1981; Ф. Герхардт и соавт., 1984; И.Ю. Кучма и соавт., 2003).

Функціонування ефлюксної системи бактерій оцінювали за накопиченням бромистого етидію в клітинах (А.А. Neyfakh, 1991; L. Paixao et al., 2009).

Вміст нуклеїнових кислот у клітинах бактерій визначали за методом А.С. Спіріна (В.Н. Орехович, 1977).

Вплив сполук на дихання бактерій досліджували полярографічним методом з використанням закритого електрода Кларка за В. Chance & Y. Williams (1956).

Активність фосфофруктокінази, сукцинатдегідрогенази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази бактерій визначали за методами А. Nigam (2007), А. Bregman (2001), С. Е. Северина (1989).

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою програми «StatSoft Statistica 6.0» з використанням критеріїв Манна-Уїтні, Данета, Краскела-Уоллеса, Ньюмена-Кейлса, Спірмена та точного критерію Фішера. Вірогідними вважалися відмінності між групами при рівні значущості $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Антимікробна активність похідних арилаліфатичних аміноспиртів визначена по відношенню до еталонних тест-штамів грамполозитивних (*S. aureus*), грамнегативних (*E. coli*, *P. aeruginosa*) бактерій та дріжджоподібних грибів (*C. albicans*). Встановлено, що з 42 вперше синтезованих речовин антибактеріальну дію виявили 32 сполуки, антифунгальну – 29, широкий спектр дії (активність відносно бактерій та грибів) – 27 сполук.

Аналіз залежності «хімічна структура – антимікробна активність» свідчить про значний вплив арил(алкіл)окси-радикалу та складу аміногрупи на здатність арилаліфатичних аміноспиртів інгібувати ріст та розмноження мікроорганізмів. Встановлено, що наявність в структурі молекули 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенільного радикалу забезпечує сполукам полівалентну дію (антибактеріальну та антифунгальну). Виявлена пряма залежність антимікробної активності від площі поверхні, об'єму молекули та ліпофільності речовин: збільшення розміру молекул та ліпофільності сполук супроводжується зростанням інгібувальної активності.

Поглиблені дослідження сполук, які в скринінгових експериментах виявили виразні інгібувальні властивості (моновалентна антибактеріальна дія у КВМ-114, -120, -121; полівалентна – у КВМ-192, -193, -194, -204, -261, -262, -263) свідчать, що найбільш чутливими до дії арилаліфатичних аміноспиртів є грамполозитивні коки. Сполуки КВМ-120, -121, -194, -204, -261, -262, -263 пригнічують ріст та розмноження бактерій у концентрації 0,2–5,0 мкг/мл і за показником МІК практично не поступаються лінезоліду (МІК \leq 4,0 мкг/мл) та ванкоміцину (МІК \leq 4,0 мкг/мл).

Життєдіяльність грамполозитивних спороутворювальних (*Bacillus* spp.) та неспороутворювальних паличок (*Corynebacterium glutamicum*) пригнічують усі досліджені сполуки (МІК 5,0–20,0 мкг/мл), найбільш виразна дія виявлена у КВМ-194 та КВМ-204 (МІК 0,78–12,5 мкг/мл). За активністю відносно *B. pumilus*, *B. polymyxa*, *B. subtilis* зазначені сполуки не поступаються ванкоміцину (МІК \leq 4,0 мкг/мл).

Експериментами встановлено, що досліджені сполуки здатні пригнічувати ріст та розмноження грамнегативних факультативно анаеробних паличок, представників родини *Enterobacteriaceae*. Найбільш виразну активність відносно *Escherichia coli* виявили сполуки КВМ-114 та КВМ-193 (МІК 5,0 – 7,5 мкг/мл), *Salmonella paratyphi* – КВМ-120, -121, -194, -204, 261, -262, -263 (МІК 5,0 мкг/мл), *Providentia rettgeri* – КВМ-194 (МІК 3,12 мкг/мл). За рівнем активності відносно *E. coli*, *S. paratyphi* та *P. rettgeri* сполуки не поступаються хлорамфеніколу (МІК \leq 16,0 мкг/мл), а КВМ-194 також амікацину (відносно *P. rettgeri*) (МІК $>$ 16,0 мкг/мл).

Дослідження впливу сполук на грамнегативні неферментуючі бактерії (*Pseudomonas* spp.) показало, що найбільш виразну інгібуючу дію відносно *P. syringae* та *P. putida* виявили сполуки КВМ-194, -204, -261, -262, -263 (МІК 2,5 – 6,25 мкг/мл), які за рівнем активності не поступаються амікацину (МІК \leq 16,0 мкг/мл) та азтреонаму (МІК \leq 8,0 мкг/мл). Активність по відношенню до *P. aeruginosa* зареєстрована у КВМ-194 та КВМ-204 (МІК 12,5 – 30,0 мкг/мл).

Встановлено, що вперше синтезовані похідні арилаліфатичних аміноспиртів виявляють активність відносно внутрішньоклітинних патогенів – *Acholeplasma modicum* та *Mycoplasma pneumoniae*, МІК 3,12 – 6,25 мкг/мл. За ступенем інгібуючої дії КВМ-114, -194, -204 переважають лінкоміцин (МІК \leq 16,0 мкг/мл) та наближаються до кліндаміцину (МІК \leq 4,0 мкг/мл).

Оскільки сполука КВМ-194 (1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-3-(N-бензилгексаметиленіміній)-2-пропанолу хлорид) виявила виразну активність по відношенню до всіх тест-штамів грампозитивних бактерій, доцільно було визначити її вплив на анаеробні мікроорганізми. Встановлено, що сполука інгібує *Clostridium sporogenes* та *C. perfringens* у концентрації 6,25 мкг/мл і за показником МІК не поступається хлорамфеніколу (МІК \leq 8,0 мкг/мл) і цефотаксиму (МІК \leq 8,0 мкг/мл).

Встановлено, що сполуки здатні дозозалежно порушувати формування біоплівки клінічного штаму *S. aureus*: при концентрації 1,0 МІК пригнічення плівкоутворення КВМ-194, -204, -261, -262, -263 складає 33,6 % – 48,1 %, при 2,5 МІК – 46,9 % – 70,2 %, при 5,0 МІК – 51,6 % – 83,0 % в залежності від сполуки (у порівнянні з контролем). За антибіоплівковою активністю сполуки переважають цефтриаксон і не поступаються ципрофлоксацину (ступінь інгібування плівкоутворення 1,3 % – 27,6 % та 46,9 % – 63,8 % відповідно у залежності від концентрації).

До дії сполук виявляють чутливість і сформовані біоплівки, хоча і у більш високих концентраціях (10,0 МІК, 25,0 МІК і 50,0 МІК). Встановлено, що 3-добова біоплівка *S. aureus* є чутливою до дії всіх досліджуваних сполук, інгібуючий ефект при концентрації 10,0 МІК становить 31,9 % – 37,0 % залежно від сполуки. Найбільш виразна дія реєструється при 50,0 МІК, антибіоплівкова активність сполук КВМ-194, -204, -262, -263 є близькою і становить 78,7 %, 73,8 %, 78,7 %, 71,3 % відповідно. По відношенню до сформованої біоплівки сполуки виявляють перевагу перед ципрофлоксацином при 50,0 МІК (ступінь інгібування 54,0 %) та цефтриаксоном у всіх досліджених концентраціях (ступінь інгібування 0,0 % – 24,0%).

Дослідження антибіоплівкової активності на моделі інфікованого *S. aureus* катетера показали, що сполука КВМ-194 дозозалежно руйнує біоплівку золотистого стафілокока в діапазоні концентрацій 1,0 – 10,0 МІК (41,5 % – 67,0 %).

Для оцінки перспективності сполук як антимікробних препаратів необхідно визначити можливість формування резистентності у бактерій до їх дії. Проведеними експериментами встановлено, що МІК сполуки КВМ-194 відносно *S. aureus* за умови впливу у субінгібуючій концентрації не змінювалась протягом 20 пасажів, сполука не сприяла виникненню резистентності золотистого стафілококу до оксациліну, кліндаміцину, левофлоксацину та еритроміцину.

Експериментами встановлено, що арилаліфатичні аміноспирти виявляють бактерицидну дію, а їх активність практично не залежить від рН середовища.

У дослідженнях ПАЕ сполуки КВМ-194 відносно *S. aureus* встановлено, що при концентрації 0,5 МІК та 5,0 МІК його тривалість становить 2,0 год і за цим показником сполука переважає оксацилін (ПАЕ – до 0,6 год), не поступається гентаміцину (до 2,0 год), та наближається до ципрофлоксацину (до 2,4 год).

Для встановлення перспективності створення на основі КВМ-194 нового протимікробного засобу вивчали її ефективність *in vivo* на моделі генералізованої інфекції, місцевого шкірного ураження та кон'юнктивіту бактеріального генезу.

За умови генералізованої синьогнійної інфекції сполука при внутрішньо-очеревинному введенні у дозі 0,01 ЛД₅₀ виявила профілактичну дію, попереджуючи загибель 50 % тварин (при 100 % загибелі у контролі, $p < 0,05$) (рис. 2).

При застосуванні у лікувально-профілактичному режимі КВМ-194 у дозі 0,01 ЛД₅₀ сприяла виживанню 70,0 % інфікованих тварин; у дозі 0,001 ЛД₅₀ виживаність тварин відповідала такій контролю. Збільшення дози до 0,1 ЛД₅₀ супроводжувалось загибеллю усіх дослідних тварин, що, можливо, зумовлено виразними бактерицидними властивостями сполуки (рис. 2).

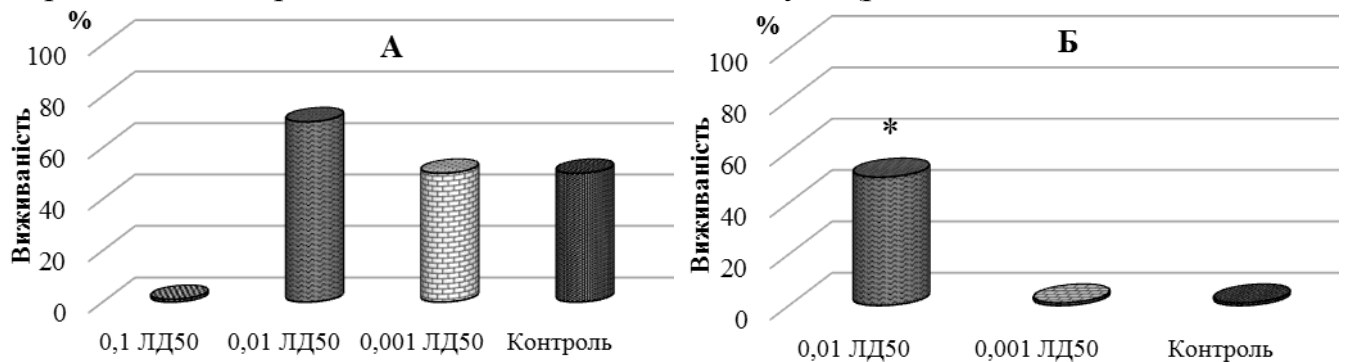


Рис. 2. Терапевтична ефективність сполуки КВМ-194 при генералізованій бактеріальній інфекції, викликаній *P. aeruginosa*. А – лікувально-профілактична ефективність; Б – профілактична ефективність.

Примітка. * – відмінності вірогідні по відношенню до контролю, $p < 0,05$.

На моделі місцевого шкірного ураження, викликаного *S. aureus*, сполука у вигляді 0,25 % мазі сприяла зменшенню гіперемії, площі інфільтрату та прискорювала нормалізацію стану шкіри – на третю добу дослідження розмір інфільтрату у дослідних тварин – $1,03 \pm 0,18 \text{ см}^2$, у тварин контролю – $2,23 \pm 0,22 \text{ см}^2$. Ознаки запалення у тварин дослідної групи не спостерігались на 8 добу експерименту, у тварин групи контролю – виявлялись до 16 доби.

Дослідження ефективності КВМ-194 на моделі стафілококового кон'юнктивіту показали, що інстиляція 0,1 % розчину сполуки сприяє покращенню стану кон'юнктиви вже протягом першої доби експерименту (сумарний бал у тварин дослідної групи – 26, у тварин контрольної групи – 36). Повне зникнення симптомів кон'юнктивіту відзначається у дослідних тварин на 4 добу, а у тварин контролю – лише на 7 добу експерименту. Отримані дані показали, що за ефективністю на моделі стафілококового кон'юнктивіту 0,1 % розчин сполуки КВМ-194 не поступається препарату порівняння 30,0 % розчину сульфацилу натрію.

Оскільки одним із визначальних факторів при впровадженні нових лікарських засобів є їх безпека, доцільно було провести дослідження гострої токсичності та

імунотоксичності найбільш активних сполук. Встановлено, що за умови внутрішньоочеревинного введення мишам похідні 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-3-аміно-2-пропанолу відносяться до VI – VI класу токсичності, похідні четвертинних солей 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-3-(N-алкіламіно)-2-пропанолу – до III – IV класу токсичності (О.В. Стефанов, 2001).

Оскільки для подальших досліджень була обрана сполука КВМ-194, доцільно було визначити показники токсичності при інших шляхах введення: внутрішньошлунковому та наскірному. Отримані дані свідчать, що сполука відноситься до IV класу токсичності за умови усіх досліджених шляхів введення, значення ЛД₅₀ при внутрішньоочеревинному введенні становить 515,0 (450,0 – 590,0) мг/кг, при внутрішньошлунковому – 890,0 (780,0 – 1020,0) мг/кг, за умови наскірного нанесення ЛД₅₀ > 2500,0 мг/кг. Внутрішньошлункове введення КВМ-194 у дозі 0,01 ЛД₅₀ не призводить до вірогідних змін маси тіла та лімфоїдних органів тварин, не пригнічує реакцію гіперчутливості сповільненого типу, про що свідчить показник індексу реакції ($0,98 \pm 0,16$ – у дослідній групі, $1,03 \pm 0,34$ – у контролі, $p > 0,05$). КВМ-194 не виявляє місцевопоздразнюючої дії (0,1 % та 0,25 % розчини).

Для встановлення механізму дії арилаліфатичних аміноспиртів на першому етапі були проведені електронно-мікроскопічні дослідження, які показали, що сполуки КВМ-114, -194, -204 у субінгібуючій концентрації порушують ультраструктуру чутливих тест штамів (*E. coli*, *S. aureus* та *P. aeruginosa* відповідно), що реєструється вже з 1 год дії. При подовженні терміну інкубації КВМ-194 з клітинами *S. aureus* до 24 год виявлені порушення поділу, а при підвищенні концентрації до 5,0 МІК – фрагментація нуклеоїду та лізис клітин (рис. 3). Отримані дані можуть свідчити про здатність досліджуваних похідних впливати на цитоплазматичну мембрану.

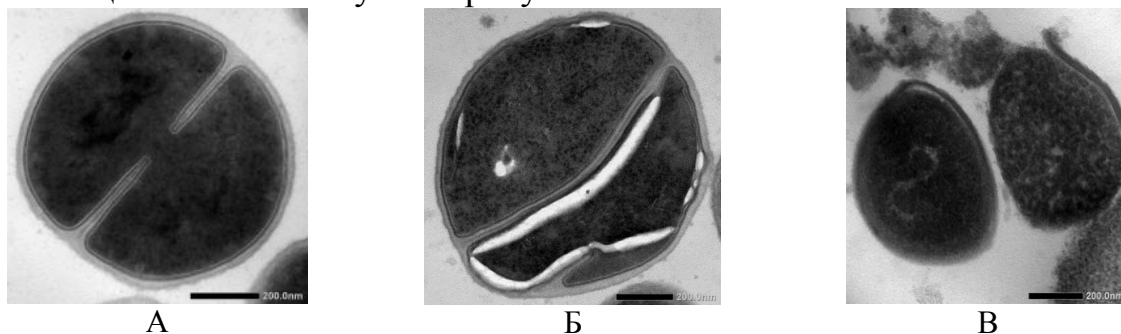


Рис. 3. Ультраструктура *S. aureus*. А – інтактні клітини, Б – через 24 год дії КВМ-194 (0,5 МІК), В – через 24 год дії КВМ-194 (5,0 МІК). Електронна мікроскопія, збільшення: $\times 30000$ (А), $\times 25000$ (Б), $\times 25000$ (В)

Результати досліджень щодо здатності сполуки КВМ-194 порушувати склад зовнішньої мембрани бактерій показали, що за умови її дії у концентрації 0,5 МІК вміст ЛПС у клітинах *E. coli* не порушується, проте суттєво змінюються кількісні співвідношення окремих моносахаридів і жирних кислот (знижується вміст манози, галактози, глюкози, додеканової та тетрадеканової кислот; зростає вміст рибози, 3-окситетрадеканової, гексадеканової та транс-октадецененової кислот).

Сполука КВМ-194 впливає на проникність ЦПМ, суттєво підвищує вихід з клітин ендогенних речовин, які абсорбують світло з довжиною хвилі 260 нм (при

1,0 МІК на 342 %, при 5,0 МІК – на 317 %) у порівнянні з інтактним контролем і виявляє перевагу перед мірамістином та тобраміцином (рис. 4).

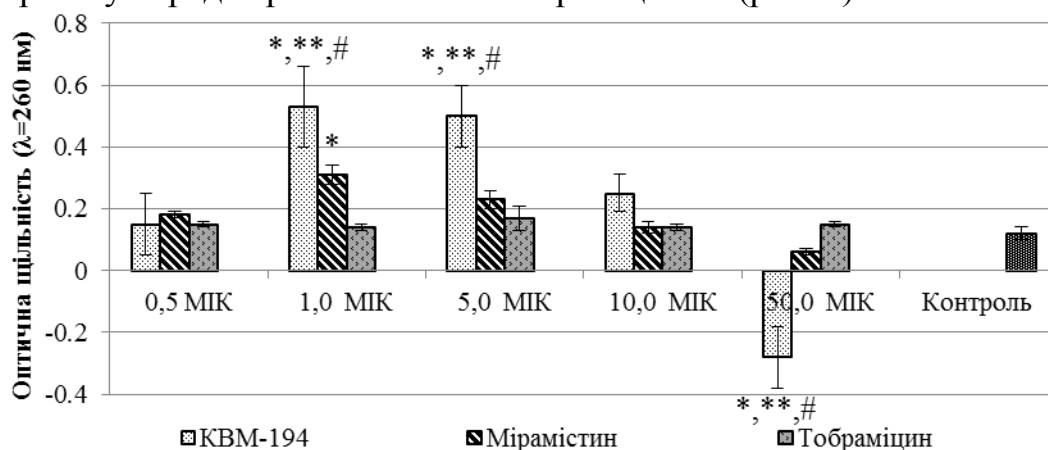


Рис. 4. Вплив сполуки КВМ-194 на вихід ендogenous речовин з клітин *S. aureus*

Примітка. * – відмінності вірогідні по відношенню до інтактного контролю, $p < 0,05$; ** – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації мірамістину, $p < 0,05$; # – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації тобраміцину, $p < 0,05$.

Результати досліджень впливу сполук на ефлюкс показали (рис. 5), що сполука КВМ-194 сприяє накопиченню бромистого етидію в клітинах ципрофлоксацинрезистентного штаму *S. aureus* (на 87,0 % у порівнянні з контролем, $p < 0,05$) і за блокуючим ефектом переважає резерпін. Присутність в інкубаційному середовищі резерпіну та КВМ-194 сприяло значному збільшенню вмісту бромистого етидію в клітинах золотистого стафілококу (на 107,2 %, $p < 0,05$). У ципрофлоксацинчутливого штаму вміст бромистого етидію у клітинах при дії сполуки збільшується на 37,9 % у порівнянні з контролем. Здатність сполуки КВМ-194 та резерпіну до сумачії може свідчити про їх вплив на ефлюксні помпи різних родин або здатність до зв'язування з різними сайтами помп однієї родини.

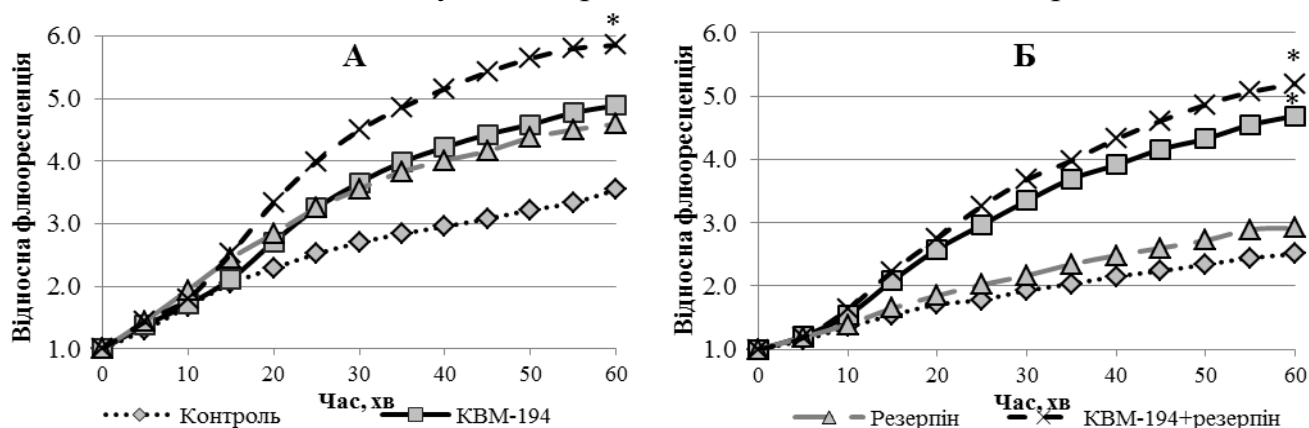


Рис. 5. Накопичення бромистого етидію в клітинах золотистого стафілококу в присутності КВМ-194 та резерпіну. А – *S. aureus* ATCC 25923 (чутливий до ципрофлоксацину); Б – *S. aureus* 449 (резистентний до ципрофлоксацину)

Примітка. * – відмінності вірогідні по відношенню до контролю, $p < 0,05$.

Як відомо, механізм антибактеріальної активності препаратів може бути зумовлений порушенням синтезу білка та нуклеїнових кислот в мікробній клітині (Н.С. Егоров, 2004). Встановлено, що КВМ-194 у концентрації 0,5 МІК не інгібує утворення білка у клітинах *S. aureus*, вже через 1 год його вміст зростає на 33,3 %, через 6 год – на 54,0 %. Вплив тобраміцину характеризується зниженням вмісту білка (через 3 год – на 61,0 %, через 6 год – на 51,8 %), що обумовлено його основним механізмом дії (рис. 6 А).

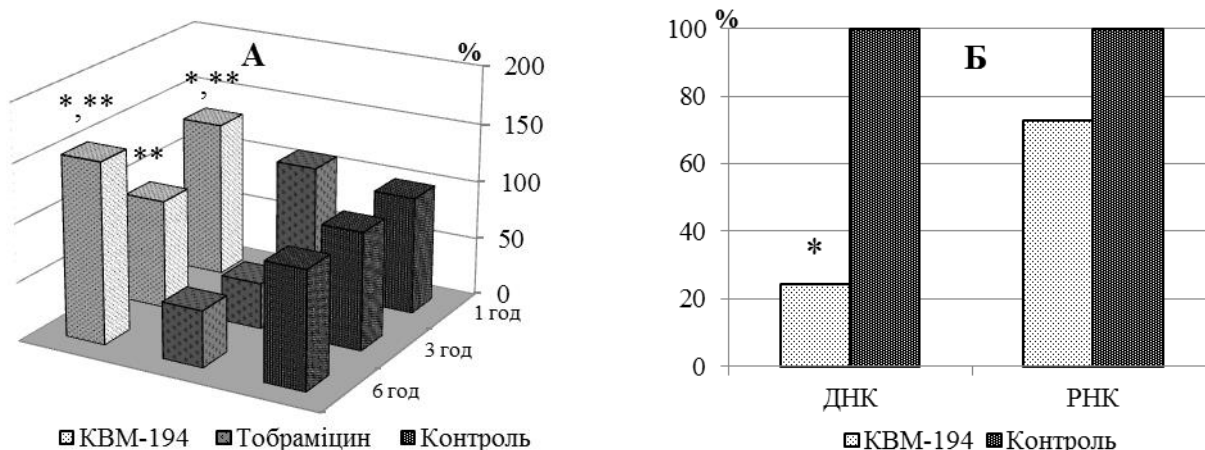


Рис. 6. Вплив сполуки КВМ-194 на вміст білка (А), ДНК та РНК (Б) в клітинах *S. aureus*

Примітка. * – відмінності вірогідні по відношенню до контролю у відповідний термін дослідження, $p < 0,05$; ** – відмінності вірогідні по відношенню до тобраміцину у відповідний термін дослідження, $p < 0,05$.

Експериментами щодо впливу КВМ-194 (0,5 МІК) на нуклеїнові кислоти *S. aureus* не виявлено вірогідного зниження загального вмісту РНК при перерахунку на 1,0 мг білка (рис. 6 Б). Проте встановлено, що дія сполуки супроводжується суттєвим зменшенням кількості ДНК (на 68,4 %, $p < 0,05$) у клітинах, що реєструється через 24 год інкубації. Отримані результати та дані електронної мікроскопії (поява фрагментації нуклеоїду) можуть свідчити про негативний вплив похідного арилаліфатичних аміноспиртів на генетичний апарат мікробної клітини.

При дослідженні загального жирнокислотного складу *E. coli* при дії КВМ-194 виявлено зменшення вмісту додеканової, транс-октадеценної кислот, збільшення вмісту тетрадеканової, 3-окситетрадеканової, гексадеканової, цис-октадеценної та октадеканової кислот, що може свідчити про здатність сполуки КВМ-194 порушувати синтез жирних кислот у мікроорганізмів.

Відомо, що мембранотропні антимикробні засоби здатні впливати на процеси енергозабезпечення клітин бактерій (F. Terse et al., 1979), у зв'язку з чим було доцільно з'ясувати активність дихання та ферментів катаболізму бактерій при дії КВМ-194. Встановлено, що сполука вірогідно пригнічує активність ендogenous дихання *E. coli* та *S. aureus* на 31,2 % та 41,1 % відповідно (у порівнянні з інтактним контролем, $p < 0,05$) і за активністю відносно кишкової палички не поступається азиду натрію (рис. 7, рис. 8).

Дослідження показали, що КВМ-194 впливає на окремі ланки процесу дихання *E. coli* – комплекс I (НАД-залежна ланка, субстрат окиснення – глутамат натрію) та

комплекс II (ФАД-залежна ланка, субстрат окиснення – сукцинат натрію), інгібування складає 21,4 % та 39,8 % відповідно. У *S. aureus* більш чутливим до дії сполуки є комплекс I (пригнічення на 50,6 %, $p < 0,05$) (рис. 7, рис. 8).

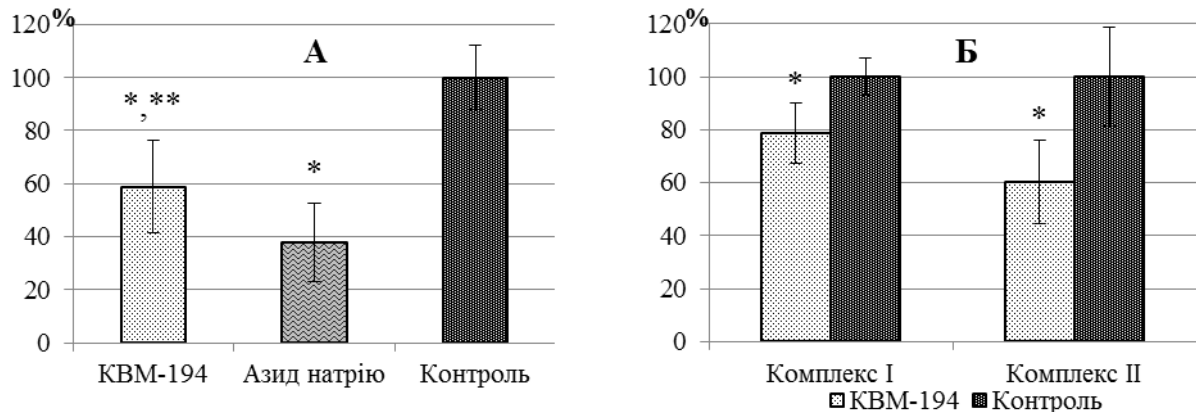


Рис. 7. Вплив сполуки КВМ-194 на активність дихання *E. coli*. А – ендогенне дихання, Б – субстратне дихання

Примітка. * - відмінності вірогідні по відношенню до контролю, $p < 0,05$; ** - відмінності вірогідні по відношенню до азиду натрію, $p < 0,05$.

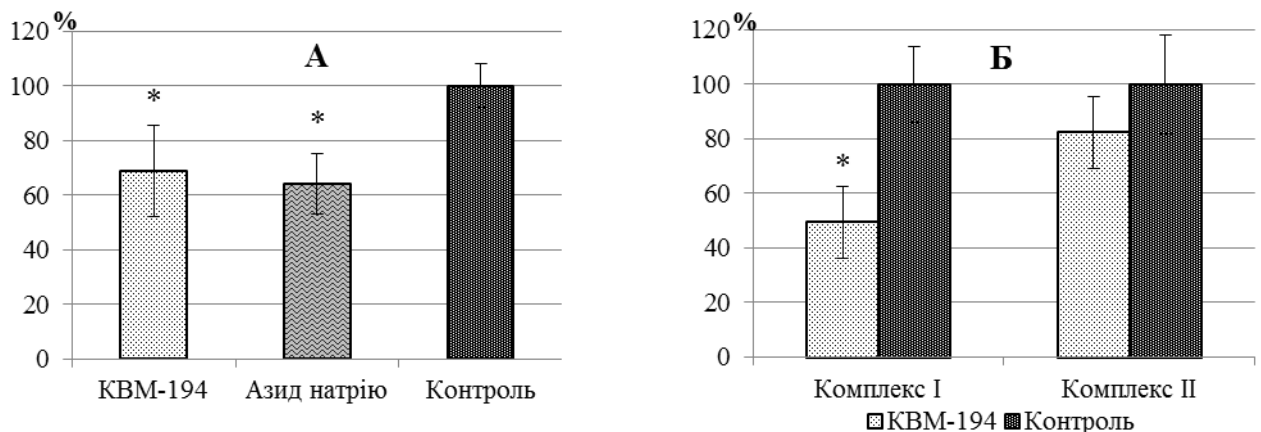


Рис. 8. Вплив сполуки КВМ-194 на активність дихання *S. aureus*. А – ендогенне дихання, Б – субстратне дихання

Примітка. * - відмінності вірогідні по відношенню до контролю, $p < 0,05$.

Оцінку перебігу ферментативних процесів здійснювали за активністю фосфофруктокінази (гліколіз), сукцинатдегідрогенази (цикл Кребса) та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (пентозофосфатний шлях) за умови дії КВМ-194. Встановлено, що сполука у концентрації 0,5 МІК та 1,0 МІК дозозалежно пригнічує активність фосфофруктокінази (2,9 % і 18,4 %) та сукцинатдегідрогенази *S. aureus* (9,9 % і 19,9 % відповідно у порівнянні з інтактним контролем). Вірогідні відмінності ($p < 0,05$) виявлені при дії сполуки у концентрації 1,0 МІК. Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази більш виразно знижується при 0,5 МІК (на 21,6 %, $p < 0,05$).

Таким чином, результати досліджень свідчать, що похідні арилаліфатичних аміноспиртів виявляють широкий спектр антимікробної дії. Виділена в скринінгових експериментах сполука КВМ-194 виявляє ефективність при генералізованій інфекції та місцевих гнійно-запальних процесах бактеріального генезу. Механізм анти-

мікробної дії KBM-194 є комплексним, зумовлений мембранотропними властивостями, здатністю порушувати функціонування ефлюксних pomp та впливом на внутрішньоклітинні процеси, що відрізняє сполуку від сучасних антибактеріальних засобів. Наявність бактерицидного ефекту, відсутність залежності активності від рН, змін чутливості бактерій впродовж тривалого застосування свідчить про перспективність створення на основі арилаліфатичних аміноспиртів нових антимікробних засобів, що є одним із шляхів боротьби з антибіотикорезистентністю.

ВИСНОВКИ

Поява та розповсюдження резистентних до антибіотиків збудників гнійно-запальних процесів є основною причиною зниження ефективності антибактеріальної хіміотерапії, що потребує впровадження у медичну практику нових ефективних та безпечних антимікробних препаратів. Незважаючи на надзвичайну потребу у таких засобах, за останнє десятиліття в медичну практику було впроваджено тільки 2 нові класи антибіотиків. Зростання резистентності збудників за умови зменшення кількості нових антимікробних препаратів актуалізує пошук нових сполук антибактеріального та антифунгального спрямування, особливо серед нових хімічних класів.

У дисертації теоретично обґрунтовано та експериментально доведено доцільність пошуку сполук з виразними антимікробними властивостями серед арилаліфатичних аміноспиртів та створення на їх основі нових ефективних та безпечних хіміотерапевтичних препаратів для лікування пацієнтів із захворюваннями інфекційного генезу.

1. У скринінгових дослідженнях антимікробної активності 42 нових похідних арилаліфатичних аміноспиртів виявлені сполуки з моновалентною антибактеріальною дією та широким спектром активності (антибактеріальна, антифунгальна). Встановлено залежність «хімічна структура – антимікробна дія», яка визначається структурою амінного фрагменту та арил(алкіл)окси-радикалу, площею поверхні, об'ємом молекул та їх ліпофільністю: збільшення розміру та ліпофільності молекули супроводжується посиленням антимікробної дії. Полівалентні властивості сполукам забезпечує наявність у структурі молекули 4-(1,1,3,3-тетраметил-бутил)фенільного радикалу.

2. Похідні арилаліфатичних аміноспиртів виявляють широкий спектр антибактеріальної дії *in vitro*, найбільш виразно інгібують ріст та розмноження грамположитивних коків та паличок. Сполукам притаманні антибіоплівкові властивості та бактерицидна дія. Найбільш активною сполукою є 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-3-(N-бензилгексаметиленіміній)-2-пропанолу хлорид (KBM-194), МК, в залежності від тест-мікроорганізма, складає 0,2 – 30,0 мкг/мл. Встановлено, що у *S. aureus* резистентність до дії KBM-194 та стійкість до фторхінолонів, макролідів, лінкозамідів та пеніцилінів не формується. Доведено наявність постантибіотичного ефекту у KBM-194 тривалістю 2 год та відсутність залежності антимікробної дії від рН середовища.

3. Сполука KBM-194 за результатами вивчення гострої токсичності при однократному внутрішньоочеревинному, внутрішньошлунковому введенні та

нашкірному нанесенні мишам відноситься до IV класу токсичності (малотоксичні речовини, ЛД₅₀ 515,0 мг/кг, 890,0 мг/кг, >2500,0 мг/кг відповідно). КВМ-194 не виявляє ознак імунотоксичності та не здійснює місцевопоздразнюючої дії при нанесенні на слизові оболонки ока тварин (0,1 % та 0,25 % розчин).

4. На моделі генералізованої інфекції, викликаній *P. aeruginosa*, КВМ-194 виявляє найбільш виразну дію у профілактичному режимі введення, у дозі 0,01 ЛД₅₀ сполука запобігає загибелі 50 % інфікованих тварин при 100 % загибелі в контролі ($p < 0,05$). При гнійно-запальному процесі шкіри, викликаному *S. aureus*, КВМ-194 (0,25 % мазь на гідрофільній основі) виявляє лікувальну дію, зникнення ознак запалення спостерігається на 8 добу, у тварин контролю – на 16 добу. На моделі стафілококового кон'юнктивіту підтверджена ефективність сполуки (0,1 % розчин), що відповідає такій препарату сульфацилу натрію 30,0 %.

5. За результатами дослідження ультраструктури бактерій встановлено, що антибактеріальна активність похідних арилаліфатичних аміноспиртів обумовлена мембранотропними властивостями: зміна ультраструктури *S. aureus*, *E. coli* і *P. aeruginosa* реєструється вже з 1 год дії, подовження терміну впливу призводить до порушення поділу, фрагментації нуклеоїду та лізису клітин.

6. Мембранотропна дія КВМ-194 підтверджена дозозалежним збільшенням проникності цитоплазматичної мембрани, пригніченням активності ефлюксних pomp антибіотикочутливих та резистентних штамів *S. aureus* (на 37,9 % та 87,0 % відповідно), зміною співвідношень окремих жирних кислот і моносахаридів у складі ліпополісахариду *E. coli*.

7. Сполука КВМ-194 змінює метаболізм бактерій: порушує співвідношення компонентів загального жирнокислотного складу *E. coli*; сприяє зменшенню кількості ДНК (на 68,4 %, $p < 0,05$) в клітинах *S. aureus*, не змінюючи вміст РНК; пригнічує ендogenous (на 31,2 % та 41,1 % у *E. coli* та *S. aureus* відповідно, $p < 0,05$) і субстратне дихання. КВМ-194 інгібує НАД- та ФАД-залежну ланку дихального ланцюга у *S. aureus* на 50,6 % та 17,6 %, у *E. coli* на 21,4 % та 39,8 % відповідно.

8. Проведене дослідження експериментально обґрунтовує доцільність пошуку речовин з антибактеріальними та антифунгальними властивостями серед арилаліфатичних аміноспиртів та перспективність подальшого поглибленого дослідження сполуки КВМ-194 з метою розробки на її основі нового антимікробного препарату місцевої та системної дії.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Чутливість мікоплазм до похідних арилаліфатичних аміноспиртів / М.Л. Дронова, К.С. Коробкова, Н.О. Вринчану, І.П. Токовенко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2013. – № 4-5 (35). – С. 48–52. (Автором особисто виконано основну частину експериментального блоку, проведено аналіз даних, написання статті.)

2. Дронова М.Л. Ультраструктура *Escherichia coli* при дії нового похідного арилаліфатичних аміноспиртів / М.Л. Дронова, С.І. Войчук, Н.О. Вринчану // Морфологія. – 2014. – Т. 8, № 4. – С. 26–29. (Автором особисто виконано основну частину експериментального блоку, проведено аналіз даних, написання статті.)

3. Дронова М.Л. Чувствительность биопленок *Staphylococcus aureus* к действию производных арилалифатических аминоспиртов [Электронный ресурс] / М.Л. Дронова // *Universum: Медицина и фармакология: электрон. научн. журн.* – 2015. – № 2 (15). – Режим доступа: <http://7universum.com/ru/med/archive/item/1932>.
4. Dronova M.L. Morphological alterations of *Staphylococcus aureus* caused by aryl aliphatic aminoalcohol derivative [Электронный ресурс] / M.L. Dronova // *Анали Мечниківського інституту.* – 2015. – № 2. – С. 134–138. – Режим доступа: http://nbuv.gov.ua/j-pdf/ami_2015_2_24.pdf.
5. Arylaliphatic aminoalcohol derivative KVM-194 affects *E. coli* lipopolysaccharide composition / M. Dronova, N. Vrynchanu, L. Varbanets. Yu. Korotkiy, O. Brovarska // *Farmacia.* – 2015. – Vol. 63, № 4. – P. 586–592. (*Автором особисто виконано основну частину експериментального блоку, проведено статистичну обробку та аналіз даних, написання статті.*)
6. Синтез, антибактеріальна та протигрибкова активність четвертинних солей 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу / Ю.В. Короткий, Н.О. Вринчану, М.Л. Дронова, З.С. Суворова, О.А. Смертенко // *Фармацевтичний журнал.* – 2015. – № 1. – С. 56–62. (*Автором особисто виконано частину експериментального блоку, проведено аналіз даних, написання окремих розділів статті.*)
7. Дронова М.Л. Антимікробна активність 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-3-(*n*-бензилгексаметиленіміній)-2-пропанолу хлориду / М.Л. Дронова, З.С. Суворова // *Фармакологія та лікарська токсикологія.* – 2015. – № 6 (46). – С. 64–69. (*Автором особисто проведено збір та аналіз літературних даних, виконано частину експериментального блоку, проведено аналіз даних, написання статті.*)
8. Формування резистентності мікроорганізмів до похідного арилаліфатичних аміноспиртів / М.Л. Дронова, З.С. Суворова, А.В. Цикоза, Н.О. Вринчану // *Український науково-медичний молодіжний журнал.* – 2015. – № 2 (88). – С. 92–95. (*Автором особисто виконано основну частину експериментального блоку, проведено статистичну обробку та аналіз даних, написання статті.*)
9. Дронова М.Л. Антибактеріальна активність 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-3-(*N*-бензил-4-метилпіперидиній)-2-пропанолу хлориду / М.Л. Дронова, С.І. Войчук, Н.О. Вринчану // *Український біофармацевтичний журнал.* – 2015. – № 6 (41). – С. 92–97. (*Автором особисто виконано основну частину експериментального блоку, проведено аналіз даних, написання статті.*)
10. Дронова М.Л. Залежність антимікробної активності похідних арилаліфатичних аміноспиртів від їхньої хімічної структури / М.Л. Дронова, З.С. Суворова, Ю.В. Короткий // *Фармацевтичний журнал.* – 2015. – № 5. – С. 95–104. (*Автором особисто виконано основну частину експериментального блоку, проведено статистичну обробку та аналіз даних, написання статті.*)
11. Dronova M.L. The therapeutic efficacy of 1-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy]-3-(*N*-benzylhexametylenimino)-2-propanol chloride under *in vivo* models / M.L. Dronova // *Фармакологія та лікарська токсикологія.* – 2016. – № 1 (47). – С. 60–65.

12. Патент України на винахід № 109202, МПК А61К31/55, С07D295/092. 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)феноксi]-3-(N-бензилгексаметиленіміній)-2-пропанол хлорид / Ю.В. Короткий, Н.О. Вринчану, М.Л. Дронова, О.А. Смертенко – № а 201314944; заявл. 20.12.2013, опубл. 27.07.2015, Бюл. № 14. – 4 с. (*Автором особисто виконано основну частину експериментального блоку, проведено аналіз даних, підготовку патенту.*)
13. Патент України на винахід № 109720, МПК С07С215/40, С07С217/32, А61К31/14. Гідрохлориди 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)феноксi]-3-алкіламіно-2-пропанолу / Ю.В. Короткий, Н.О. Вринчану, М.Л. Дронова, Д.М. Дудікова, О.А. Смертенко – № а 201314947; заявл. 20.12.2013, опубл. 25.09.2015, Бюл. № 18. – 4 с. (*Автором особисто виконано основну частину експериментального блоку, проведено аналіз даних, підготовку патенту.*)
14. Фармакологические и токсикологические свойства производных 4-(1,1,3,3-тетраметил бутил)феноксi-3-амино-2-пропанола и их четвертичных солей / М.Л. Дронова, Н.О. Врынчану, Ю.В. Короткий, З.С. Суворова, В.В. Недашковская // Матеріали «The Forth European Conference on Biology and Medical Sciences», м. Вена, 13 січня 2015 р. – Вена, 2015. – С. 144–154.
15. Суворова З.С. К механизму антимикробного эффекта нового производного арилалифатических аминоспиртов / З.С. Суворова, М.Л. Дронова, А.В. Цыкоза // Матеріали VII Республиканской научно-практической конференции с международным участием студентов и молодых ученых «Проблемы и перспективы развития современной медицины», г. Гомель, 23-24 апреля 2015 г. – Гомель, 2015. – Т. 4 – С. 56–58.
16. Антибактеріальна активність похідного арилаліфатичних аміноспиртів КВМ-193 / М.Л. Дронова, С.В. Гриневич, А.В. Цыкоза, А.С. Ємсенко // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я», м. Запоріжжя, 26-27 березня 2015 р. – Запоріжжя, 2015. – С. 76.
17. Дронова М.Л. Дослідження впливу похідного арилаліфатичних аміноспиртів КВМ-194 на проникність мембрани бактерій / М.Л. Дронова // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Медичні та фармацевтичні науки», м. Київ, 27-28 березня 2015 р. – Київ, 2015. – С 86–89.
18. Антистафилококковая активность производных арилалифатических аминоспиртов / М.Л. Дронова, Н.А. Врынчану, Ю.В. Короткий, Д.М. Дудікова, В.В. Недашковская, А.В. Цыкоза, А.С. Ємсенко // Матеріали XXII Российского национального конгресса «Человек и лекарство», г. Москва, 6-10 апреля 2015 г. – Москва, 2015. – С. 197.
19. КВМ-213 – нове похідне арилаліфатичних аміноспиртів з антимікробною дією / М.Л. Дронова, З.С. Суворова, А.С. Ємсенко, А.В. Цыкоза // Матеріали XV наукової конференції студентів та молодих учених «Новини і перспективи медичної науки», м. Дніпропетровськ, 15-17 квітня 2015 р. – Дніпропетровськ, 2015. – С. 42.
20. Дронова М.Л. Вплив похідного арилаліфатичних аміноспиртів на утворення білка в клітинах бактерій / М.Л. Дронова // Матеріали XII Міжнародної наукової

конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини», м. Харків, 16-17 квітня 2015 р. – Харків, 2015. – С. 113–114.

21. Дронова М.Л. Антимикробное действие производных арилалифатических аминоспиртов КВМ-120 и КВМ-121 / М.Л. Дронова, В.В. Недашковская, З.С. Суворова // Материалы 69-ой научно-практической конференции студентов и молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы современной медицины и фармации-2015», г. Минск, 15-17 апреля 2015 г. – Минск, 2015. – С. 1597.

22. Дронова М.Л. Постантибіотичний ефект похідного арилаліфатичних аміноспиртів 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-3-(N-бензилгексаметиленіміній)-2-пропанолу хлориду / М. Л. Дронова, Н.О. Вринчану // Матеріали VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії на шляхах доказової медицини», м. Вінниця, 9-10 листопада 2015 р. – Вінниця, 2015. – С. 126–128.

АНОТАЦІЯ

Дронова М. Л. Фармакодинамічні особливості антибактеріальної дії нових похідних арилаліфатичних аміноспиртів – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2016.

Дисертація присвячена вивченню антибактеріальних властивостей нових похідних арилаліфатичних аміноспиртів та дослідженню механізму їх інгібуючої дії. Проведеними дослідженнями встановлено наявність широкого спектру антимікробної активності у арилаліфатичних аміноспиртів. Виділена в скринінгових експериментах сполука 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-3-(N-бензилгексаметиленіміній)-2-пропанолу хлорид (КВМ-194) виявляє ефективність при генералізованій інфекції та місцевих гнійно-запальних процесах бактеріального генезу. Механізм антибактеріальної дії КВМ-194 є комплексним, зумовлений мембранотропними властивостями, здатністю порушувати функціонування транспортних систем та впливом на внутрішньоклітинні процеси, що відрізняє сполуку від сучасних антибактеріальних засобів. Наявність бактерицидного ефекту, відсутність залежності інгібуючої дії від рН, відсутність змін чутливості бактерій впродовж тривалого застосування свідчить про перспективність створення на основі похідних арилаліфатичних аміноспиртів нових антимікробних засобів.

Ключові слова: фармакодинаміка, арилаліфатичні аміноспирти, антибактеріальна активність, механізм дії, захворювання бактеріального генезу.

АННОТАЦИЯ

Дронова М. Л. Фармакодинамические особенности антибактериального действия новых производных арилалифатических аминоспиртов – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.05 – фармакология. – Национальный фармацевтический университет МОЗ Украины, Харьков, 2016.

Диссертация посвящена изучению антибактериальных свойств новых производных арилалифатических аминоспиртов и исследованию механизма их ингибирующего действия. Проведенными скрининговыми экспериментами установлено, что среди 42 производных арилалифатических аминоспиртов антибактериальные свойства проявляют 32 соединения, антифунгальные – 29, широким спектром действия (активностью относительно бактерий и грибов) обладают 27 соединений. Анализ зависимости «химическая структура – антимикробная активность» свидетельствует о том, что наличие в структуре молекулы 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенильного радикала является необходимым условием для проявления поливалентного действия (антибактериальной и антифунгальной активности). Установлена прямая зависимость выраженности антимикробного действия от размера молекул и их липофильности. Результаты исследования спектра действия производных арилалифатических аминоспиртов свидетельствуют о способности соединений угнетать рост и размножение грамположительных кокков и палочек, грамотрицательных бактерий семейств *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae*, а также микоплазм. Наиболее чувствительными к действию арилалифатических аминоспиртов являются грамположительные бактерии. Установлено, что исследуемые соединения также способны ингибировать пленкообразование и разрушать биопленки золотистого стафилокока. В экспериментах *in vitro* было выделено соединение с выраженными антибактериальными свойствами 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-3-(N-бензилгексаметилениминий)-2-пропанола хлорид (КВМ-194). Токсикологические исследования показали, что соединение относится к IV классу токсичности (малотоксичные вещества) при внутрибрюшинном (ЛД₅₀ – 515,0 мг/кг), внутрижелудочном (ЛД₅₀ – 890,0 мг/кг) введении и при нанесении на кожу (ЛД₅₀ > 2500,0 мг/кг). При углубленном исследовании антибактериальных свойств КВМ-194 было показано, что соединение обладает бактерицидным действием, длительность постантибиотического эффекта составляет 2 часа, активность не зависит от рН среды. Резистентность к соединению развивается медленно, кроме того, КВМ-194 не способствует возникновению устойчивости золотистого стафилококка к пенициллинам, линкозамидам, макролидам и фторхинолонам. При изучении антибактериальных свойств *in vivo* было выявлено, что соединение проявляет терапевтическую эффективность на моделях генерализованной синегнойной инфекции и местных гнойно-воспалительных процессов, обусловленных *S. aureus*. Для установления механизма действия производных арилалифатических аминоспиртов были проведены исследования мембранотропного действия соединений и их влияния на внутриклеточные процессы бактерий. Согласно данным электронной микроскопии, соединение КВМ-194 способно вызывать изменения ультраструктуры бактерий уже через 1 ч инкубации, при продлении срока действия до 24 ч наблюдаются нарушения деления, фрагментация нуклеоида и лизис клеток. Установлено, что КВМ-194 не влияет на содержание ЛПС во внешней мембране *E. coli*, но изменяет количественные соотношения отдельных жирных кислот и моносахаридов в его составе. При изучении влияния соединения на цитоплазматическую мембрану бактерий было

показано существенное увеличение её проницаемости. Результаты исследования влияния КВМ-194 на функционирование транспортных систем свидетельствуют о способности соединения угнетать активность эффлюксных помп, а при совместном действии с резерпином наблюдается наиболее выраженный эффект. Подтверждением мембранотропной активности соединения КВМ-194 является его способность к ингибированию активности субстратного и эндогенного дыхания как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. При исследовании влияния КВМ-194 на внутриклеточные процессы было показано изменение соотношений жирных кислот в общем жирнокислотном составе клеток, увеличение содержания белка и снижение количества ДНК, а также ингибирование активности ферментов катаболизма. Механизм антибактериального действия КВМ-194 является комплексным, обусловленным мембранотропными свойствами, способностью нарушать функционирование транспортных систем и влиянием на внутриклеточные процессы, что отличает соединение от современных антибактериальных средств. Наличие бактерицидного эффекта, отсутствие зависимости ингибирующего действия от pH и отсутствие изменений чувствительности бактерий в течение длительного применения свидетельствуют о перспективности создания на основе производных арилалифатических аминоспиртов новых антимикробных средств.

Ключевые слова: фармакодинамика, арилалифатические аминоспирты, антибактериальная активность, механизм действия, заболевания бактериального генеза.

SUMMARY

Dronova M. L. Pharmacodynamic features of antibacterial action of arylaliphatic aminoalcohols' novel derivatives – The manuscript.

Thesis for the degree of candidate of pharmaceutical sciences in specialty 14.03.05 – pharmacology. – National University of Pharmacy of the Ministry of Healthcare of Ukraine, Kharkiv, 2016.

The thesis is devoted to investigation of antibacterial properties of novel arylaliphatic aminoalcohol derivatives and their mechanism of action. The data obtained suggest, that arylaliphatic aminoalcohols possess a broad spectrum of antimicrobial activity. *In vitro* results allowed us to choose 1-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy]-3-(N-benzylhexametylenimino)-2-propanol chloride (compound KVM-194) for the further studies. Compound showed efficacy on the models of generalized and local bacterial infections as well. The mechanism of KVM-194 antibacterial action is complex, due to the alteration of cytoplasmic membrane, efflux inhibition, and influence on the intracellular processes. Observed properties differentiate arylaliphatic aminoalcohol derivative from the current antibacterials. Distinct bactericidal properties, pH-independent activity and permanent susceptibility of bacteria in the case of prolonged impact reveal the promises of arylaliphatic aminoalcohols for the development of new antimicrobials.

Keywords: pharmacodynamics, arylaliphatic aminoalcohols, antibacterial activity, mechanism of action, bacterial diseases.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

МІК – мінімальна інгібуюча концентрація

ЛПС – ліпополісахарид

ПАЕ – постантибіотичний ефект

ЦПМ – цитоплазматична мембрана