

Національна академія медичних наук України
Державна установа «Інститут фармакології та
токсикології Національної академії медичних наук України»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Гуменюк Наталія Ігорівна

Прим. № _____

УДК 547.233: 615.281.9: 579.262: 615.015

ДИСЕРТАЦІЯ

**Фармакодинамічні особливості антибіоплівкової дії похідних
4-(1'-адамантил)-1R-бензолу**

091 – Біологія, освітньо-наукова програма «Фармакологія»

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктор філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Н. І. Гуменюк

Науковий керівник: Вринчану Ніна Олексіївна, доктор медичних наук,
старший дослідник

Київ – 2025

АНОТАЦІЯ

Гуменюк Н. І. Фармакодинамічні особливості антибіоплівкової дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» (09 – Біологія). – ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ, 2025.

Резистентність мікроорганізмів до антимікробних засобів залишається актуальною проблемою, що становить загрозу для життя людей. Одним з важливих факторів, які сприяють зростанню та поширенню антибіотикорезистентних штамів бактерій, є формування біоплівки. Мікробні спільноти можуть бути причиною хронічних рецидивуючих інфекцій (близько 80 %), неефективності антибіотикотерапії та ускладнень, оскільки утворюючи біоплівки, останні захищають мікроорганізми від дії антимікробних препаратів та факторів імунної системи. Лікування пацієнтів із захворюваннями, асоційованими з біоплівками, потребує збільшення матеріальних витрат та тривалості терапії, зростає ризик летальності хворих.

Тому на сьогодні існує гостра потреба у пошуку альтернативних методів підвищення ефективності лікування пацієнтів з інфекціями, спричиненими біоплівками, враховуючи нові можливі мішені впливу для порушення різних етапів плівкоутворення. Зокрема, ключовою стратегією вирішення проблеми є дослідження вже впроваджених в клінічну практику лікарських засобів та пошук нових речовин серед різних хімічних груп.

Дисертаційна робота присвячена вивченню особливостей антибіоплівкової активності нових похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій (метицилін-резистентного *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*), які віднесені до переліку пріоритетних мікроорганізмів для створення нових антимікробних засобів.

У дослідженнях використані 2 сполуки: 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил) бензол (шифр АМ-166), отримана від ПАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-

фармацевтичний завод» (Україна) та 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-(N-бензил, N-диметиламіно)-2-пропанолу хлорид (шифр KBM-97), синтезована в Інституті органічної хімії НАН України. За допомогою комплексу сучасних методів дослідження оцінено механізм їх антибіоплівкової дії з урахуванням різних етапів плівкоутворення та особливостей формування біоплівок метицилін-резистентним *S. aureus* (MRSA), *E. coli*, *P. aeruginosa*.

В експериментах *in vitro* встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу виявляють виразну антибіоплівкову активність щодо грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів на перших етапах плівкоутворення.

За їх дії на грампозитивні бактерії (MRSA) спостерігається зменшення біомаси біоплівок (при 0,5 МІК та 5,0 МІК) та кількості метаболічно активних клітин (у концентраціях, що перевищують 1,0 МІК). При дослідженні впливу сполук на плівкоутворення грамнегативних бактерій (*E. coli*, *P. aeruginosa*) встановлено, що АМ-166 у концентраціях від 0,15 МІК до 5,0 МІК зменшує біомасу біоплівки та життєздатність клітин *E. coli* (у межах від 36,9 % до 96,5 %). Менш виразна, але подібна дія похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу відмічена щодо штаму *P. aeruginosa*, окрім сполуки KBM-97 при 0,15 МІК.

Похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу впливають на неспецифічні та специфічні фактори адгезії мікроорганізмів. Відмічено зменшення гідрофобних властивостей поверхні клітин MRSA за дії АМ-166 та клітин *P. aeruginosa* за впливу KBM-97. Встановлено, що адамантанвмісні сполуки не впливають на *swimming*-міграцію *E. coli* та пригнічують цей тип рухливості у *P. aeruginosa* (АМ-166 за дії 0,5 МІК та 2,0 МІК, KBM-97 – лише 2,0 МІК). Менш виразну інгібувальну активність похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу виявляють щодо *swarming*-рухливості *P. aeruginosa* (АМ-166 при 0,5 МІК та 2,0 МІК) та стимулюють її у *E. coli*. Досліджувані сполуки пригнічують *twitching*-міграцію грамнегативних бактерій *E. coli* та *P. aeruginosa*.

Згідно з результатами досліджень, АМ-166 та KBM-97 не порушують утворення метаболічно інертних клітин-персистерів *S. aureus* (їх частка у межах

від 0,11 % до 0,71 %) і *P. aeruginosa* (< 0,31 %) та зменшують або запобігають формуванню персистерів *E. coli* (кількість персистерів від 10^{-8} % до 10^{-4} %).

Встановлено, що клітини-персистери *P. aeruginosa* виявляють чутливість до АМ-166 та КВМ-97 за дії у концентрації, що перевищує 1,0 МІК.

Ефективність 0,05 % розчину КВМ-97 доведена у дослідженнях *in vivo* на моделі хірургічної шкірної рани у щурів, інфікованої мікст-збудниками (*S. aureus* + *P. aeruginosa* + *C. albicans*). Сполука КВМ-97 виявляє антиадгезивні властивості у лікувально-профілактичному та лікувальному режимі, забезпечуючи зниження мікробної контамінації на поверхні та у глибині рани.

Антимікробна активність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу спостерігається за умови нанесення на поліпропіленову хірургічну сітку для відновлювальної хірургії. Більш виразна та тривала дія адамантанвмісних сполук відмічена щодо монокультур грампозитивних бактерій (MSSA, MRSA) та дріжджоподібних грибів *C. albicans* зі зниженою чутливістю до антифунгальних засобів. Активність АМ-166 та КВМ-97 щодо грамнегативних бактерій (*E. coli*, *P. aeruginosa*) та мікробної асоціації (*P. aeruginosa* + *E. coli* + *C. albicans*) поступається такій щодо грампозитивних мікроорганізмів.

Досліджувані сполуки зумовлюють деструкцію біоплівки, сформованих грампозитивними та грамнегативними бактеріями. За дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу у концентраціях 0,5 МІК та 5,0 МІК спостерігається зменшення біомаси 2-добових біоплівок MRSA (АМ-166 лише за дії 5,0 МІК) у межах від 30,9 % до 34,5 % та 5-добових біоплівок *E. coli* – у межах від 25,9 % до 56,8 %. Суттєвого впливу адамантанвмісних сполук на життєздатність клітин золотистого стафілокока та кишкової палички (окрім АМ-166 при 5,0 МІК) у складі мікробних спільнот не виявлено. Сполука АМ-166 зменшує біомасу 5-добових біоплівок *P. aeruginosa* та кількість метаболічно активних клітин у їх складі як у субінібуючих концентраціях, так і у концентрації 2,0 МІК (у межах від 36,6 % до 81,0 %). Антибіоплівкова активність КВМ-97 щодо біоплівок, сформованих *P. aeruginosa*, більш виразна у концентраціях, що перевищують 1,0 МІК.

У експериментах показано, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу проникають через матрикс біоплівки, сформованої метицилін-резистентним *S. aureus*, та практично не впливають на його складові. Згідно з отриманими даними, досліджувані сполуки характеризуються обмеженою проникністю через матрикс біоплівок *E. coli* та *P. aeruginosa*. За їх дії виявлено зміни вмісту білкових та полісахаридних компонентів позаклітинного матриксу.

Отримані дані молекулярних досліджень свідчать, що тест-штам *S. aureus* здатний до плівкоутворення (ідентифіковані гени *icaA*, *icaD*, *sarA*, *cidA*, *agrA*, *fib*, *fnbB*, *clfB*, *ebpS*, *eno*), а наявність гена *mecA* підтверджує віднесення клінічного штаму до MRSA. Встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу змінюють експресію генів плівкоутворення. За дії AM-166 та KBM-97 (0,5 МІК) відмічено зменшення експресії генів *icaADBC*-оперону: *icaA* та *icaD* (KBM-97), збільшення активності регуляторного гена *icaR*, що призводить до порушення синтезу основного компоненту матриксу PIA-полісахариду. Адамantanвмісні сполуки пригнічують транскрипційну активність гена системи Quorum sensing *agrA* (KBM-97), генів, що регулюють синтез поверхневих білків-адгезинів (*clfB*, *fib*, *fnbB*, *ebpS*, *eno*), змінюють експресію гена *cidA*, відповідального за вивільнення еДНК у MRSA. Похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу зумовлюють геномну мінливість у метицилін-резистентного золотистого стафілококу.

У результаті проведених досліджень виявлено, що сполука AM-166 впливає на експресію генів, що забезпечують рухливість *E. coli* та адгезію клітин до субстрату: зменшує транскрипційну активність генів *fliC* (у 1,4 раза) і *motB* (у 1,5 раза), що беруть участь у синтезі структурних компонентів джгутиків – флагеліну, субодиниці джгутикового філаменту, та білка комплексу MotAB, статорного елементу джгутикового моторного комплексу. Сполука AM-166 збільшує експресію гена пілей 1 типу *fimA* (у 2,9 раза) та за її дії виявлено тенденцію до зниження експресії гена *rapC* ($p > 0,05$), відповідального за формування Р-фібріл. Сполука KBM-97 суттєво не змінює експресію досліджуваних генів у кишкової палички. Вплив адамantanвмісних

сполук на афімбріальні адгезини не встановлено, через відсутність у тест-штаму гена *afa* кластера *afa-3*, який експресується вірулентними уропатогенними та ентеропатогенними штамами *E. coli*.

Показано, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу впливають на експресію генів, що регулюють енергетичні процеси у *E. coli*: пригнічують транскрипційну активність *appB*, *appX* та *malP*, *malZ* (лише KBM-97).

Встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу змінюють транскрипційну активність генів, що регулюють синтез полісахаридних компонентів матриксу Pel, Psl, альгінату (*pelA*, *pslA*, *algD*, *algL*, *algR*, *algU*, *mucA*) у *P. aeruginosa*. За дії AM-166 спостерігається стимуляція експресії генів *pelA*, *algD*, *algR* та пригнічення експресії *pslA*, *algL*, *algU*, *mucA*. Сполука KBM-97 суттєво не впливає на експресію генів *pelA*, *pslA*, *algU*, збільшує активність генів *algD*, *algR* та зменшує експресію *algL*, *mucA*. В результаті досліджень отримано суперечливі результати щодо впливу сполук на синтез екзополісахаридів, що потребує детального вивчення.

Проведені дослідження показали, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу виявляють антивірулентну активність щодо *P. aeruginosa*. Сполуки AM-166 та KBM-97 у субінгібуючих концентраціях впливають на продукцію піоціаніну та гемолітичну активність бактеріальних клітин. Встановлено, що за дії AM-166 та KBM-97 (0,5 МІК) знижується експресія генів, що регулюють функціонування Quorum sensing (Las, Pqs) – *lasI*, *lasR*, *pqsR*, та підвищується експресія гена *rhlR* Rhl-системи. Сполуки пригнічують продукцію факторів вірулентності алкалін металопротеїнази, екзоферменту S, екзотоксину А через зменшення експресії відповідних генів *aprA*, *exoS*, *exoA*. За дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу виявлено порушення активності ефлюксних pomp родини RND, що реалізується змінами транскрипційної активності генів *mexB*, *mexY*, *oprM*, *mexR*, які залежать від штаму мікроорганізмів та його антибіотикочутливості.

Таким чином, результати проведених досліджень показали, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу виявляють антибіоплівкову дію, більш виразну на

початкових етапах плівкоутворення, що підтверджено експериментами *in vitro* та *in vivo*. Антибіоплівкова активність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій реалізується різними механізмами.

Отримані дані щодо зміни гідрофобності клітин грампозитивних бактерій (*S. aureus*), транскрипційної активності генів *icaADBC*-оперону, генів *cidA*, *agrA* системи Quorum sensing, генів *clfB*, *fib*, *finbB*, *ebpS*, *eno* свідчать про здатність сполук AM-166 та KBM-97 порушувати синтез білків-адгезинів та PIA-полісахариду, а також впливати на вивільнення еДНК з клітин метицилін-резистентного золотистого стафілококу. За впливу похідного 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу AM-166 на *E. coli* виявлено зміни експресії генів, що регулюють біосинтез флагеліну, фімбріального білка та білка комплексу MotAB, статорного елементу джгутикового моторного комплексу. Сполуки впливають на катаболізм глікогену та синтез субодиниці цитохрому bd-II дихального ланцюга *E. coli*. Похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу здатні модулювати утворення *P. aeruginosa* факторів вірулентності (рухливість клітин, продукція піоціаніну, алкалін металопротеїнази, екзотоксинів, гемолітична активність), порушувати функціонування ефлюксних pomp родини RND, змінювати експресію генів, відповідальних за функціонування систем міжклітинних взаємодій Quorum sensing.

Ключові слова: похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу, антимікробні препарати, біоплівки, бактерії, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, механізм дії, експресія генів.

ANNOTATION

Humeniuk N. I. Pharmacodynamic features of the antibiofilm action of 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene derivatives. – Qualifying scientific work on the rights of manuscript.

The thesis for a Doctor of Philosophy degree by speciality 091 “Biology” (09 – Biology). – SI “Institute of Pharmacology and Toxicology of NAMS of Ukraine”, Kyiv, 2025.

The resistance of microorganisms to antimicrobial agents remains a pressing problem that poses a threat to human life. One of the important factors contributing to the growth and spread of antibiotic-resistant strains of bacteria is the formation of biofilms. Microbial communities can be the cause of chronic recurrent infections (about 80 %), ineffectiveness of antibiotic therapy and complications, because by forming biofilms, they protect microorganisms from the effects of antimicrobial drugs and immune system factors. Treatment of patients with diseases associated with biofilms requires increased material costs and duration of therapy, and the risk of patient mortality increases.

Therefore, today there is an urgent need to find alternative methods to increase the effectiveness of treatment of patients with infections caused by biofilms, taking into account new possible targets for disrupting different stages of biofilm formation. In particular, the key strategy for solving the problem is the study of drugs already introduced into clinical practice and the search for new substances among different chemical groups.

The dissertation work is devoted to the study of the antibiofilm activity features of new derivatives of 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene against gram-positive and gram-negative bacteria (methicillin-resistant *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*), which are included in the list of priorities microorganisms for the creation of new antimicrobial agents.

The studies used 2 compounds: 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl) benzene (code AM-166) obtained from PJSC SVC "Borshchagov Chemical and

Pharmaceutical Plant" (Ukraine) and 1-[4-(1'-adamantyl)-phenoxy]-3-(N-benzyl,N-dimethylamino)-2-propanol chloride (code KVM-97) synthesized at the Institute of Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine. Using a set of modern research methods, the mechanism of their antibiofilm action was evaluated, taking into account the different stages of biofilm formation and the features of biofilm formation by methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), *E. coli*, *P. aeruginosa*.

In vitro experiments have shown that 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene derivatives exhibit antibiofilm activity against strains of gram-positive and gram-negative microorganisms at the first stages of biofilm formation.

Under their action on gram-positive bacteria (MRSA), a decrease in the biomass of MRSA biofilms (at 0.5 MIC and 5.0 MIC) and the number of metabolically active cells (at concentrations exceeding 1.0 MIC) is observed. In the study of compounds on the biofilm formation of gram-negative bacteria (*E. coli*, *P. aeruginosa*), it was found that AM-166 at concentrations from 0.15 MIC to 5.0 MIC reduces the biofilm biomass and the viability of *E. coli* cells (in the range from 36.9 % to 96.5 %). A less pronounced, but similar effect of 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene derivatives was observed against the *P. aeruginosa* strain, except for the KVM-97 compound at 0.15 MIC.

Derivatives of 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene affect nonspecific and specific adhesion factors of microorganisms. A decrease in the hydrophobic properties of the MRSA cells surface was noted under the action of AM-166, and of *P. aeruginosa* cells under the action of KVM-97. It was established that adamantane-containing compounds do not affect the *swimming*-migration of *E. coli* and inhibit this type of motility in *P. aeruginosa* (AM-166 under the action of 0.5 MIC and 2.0 MIC, KVM-97 – only 2.0 MIC). Derivatives of 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene exhibit less pronounced inhibitory activity against *swarming*-motility of *P. aeruginosa* (AM-166 at 0.5 MIC and 2.0 MIC) and stimulate it in *E. coli*. The studied compounds inhibit *twitching*-migration of gram-negative bacteria *E. coli* and *P. aeruginosa*.

According to the results of the studies, AM-166 and KVM-97 do not disrupt the formation of metabolically inert persister cells of *S. aureus* (their share ranges from

0.11 % to 0.71 %) and *P. aeruginosa* (< 0.31 %) and reduce or prevent the persisters formation of *E. coli* (the number of persisters is from 10^{-8} % to 10^{-4} %).

It was established that persister cells of *P. aeruginosa* are susceptible to AM-166 and KVM-97 at a concentration exceeding 1.0 MIC.

The effectiveness of 0.05 % KVM-97 solution was proven in *in vivo* studies on a model of surgical skin wound in rats infected with mixed pathogens (*S. aureus* + *P. aeruginosa* + *C. albicans*). The compound KVM-97 exhibits antiadhesive properties in the therapeutic-prophylactic and curative regimen, ensuring a reduction in microbial contamination on the surface and in the depth of the wound.

The antimicrobial activity of 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene derivatives is observed when applied to a polypropylene surgical mesh for reconstructive surgery. A more pronounced and prolonged effect of adamantane-containing compounds is noted against monocultures of gram-positive bacteria (MSSA, MRSA) and yeast-like fungi *C. albicans* with reduced sensitivity to antifungal agents. The activity of AM-166 and KVM-97 against gram-negative bacteria (*E. coli*, *P. aeruginosa*) and microbial association (*P. aeruginosa* + *E. coli* + *C. albicans*) is inferior to that against gram-positive microorganisms.

The studied compounds cause the destruction of biofilms formed by gram-positive and gram-negative bacteria. Under the action of 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene derivatives at a concentrations of 0.5 MIC and 5.0 MIC, a decrease in the biomass of 2-day MRSA biofilms (AM-166 only at 5.0 MIC) in the range from 30.9 % to 34.5 % and 5-day *E. coli* biofilms – in the range from 25.9 % to 56.8 % was observed. No significant effect of adamantane-containing compounds on the viability of *S. aureus* and *E. coli* cells (except AM-166 at 5.0 MIC) in the composition of microbial communities was detected. The AM-166 compound reduces the biomass of 5-day *P. aeruginosa* biofilms and the number of metabolically active cells in their composition both at subinhibitory concentrations and at a concentration of 2.0 MIC (in the range from 36.6 % to 81.0 %). The antibiofilm activity of KVM-97 against biofilms formed by *P. aeruginosa* is more pronounced at concentrations exceeding 1.0 MIC.

The experiments showed that 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene derivatives penetrate the matrix of the biofilm formed by methicillin-resistant *S. aureus* and practically do not affect its components. According to the obtained data the studied compounds characterized by limited penetration through the matrix of biofilms of *E. coli* and *P. aeruginosa*. Under their action, a changes in the amount of protein and polysaccharide components of the extracellular matrix were detected.

The obtained molecular research data indicate that the test strain *S. aureus* is able of the biofilms formation (the genes *icaA*, *icaD*, *sarA*, *cidA*, *agrA*, *fib*, *fnbB*, *clfB*, *ebpS*, *eno* were identified), the presence of *mecA* gene confirms the classification of the clinical strain as MRSA. It was established that 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene derivatives change the expression of biofilm-forming genes. Under the action of AM-166 and KVM-97 (0.5 MIC), a decrease in the expression of the genes of the *icaADBC* operon: *icaA* and *icaD* (KVM-97) was noted, and an increase in the activity of the regulatory gene *icaR*, which leads to a disruption of the synthesis of the main component of the PIA polysaccharide matrix. Adamantane-containing compounds inhibit the transcriptional activity of the Quorum sensing system gene *agrA* (KVM-97), genes regulating the synthesis of surface adhesin proteins (*clfB*, *fib*, *finbB*, *ebpS*, *eno*), change the expression of the *cidA* gene responsible for the release of eDNA in MRSA. Derivatives of 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene cause genomic variability in methicillin-resistant *S. aureus*.

As a result of the conducted studies, it was found that the compound AM-166 affects the expression of genes that ensure the motility of *E. coli* and adhesion of cells to the substrate: it reduces the transcriptional activity of the *fliC* (by 1.4 times) and *motB* (by 1.5 times) genes involved in the synthesis of the structural components of flagella – flagellin, the subunit of flagellar filament, and the protein of the MotAB complex, the stator unit of the flagellar motor complex. The AM-166 compound increases the expression of the type 1 pili gene *fimA* (by 2.9 times) and under the action a tendency to decrease the expression of the *papC* gene ($p > 0.05$), responsible for the formation of P-fimbriae, was detected. The compound KVM-97 does not significantly change the expression of the studied genes in *E. coli*. The effect of

adamantane-containing compounds on afimbrial adhesins was not established because of absence of the *afa* gene of the *afa-3* cluster in the test strain, which is expressed by virulent uropathogenic and enteropathogenic *E. coli* strains.

It has been shown that 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene derivatives affect the expression of genes that regulate energy processes in *E. coli*: they suppress the transcriptional activity of *appB*, *appX* and *malP*, *malZ* (only KVM-97).

It was found that 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene derivatives change the transcriptional activity of genes that regulate the synthesis of polysaccharide components of the matrix Pel, Psl, alginate (*pelA*, *pslA*, *algD*, *algL*, *algR*, *algU*, *mucA*) in *P. aeruginosa*. Under the action of AM-166, stimulation of the expression of the *pelA*, *algD*, *algR* genes and inhibition of the expression of *pslA*, *algL*, *algU*, *mucA* are observed. The compound KVM-97 does not significantly affect the expression of the *pelA*, *pslA*, *algU* genes, increases the activity of the *algD*, *algR* genes and reduces the expression of *algL*, *mucA*. As a result of the studies, contradictory results were obtained regarding the effect of the compounds on the synthesis of exopolysaccharides, which requires detailed study.

The conducted studies showed that 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene derivatives exhibit antivirulent activity against *P. aeruginosa*. Compounds AM-166 and KVM-97 in subinhibitory concentrations affect the production of pyocyanin and hemolytic activity of bacterial cells. It was established that under the action of AM-166 and KVM-97 (0.5 MIC) the expression of genes regulating the functioning of QS (Las, Pqs) – *lasI*, *lasR*, *pqsR*, and the expression of the *rhlR* gene of the Rhl system increases. The compounds inhibit the production of virulence factors alkaline metalloproteinase, exoenzyme S, exotoxin A by reducing the expression of the corresponding genes *aprA*, *exoS*, *exoA*. Under the action of 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene derivatives, a violation of the activity of efflux pumps of the RND family was detected, which is realized by changes in the transcriptional activity of the *mexB*, *mexY*, *oprM*, *mexR* genes, which depend on the strain of microorganisms and its antibiotic susceptibility.

Thus, the results of the studies showed that 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene derivatives exhibit antibiofilm activity, which is more pronounced at the initial stages of biofilm formation, that was confirmed by *in vitro* and *in vivo* experiments. The antibiofilm activity of 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene derivatives against gram-positive and gram-negative bacteria is realized by different mechanisms.

The obtained data on the change in the hydrophobicity of gram-positive bacteria (*S. aureus*) cells, the transcriptional activity of the *icaADBC* operon genes, the *cidA*, *agrA* genes of the Quorum sensing system, the *clfB*, *fib*, *finbB*, *ebpS*, and *eno* genes indicate the ability of the AM-166 and KVM-97 compounds to disrupt the synthesis of adhesin proteins and PIA polysaccharide, as well as to affect the release of eDNA from methicillin-resistant *S. aureus* cells. Under the action of 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene derivative AM-166, a changes in the expression of genes that regulate the biosynthesis of the flagellin, fimbrial protein and the protein of the MotAB complex, the stator unit of the flagellar motor complex, were detected. The compounds affect glycogen catabolism and the synthesis of the cytochrome bd-II subunit of the respiratory chain of *E. coli*. Derivatives of 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene are able to modulate the formation of *P. aeruginosa* virulence factors (cell motility, production of pyocyanin, alkaline metalloproteinase, exotoxins, hemolytic activity), disrupt the functioning of efflux pumps of the RND family, and change the expression of genes responsible for the functioning of Quorum Sensing intercellular interaction systems.

Key words: 4-(1'-adamantyl)-1R-benzene derivatives, antimicrobial agents, biofilms, bacteria, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, mechanism of action, genes expression.

Список публікацій здобувача:

1. Антибактеріальна активність амінопропанолів з адамантильним і N-алкіларильним радикалом відносно біоплівки *E. coli* / Дудікова Д. М., Вринчану Н. О., Короткий Ю. В., Дронова М. Л., Суворова З. С., Шарова А. О., Гринчук Н. І., Недашківська В. В. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2017. № 6. С. 37–42. (Особистий внесок – брала участь у дослідженнях, обробці, узагальненні результатів та підготовці тексту статті до публікації).

2. Вплив 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензил, N-диметиламіно)-2-пропанол хлориду на компоненти матриксу біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* / Дудікова Д. М., Гринчук Н. І., Суворова З. С., Недашківська В. В., Вринчану Н. О. *The scientific heritage*. 2018. № 25. С. 3–9. (Особистий внесок – виконано частину експериментального блоку, проведено статистичну обробку та аналіз даних, підготовлено статтю до публікації).

3. Біоплівки. Сучасний стан та перспективи антимікробної терапії / Вринчану Н. О., Дудікова Д. М., Гринчук Н. І., Недашківська В. В. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2019. № 5. С. 311–321. <https://doi.org/10.33250.13.05.311>. (Особистий внесок – аналіз літературних джерел та підготовка тексту статті до публікації).

4. Antibiofilm effect of adamantane derivative against *Staphylococcus aureus* / Hrynchuk N. I., Vrynchanu N. O., Buchtyarova T. A., Dudikova D. M., Korotkyi Yu. V., Bondarenko L. B. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*. 2021. Vol. 83, № 1. P. 58–67. <https://doi.org/10.15407/microbiolj83.01.058> (Scopus, Q4). (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, проведення експериментів, аналіз результатів та підготовка тексту статті до публікації).

5. Гринчук Н. І., Бойко І. О., Вринчану Н. О. Антибіоплівкова дія ципрофлоксацину щодо *Pseudomonas aeruginosa*. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. Т. 15, № 2. С. 82–91. <https://doi.org/10.33250/15.02.082>. (Особистий внесок – брала участь у дослідженнях, аналізі та обговоренні результатів, підготовці тексту статті до публікації).

6. Anti-adhesion properties of 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl) benzole against *Escherichia coli* / Hrynychuk N., Bukhtiarova T., Vrynchanu N., Ishchenko L., Vazhnichay E. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. Т. 15, № 6. С. 380–393. <https://doi.org/10.33250/15.06.380>. (Особистий внесок – брала участь у аналізі літературних джерел, проведенні досліджень, аналізі та обговоренні результатів, підготовці тексту статті до публікації).

7. Antibiofilm activity of 4-(adamantyl-1) -1- (1-aminobutyl) benzol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Hrynychuk N., Zelena L., Bukhtiarova T., Vrynchanu N, Ishchenko L., Vazhnichaya E. *Mikrobiolohichni Zhurnal*. 2022. Vol. 84, № 3. С. 39–50. <https://doi.org/10.15407/microbiolj84.03.039> (Scopus, Q4). (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, проведення досліджень, аналіз результатів та підготовка тексту статті до публікації).

8. Гуменюк Н. І., Вринчану Н. О., Іщенко Л. М. Вплив похідного адамантану на експресію генів плівкоутворення *P. aeruginosa*. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2023. Т. 17, № 1. С. 44–52. <https://doi.org/10.33250/17.01.044>. (Особистий внесок – брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів, підготовці тексту статті до публікації).

9. Антивірулентні властивості похідного адамантану 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил) бензолу щодо *Pseudomonas aeruginosa* / Гуменюк Н. І., Вринчану Н. О., Зелена Л. Б., Іщенко Л. М., Бухтіарова Т. А., Бойко І. О. *Innovative Biosystems and Bioengineering*. 2023. Vol. 7, № 3. Р. 44–54. <https://doi.org/10.20535/ibb.2023.7.3.282006> (Scopus, Q4). (Особистий внесок – брала участь у аналізі літературних джерел, проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, підготовці тексту статті до публікації).

10. Effect of adamantane derivative on expression of biofilm-associated genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Humeniuk N., Zelena L., Vrynchanu N., Ishchenko L., Bukhtiarova T., Korotkij Y., Vazhnichaya E. *Medicine in Drug Discovery*. 2023. Vol. 18. P. 100155. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2023.100155> (Scopus, Q2). (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, проведення

досліджень, аналіз та обговорення результатів, підготовка тексту статті до публікації).

11. Гуменюк Н. Антиадгезивні властивості 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил)бензолу щодо *Staphylococcus aureus*. *Innovative Biosystems and Bioengineering*. 2025. Vol. 9, № 2. Р. 21–28. <https://doi.org/10.20535/ibb.2025.9.2.313507> (Scopus, Q4). (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, проведення досліджень, аналіз та обговорення результатів, підготовка тексту статті до публікації).

12. КПКВ-6561040 Похідне адамантану (ПА) 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензилдиметиламіно)-2-пропанолу хлорид для профілактики інфікування ран та формування біоплівки / Вринчану Н. О., Гринчук Н. І., Недашківська В. В., Бойко І. О. Інформаційний Бюлетень. Київ. 2021. Випуск 51. С. 162–163.

13. Гринчук Н. І. Вплив азитроміцину на адгезивні властивості *Staphylococcus aureus*. Мат. Буковинського міжнар. медико-фармацевтичного конгресу студентів і молодих учених, ВІМСО – 2018, м. Чернівці, 4 – 6 квітня 2018 р. Чернівці, 2018. С. 408.

14. Dudikova D, Hrynychuk N, Vrynychan N. Influence of KVM-97 on cell surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. 4th International conference of cell biology, Krakow, May 11–12, 2018. Krakow, Poland, 2018. P. 71.

15. Отримання клітин-персистерів *Pseudomonas aeruginosa* / Гринчук Н. І. Дудікова Д. М., Суворова З. С., Вринчану Н. О. Мат. Наукової конференції присвяченій 100-річчю кафедри мікробіології, вірусології та імунології «Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології», м. Київ, 5 листопада 2019 р. Київ, 2019. С. 44–45.

16. Вплив адамантанвмісної сполуки на патогенність *Pseudomonas aeruginosa* / Гринчук Н. І., Вринчану Н. О., Дудікова Д. М., Недашківська В. В. Матеріали IV Міжнар. наук. практ. конф. «Ліки – людині.

Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» у 2-х т., м. Харків, 12–13 березня 2020 р. Харків, НФаУ, 2020. – Т. 2. С. 199–201.

17. Гринчук Н. І., Вринчану Н. О., Дудікова Д. М. Формування персистерів *Escherichia coli* за дії сполуки з адамантильним радикалом. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в сучасній клінічній і лабораторній медицині: матеріали дистанційної наук.-практ. конф., м. Харків, 19 березня 2020 р. Х. : НФаУ, 2020. С. 27.

18. Гринчук Н. І., Вринчану Н. О., Короткий Ю. В. Вплив адамантанвмісної сполуки на гемолітичну активність *Pseudomonas aeruginosa*. Науково-практична конференція «Другий національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 175-річчю з дня народження І. І. Мечникова», м. Харків, 16–17 вересня 2020 р. Харків, 2020. С. 35–37.

19. Detection of *mecA*, *ica*, *icaA*, *icaD* genes in clinical strain of *Staphylococcus aureus* using polymerase chain reaction / Hrynychuk N. I., Ishchenko L. M., Zelena L. B., Boiko I. O., Vrynchanu N. O. Міжнародний симпозіум зі зменшення біологічної загрози 2021 р. (IBTRS 2021), Віртуальний, 28 червня – 2 липня 2021 р. С. 18.

20. Influence of adamantane derivative KVM-97 on *cidA* gene expression in *Staphylococcus aureus* / Hrynychuk N., Boiko I., Vrynchanu N., Zelena L., Ishchenko L., Korotkyi Yu. “Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology”: materials of III Scientific and practical Conference of young researchers, Kyiv, November 09–11, 2021. Kyiv, Ukraine. 2021. P. 16.

21. Експресія генів *appB*, *appX* у *Escherichia coli* за дії похідного адамантану / Вринчану Н. О., Зелена Л. Б., Гуменюк Н. І. Бойко І. О., Короткий Ю. В. «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології (Пам'яті професора В.В. Дунаєва)»: збірка тез II науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Запоріжжя, 22 листопада 2022 р. Запоріжжя, 2022. С. 58–59.

22. Influence of adamantane derivative on the formation of *Pseudomonas aeruginosa* persists / Humeniuk N, Boiko I, Nedashkivska V, Vrynchanu N, Vazhnichaya E, Korotkij Yu. “Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology”: materials of IV Scientific and practical Conference of young researchers, Kyiv, November 15–17, 2022. Kyiv, Ukraine. 2022. P. 10.

23. Експресія ефлюкс-асоційованого гена *oprM* *Pseudomonas aeruginosa* за дії похідного адамантану / Гуменюк Н. І., Вринчану Н. О., Іщенко Л. М., Недашківська В. В., Короткий Ю. В. Матеріали III науково-практичної міжнародної дистанційної конференції «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині», м. Харків, 24 березня 2023 р. Харків, 2023. С. 77–78.

24. Вплив похідного адамантану на експресію генів токсиноутворення *P. aeruginosa* / Гуменюк Н. І., Зелена Л. Б., Вринчану Н. О., Недашківська В. В., Бойко І. О. Міжнародна науково-практична конференція «Продовольча та екологічна безпека в умовах війни та повоєнної відбудови: виклики для України і світу», м. Київ, 25 травня 2023 р. Київ. 2023. С. 58–60.

25. Вплив похідних амінопропанолу на експресію генів токсиноутворення *Pseudomonas aeruginosa* / Вринчану Н. О., Зелена Л. Б., Гуменюк Н. І., Короткий Ю. В. Міжнародна науково-практична конференція «Експериментальна та клінічна фармакологія», присвячена 100-річчю кафедри фармакології НФаУ, м. Харків, 23–24 жовтня 2024 р. Харків. 2024. С. 91–92.

ЗМІСТ

	Стор.
АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ ВИМІРЮВАННЯ, СКОРОЧЕНЬ	22
ВСТУП	23
РОЗДІЛ 1 БІОПЛІВКИ ТА ХРОНІЧНІ ІНФЕКЦІЇ. ПРОБЛЕМИ АНТИМІКРОБНОЇ ХІМІОТЕРАПІЇ ПРИ БІОПЛІВКОВИХ ІНФЕКЦІЯХ ТА ШЛЯХИ ЇХ ВИРІШЕННЯ (Огляд літератури)	31
1.1 Роль біоплівок у розвитку хронічних інфекцій	31
1.2 Антимікробна хіміотерапія біоплівкових інфекцій: стан та перспективи	41
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	51
2.1 Матеріали дослідження	51
2.2 Методи дослідження	52
РОЗДІЛ 3 ПЛІВКОУТВОРЕННЯ ГРАМПОЗИТИВНИХ ТА ГРАМНЕГАТИВНИХ БАКТЕРІЙ ЗА ДІЇ ПОХІДНИХ 4-(1'- АДАМАНТИЛ)-1R-БЕНЗОЛУ	70
3.1 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на плівкоутворення бактерій в експериментах <i>in vitro</i>	70
3.2 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на неспецифічні та специфічні фактори адгезії мікроорганізмів	79
3.2.1 Вплив сполук на неспецифічні фактори адгезії	80
3.2.2 Вплив сполук на специфічні фактори адгезії	83
3.3 Утворення клітин-персистерів грампозитивними та грамнегативними бактеріями за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R- бензолу	87

3.4 Антиадгезивна активність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу в експериментах <i>in vivo</i> та на засобах медичного призначення	91
Висновки до розділу 3	97
РОЗДІЛ 4 ВПЛИВ ПОХІДНИХ 4-(1'-АДАМАНТИЛ)-1R-БЕНЗОЛУ НА СФОРМОВАНІ БІОПЛІВКИ ГРАМПОЗИТИВНИХ ТА ГРАМНЕГАТИВНИХ БАКТЕРІЙ	101
4.1 Чутливість сформованих біоплівки бактерій до дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу	101
4.2 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на продукцію компонентів позаклітинного матриксу біоплівок	112
4.3 Проникність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу через матрикс біоплівок грампозитивних та грамнегативних бактерій	117
Висновки до розділу 4	118
РОЗДІЛ 5 ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ПОХІДНИХ 4-(1'-АДАМАНТИЛ)-1R-БЕНЗОЛУ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ У БАКТЕРІЙ	121
5.1 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на транскрипційну активність генів <i>S. aureus</i>	121
5.2 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на транскрипційну активність генів <i>E. coli</i>	128
5.3 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на транскрипційну активність генів <i>P. aeruginosa</i>	132
Висновки до розділу 5	138
РОЗДІЛ 6 АНТИВІРУЛЕНТНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОХІДНИХ 4-(1'-АДАМАНТИЛ)-1R-БЕНЗОЛУ	141
6.1 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на QS-залежні клітинні процеси у <i>P. aeruginosa</i>	141
6.2 Експресія генів, що регулюють патогенність <i>P. aeruginosa</i> за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу	148

6.3 Експресія генів, що регулюють функціонування ефлюкських помп у <i>P. aeruginosa</i>	151
Висновки до розділу 6	154
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	157
ВИСНОВКИ	178
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	182
ДОДАТКИ	228

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ ВИМІРЮВАННЯ, СКОРОЧЕНЬ

AI	– Аутоіндуктор
AM, KBM	– Літерні шифри сполук
АМП	– Антимікробний препарат
АФК	– Активні форми кисню
ДМСО	– Диметилсульфоксид
єДНК	– Позаклітинна ДНК
КУО	– Колонієутворювальні одиниці
МІК	– Мінімальна інгібуюча концентрація
ПЛР	– Полімеразна ланцюгова реакція
ПС	– Поживне середовище
суб-МІК	– Субінгібуюча концентрація
c-di-GMP	– Bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (циклічний біс-(3',5')-димерний гуанозинмонофосфат)
dNTP	– Deoxynucleotide (дезоксинуклеотид)
EPS	– Extracellular polymeric substances (позаклітинні полімерні речовини, позаклітинний матрикс)
MRSA	– Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (метицилін-резистентний <i>Staphylococcus aureus</i>)
PIA	– Polysaccharide intercellular adhesin (полісахаридний міжклітинний адгезин)
QS	– Quorum sensing
SDS	– Sodium dodecyl sulfate (додецилсульфат натрію)

ВСТУП

Актуальність теми. Резистентність збудників інфекційних захворювань до антимікробних препаратів (АМП) є серйозною проблемою біобезпеки та становить загрозу для життя людей. У 2015 р. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) затвердила «Глобальний план дій щодо стримування розповсюдження стійкості до антимікробних препаратів», а у 2019 р. Кабінет Міністрів України «Національний План дій боротьби зі стійкістю до протимікробних препаратів». У 2021 р. Рада національної безпеки і оборони України у своєму рішенні «Про Стратегію біобезпеки та біологічного захисту» визначила антибіотикорезистентність як нагальну проблему сьогодення та загрозу зростання смертності населення від інфекційних захворювань, спричинених стійкими до АМП штамами мікроорганізмів.

На сьогодні відмічається, що багато впроваджених в клінічну практику препаратів частково або повністю втрачають свою ефективність, що призводить до ускладнень інфекційних процесів та смертності, значно збільшує матеріальні витрати на лікування пацієнтів [1–3]. Розвиток антибіотикорезистентності, серед інших причин, забезпечується здатністю мікроорганізмів формувати біоплівки, адже відомо, що бактерії у їх складі стійкі до АМП у 10 – 1000 разів більше, ніж їхні відповідні планктонні клітини [4, 5]. Формування біоплівок мікроорганізмами на сьогодні становить серйозну проблему у клінічній практиці та є одним з важливих причин неефективності лікування інфекційних захворювань. Згідно з даними Центрів з контролю та профілактики захворювань у США (Centers for Disease Control and Prevention) 65 % інфекційних захворювань асоційовані з біоплівками, згідно з Національним інститутом охорони здоров'я США (National Institutes of Health) їх кількість сягає 80 %. Біоплівки являють собою організовані мікробні угруповання, бактеріальні клітини яких прикріплені до абіотичної чи біотичної поверхні, оточені біополімерним матриксом та забезпечують виживання бактерій за

несприятливих умов середовища, включаючи вплив антимікробних засобів [6–8].

Особливості структури, хімічного складу матриксу бактеріальних біоплівки призводять до стійкості мікроорганізмів до дії АМП та неефективності антимікробної терапії у пацієнтів з інфекційними захворюваннями, пов'язаними з біоплівками. Зокрема антибіотикорезистентність бактерій у складі біоплівки обумовлена гетерогенністю бактеріальних клітин у мікробних спільнотах, швидким поширенням генів резистентності до АМП серед клітин, наявністю позаклітинного матриксу та низькою проникністю препаратів всередину біоплівки. Саме це зумовлює необхідність зміни стратегії антимікробної терапії та пошуку нових мішеней дії АМП: від пригнічення метаболічних процесів, що призводять до загибелі бактеріальних клітин, до порушення різних етапів плівкоутворення, впливу на фактори та механізми, які беруть участь у формуванні мікробних спільнот [9].

На увагу заслуговують нові групи хімічних речовин серед адамантанвісних сполук, оскільки вони широко застосовуються в клінічній практиці та характеризуються високою біологічною активністю. Зокрема серед цієї групи речовин досліджено багато сполук, які виявляють антимікробні властивості щодо грампозитивних і грамнегативних бактерій [10, 11]. Також нещодавніми дослідженнями у сполук, що містять адамантільний радикал, виявлено антибіоплівкову активність та встановлена їх здатність підвищувати чутливість бактеріальних клітин до АМП [12].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота є фрагментом планових науково-дослідних робіт лабораторії фармакології протимікробних засобів відділу фармакології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» «Механізми антибіоплівкової активності похідних адамантану» (№ державної реєстрації 0118U001559) та «Вивчення особливостей формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* та *Quorum Sensing* регуляції за дії похідних адамантану» (№ державної реєстрації 0121U109291).

Мета дослідження. Експериментально обґрунтувати доцільність розробки нових засобів профілактики та лікування біоплівкових інфекцій на підставі дослідження фармакодинаміки похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Встановити здатність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу запобігати формуванню біоплівок, впливати на специфічні та неспецифічні фактори адгезії мікроорганізмів (здатність до міграції, гідрофобність клітин).
2. Дослідити життєздатність бактеріальних клітин на етапі плівкоутворення та формування клітин-персистерів за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу.
3. Оцінити антиадгезивну активність адамантанвмісних сполук у дослідженнях *in vivo* (на моделі хірургічної шкірної рани) та на засобах медичного застосування (сітки для відновлювальної хірургії).
4. Встановити здатність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу руйнувати біоплівки, сформовані грампозитивними (*S. aureus*), грамнегативними (*E. coli*, *P. aeruginosa*) бактеріями та впливати на життєздатність бактеріальних клітин у їх складі.
5. Дослідити вплив адамантанвмісних сполук на компоненти матриксу біоплівок (загальний білок та полісахариди, Pel-полісахарид, целюлоза, Вар-білок) та їх здатність проникати всередину мікробних угруповань.
6. Встановити зміни експресії генів, що беруть участь у формуванні біоплівок *S. aureus*, *E. coli* та *P. aeruginosa* за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу.
7. Дослідити антивірулентні властивості похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу (за визначенням лактонвмісних сполук, піоціаніну, гемолітичної та протеазної активності, експресії генів, що регулюють продукцію факторів вірулентності, функціонування Quorum sensing та ефлюксних pomp).

Об'єкт дослідження – фармакологічна корекція інфекційно-запальних процесів бактеріального генезу за застосування адамантанвмісних сполук.

Предмет дослідження – антибіоплівкові властивості похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу.

Методи дослідження. Мікробіологічні, фармакологічні, біохімічні, фізико-хімічні, мікроскопічні, молекулярні, статистичні.

Експерименти з використанням тварин проводились відповідно до правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (протокол № 01/12/23 від 26 грудня 2023 р.).

Наукова новизна досліджень. Уперше експериментально комплексно оцінено механізм антибіоплівкової дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій. Поглиблено наукові уявлення про антимікробну активність адамантанвмісних сполук, зокрема їх вплив на плівкоутворення та сформовані біоплівки грампозитивними та грамнегативними мікроорганізмами.

Уперше встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу – (4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил) бензол (АМ-166) та 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-(N-бензил, N-диметиламіно)-2-пропанолу хлорид (КВМ-97) впливають на неспецифічні та специфічні фактори адгезії, порушують формування біоплівки. На моделі хірургічної шкірної рани у щурів, інфікованої мікст-збудниками (*S. aureus* + *P. aeruginosa* + *C. albicans*), сполука КВМ-97 виявляє антиадгезивні властивості у лікувально-профілактичному та лікувальному режимі, забезпечуючи зниження мікробної контамінації на поверхні та у глибині рани.

Уперше молекулярно-генетичними методами доведено, що порушення плівкоутворення пов'язано зі зміною транскрипційної активності генів, що регулюють синтез білків-адгезинів (*clfB*, *fib*, *fnbB*, *ebpS*, *eno*) та генів *icaADBC*-оперону, відповідальних за плівкоутворення, міжклітинну адгезію, синтез компонентів матриксу у *S. aureus*, генів *fliC*, *motB*, *fimA*, що забезпечують рухливість, адгезію до субстрату клітин *E. coli*. Встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу змінюють експресію генів, що регулюють синтез

полісахаридних компонентів матриксу біоплівки (*pelA*, *pslA*, *algD*, *algL*, *algR*, *algU*, *mucA*) у *P. aeruginosa*.

Уперше встановлено, що сполуки з адамантильним радикалом впливають на QS-залежні процеси, відповідальні за формування біоплівок та синтез факторів вірулентності у *P. aeruginosa*, експресія генів *lasI*, *lasR* Las-системи, *rhlR* Rhl-системи та *pqsR* Pqs-системи у *P. aeruginosa* змінюється. Встановлено, що сполуки АМ-166 та KBM-97 пригнічують продукцію алкалін металопротеїнази, екзоферменту S, екзотоксину А (зменшення експресії генів *aprA*, *exoS*, *exoA*), впливають на продукцію піоціаніну та гемолізинів.

Доповнено наукові дані про здатність адамантавмісних сполук порушувати енергетичні процеси в клітинах бактерій, зокрема їх здатність впливати на експресію генів *appB*, *appX* (синтез субодиниці цитохрому bd-II дихального ланцюга) і *malP*, *malZ* (катаболізм глікогену) та пригнічувати активність ефлюксних pomp. Встановлено, що порушення активності RND pomp реалізується змінами транскрипційної активності генів *mexB*, *mexY*, *oprM*, *mexR*.

Практичне значення одержаних результатів. Експериментально обґрунтовано перспективність та доцільність розробки нових антимікробних препаратів з антибіоплівковою активністю на основі похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу, що підтверджено нововведенням (КПКВ-6561040 «Похідне адамантану 4-(1'-адамантил)-фенокси-3-(N-бензилдиметиламіно)-2-пропанолу хлорид для профілактики інфікування ран та формування біоплівок», Інформаційний Бюлетень НАМН України, вип. 51, 2021 р.). Впровадження в медичну практику ефективного та безпечного засобу на основі KBM-97 чи АМ-166 підвищить ефективність лікування пацієнтів з інфекційними процесами бактеріального генезу, зокрема спричинених біоплівками. Отримані в експериментах результати щодо механізму антибіоплівкової дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу дадуть можливість раціонально застосовувати антимікробні препарати, створені на їх основі.

Окремі результати дисертаційної роботи впроваджено в науково-педагогічний процес кафедр фармакології Національного фармацевтичного

університету (протокол № 5 від 07.11.2023 р.); Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського (протокол № 12 від 31.10.2023 р.), Дніпровського державного медичного університету (протокол № 4 від 10.11.2023 р.), Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (протокол № 13 від 20.11.2023 р.), Запорізького державного медико-фармацевтичного університету (протокол № 4 від 10.11.2023 р.).

Особистий внесок здобувача. Автор самостійно провів інформаційний пошук, проаналізував наукову літературу за темою дисертації, спільно з науковим керівником визначив мету й завдання дослідження, самостійно виконав експериментальну частину роботи, статистичну обробку отриманих результатів, їх оформлення у вигляді таблиць та рисунків, сформулював висновки, підготував до публікації статті, у яких відображені основні результати дисертаційної роботи, та текст дисертації.

Молекулярні дослідження щодо вивчення впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на експресію генів, що відповідають за плівкоутворення, адгезію, продукцію екзополісахаридів, функціонування систем Quorum Sensing, вірулентність та резистентність бактерій проведені на базі Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України за методичної та консультативної допомоги к. б. н. Л. Б. Зеленої, та на базі Української лабораторії якості та безпеки продукції агропромислового комплексу при Національному університеті біоресурсів і природокористування України при допомозі к. вет. н. Л. М. Іщенко; секвенування гена *tusA* у *P. aeruginosa* для виявлення можливих мутацій проводили в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України за методичної та консультативної допомоги к. б. н. О. В. Анопрієнко, за що автор роботи їм щиро вдячна.

У роботах, опублікованих у співавторстві, дисертанту належать фактичний матеріал й основний творчий доробок: представлені результати власних досліджень, участь у аналізі літературних джерел, отриманих результатів та їх обговоренні, підготовці тексту статті до публікації.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на Буковинському міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих учених, ВІМСО – 2018 (Чернівці, 2018), 4th International conference of cell biology (Краків, 2018), Науковій конференції присвяченій 100-річчю кафедри мікробіології, вірусології та імунології «Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології» (Київ, 2019), IV Міжнародній науково-практичній конференції «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (Харків, 2020), Дистанційній науково-практичній конференції «Мікробіологія, вірусологія та імунологія в сучасній клінічній і лабораторній медицині» (Харків, 2020), Науково-практичній конференції «Другий національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 175-річчю з дня народження І. І. Мечникова» (Харків, 2020), Віртуальному Міжнародному симпозіумі зі зменшення біологічної загрози 2021 р. (IBTRS 2021), III Scientific and practical Conference of young researchers “Youth and modern problems of microbiology and virology” (Київ, 2021), II науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології (Пам’яті професора В.В. Дунаєва)» (Запоріжжя, 2022), IV Scientific and practical Conference of young researchers “Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology” (Київ, 2022), III науково-практичній міжнародній дистанційній конференції «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині» (Харків, 2023), Міжнародній науково-практичній конференції «Продовольча та екологічна безпека в умовах війни та повоєнної відбудови: виклики для України і світу» (Київ, 2023), Міжнародній науково-практичній конференції «Експериментальна та клінічна фармакологія», присвячена 100-річчю кафедри фармакології НФаУ (Харків, 2024).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано у 23 роботах, з них: 8 статей у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України, 5 статей у виданнях, що включені до наукометричної бази Scopus, 2 статті у періодичних

наукових виданнях інших держав, 13 тез доповідей у матеріалах конгресів та конференцій, у тому числі з міжнародною участю, 1 нововведення в Інформаційному бюлетні НАМН України.

Обсяг і структура дисертації. Матеріали дисертаційної роботи викладено на 250 сторінках друкованого тексту, що включають такі розділи: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали та методи дослідження, 4 розділи результатів власних досліджень, узагальнення результатів дослідження, висновки, список використаних джерел, додатки. Обсяг основного тексту дисертації складає 167 сторінок. Список використаних джерел містить 351 найменування: 18 кирилицею й 333 латиницею. Дисертаційну роботу ілюстровано 49 рисунками та 9 таблицями.

РОЗДІЛ 1

БІОПЛІВКИ ТА ХРОНІЧНІ ІНФЕКЦІЇ. ПРОБЛЕМИ АНТИМІКРОБНОЇ ХІМІОТЕРАПІЇ ПРИ БІОПЛІВКОВИХ ІНФЕКЦІЯХ ТА ШЛЯХИ ЇХ ВИРІШЕННЯ (Огляд літератури)

1.1 Роль біоплівок у розвитку хронічних інфекцій

Біоплівки – це мікробні спільноти, які мають складну соціальну структуру, складаються з одного чи декількох видів мікроорганізмів, прикріплених до субстрату та вкритих біополімерним матриксом. Такі поверхнево-асоційовані бактерії спостерігали ще Антоні ван Левенгук (1632 – 1723 рр.) та Луї Пастер (1822 – 1895 рр.), а їх значення в екології при біообростанні суден було описано 80 – 90 р. тому. Проте значення біоплівок у медицині та розвиток біоплівкових інфекцій вперше описано на початку 1970-х років при дослідженні агрегатів бактерій *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) у мокротинні та тканині легень пацієнтів з муковісцидозом (МВ) [13]. Термін «біоплівка» вперше запропонував Костертон та ін. у 1978 р. [14], досліджуючи мікробні угруповання, оточені позаклітинним біополімерним матриксом. Значення біоплівок було визнано Американським товариством мікробіології (American Society for Microbiology (ASM)) в 1993 р., а більш детально їх було охарактеризовано Костертоном та ін. у 1999 р. Відтоді кількість наукових робіт про біоплівки, методи їх вивчення, механізми формування та поширення у медичній практиці почала стрімко зростати. Нині роль біоплівок у розвитку хронічних персистуючих інфекційних захворювань є загальноновизнана. За даними Центрів з контролю та профілактики захворювань у США (Centers for Disease Control and Prevention) та Національного інституту охорони здоров'я США (National Institutes of Health) біоплівкові форми мікроорганізмів спричиняють близько 65 % захворювань мікробного генезу та 80 % усіх хронічних інфекцій [15, 16].

Біоплівки здатні колонізувати різні тканини людського організму, медичні пристрої та є резервуаром для розвитку нових або рецидивуючих інфекційних захворювань. Тому біоплівкові інфекції поділяють на такі, при яких біоплівки формуються на біотичному субстраті (тканини організму людини, шкіра, слизові оболонки), та такі, при яких вони прикріплені до абіотичної поверхні [17–19]. Перша група включає пацієнтів з муковісцидозом [20, 21], хронічними рановими інфекціями [22], ендокардитом [23, 24], середнім отитом [25, 26], хронічним риносинуситом [27, 28], остеомієлітом [29], інфекціями сечовивідних шляхів [30, 31], хронічним простатитом [32], при яких біоплівки виявляють в тканинах та у мокротинні. Друга група включає інфекції, пов'язані з біоплівками, що колонізують ортопедичні імплантати [33, 34], ендотрахеальні трубки [35], внутрішньовенні, сечові катетери [36–38], контактні лінзи [39], протези клапанів серця [40, 41] тощо.

Особливо небезпечними збудниками інфекційних захворювань, які характеризуються високою здатністю до формування біоплівок, патогенністю та стійкістю до широкого спектра АМП є мікроорганізми групи ESKAPE – *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp [42].

У пацієнтів з МВ виявляють штами *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*) та *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*) [43–46]. Біоплівки, сформовані *P. aeruginosa* у легенях, характеризуються великою кількістю позаклітинного альгінату та еДНК, що захищають мікроорганізми від впливу імунної системи та АМП [45]. Мукоїдні штами здатні легко колонізувати слизові оболонки легень, формуючи біоплівки, що є основною причиною розвитку інфекційних захворювань у пацієнтів з муковісцидозом та смертності [44]. Серед >60 000 пацієнтів майже у 80 % розвивається хронічна біоплівкова інфекція легень [47]. У хворих з хронічними рановими інфекціями біоплівки виявляють у 60 % випадків [48, 49]. Вони часто є полімікробними та сформовані штамами *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*

(*S. epidermidis*), *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterobacter* spp., *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) та *K. pneumoniae*. У 50 % пацієнтів з риносинуситом виявляють як одновидові, так і полімікробні біоплівки. Згідно з результатами конфокальної лазерної скануючої мікроскопії та полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) встановлено, що у 62 % пацієнтів хронічний ларингіт, обумовлений полімікробними біоплівками, до складу яких входять *S. aureus*, *Haemophilus influenzae* (*H. Influenzae*), *Candida albicans* (*C. albicans*), *Moraxella nonliquefaciens* (*M. nonliquefaciens*), *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) та *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) [44, 50]. Інфекції, пов'язані з використанням ендотрахеальних трубок (ЕТТ) часто спричинені біоплівками MRSA, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* і *A. baumannii* [44]. Серед збудників інфекцій сечовивідних шляхів (ІСШ) найчастіше виділяють уропатогенну *E. coli* (UPEC), *S. aureus*, *K. pneumoniae*, які у більшості характеризуються сильною здатністю до плівкоутворення [51, 52]. Частка нозокоміальних інфекцій, які пов'язані з застосуванням внутрішньовенних катетерів, складає від 50 % до 70 %. Найчастіше вони спричинені стійкими до АМП штамами бактерій (*Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp.) та грибів (*Candida* spp.). Більша частина виділених збудників здатна формувати біоплівки (від 59 % до 100 %) [53]. Серед пацієнтів з ортопедичними алопластичними пристроями у 2 %, у кардіохірургічних хворих з серцевими клапанами – у 4 % випадків відмічено їх інфікування та формування біоплівок, що призводить до розвитку хронічних захворювань та необхідності заміни медичних пристроїв [47, 54].

Лікування пацієнтів з хронічними захворюваннями, пов'язаними з біоплівками, на сьогодні є серйозною проблемою у клінічній практиці, адже мікроорганізми у складі біоплівок резистентні до дії АМП та ефektorів імунної системи, що дозволяє їм тривалий час знаходитися в організмі людини (при МВ біоплівки в дихальних шляхах зберігаються більше 30 років) [55]. Антибіотикорезистентність біоплівок зумовлена особливостями структури, процесу їх формування та функціонування.

Формування біоплівки – це багатоетапний та складний процес переходу бактерій від планктонної форми до нерухомого способу існування у вигляді мікробних спільнот, який забезпечується зміною рівнів експресії генів, а саме пригніченням тих, які пов’язані з рухливістю мікроорганізмів, та активацією генів, що регулюють адгезію, продукцію позаклітинного матриксу (EPS). Плівкоутворення включає наступні фази: адгезія бактеріальних клітин до абіотичної чи біотичної поверхні, синтез позаклітинного матриксу, проліферація клітин, утворення мікроколоній, структурування та дозрівання біоплівки, відшарування бактеріальних клітин з її складу для повторення циклу.

На початковому етапі адгезії мікроорганізмів важливу роль відіграють фізико-хімічні властивості поверхонь бактеріальних клітин та субстрату, зокрема електростатичні взаємодії, Ван-дер-Ваальсові сили, рівень гідрофобності, величина заряду. Гідрофобність бактеріальних клітин залежить від складу клітинної стінки (наявності поверхнево-асоційованих білків) та є важливим фізичним чинником, що визначає інтенсивність адгезії [56–58]. Незворотне прикріплення забезпечується специфічними для кожного виду бактерій поверхневими адгезинами та відбувається за допомогою диполь-дипольних, гідрофобних взаємодій, водневих, іонних та ковалентних зв'язків. У грамнегативних бактерій значну роль в адгезії відіграють ліпополісахариди – структурні компоненти клітинної стінки [56], у грампозитивних – тейхоеві кислоти [59–61]. Існує багато адгезинів, які розташовані на поверхні бактеріальних клітин та відіграють роль у формуванні біоплівки, зокрема у грамнегативних мікроорганізмів джгутики та пілі (фімбрії) забезпечують рухливість, прикріплення до субстрату та міжклітинну адгезію. Було виявлено, що волокна *curli*, антиген 43 (Ag43) та пілі 1 типу збільшують початкову адгезію *E. coli* [56, 62]. За допомогою пілей 1 типу бактерії зв'язуються з різними абіотичними субстратами та манозильованими рецепторами на поверхні епітеліальних клітин. Вони кодуються опероном *fimAICDFGH*, основна субодиниця яких є білок FimA (кодується геном *fimA*) та адгезин FimH (геном *fimH*). Активація пілей 1 типу та прикріплення бактерій до поверхні

пов'язана зі зменшенням кількості білків у зовнішній мембрані (OmpA, OmpX, Slp, TolC). Волокна *curli* – амілоїдні волокна, які складають до 85 % біомаси біоплівки *E. coli*, сприяють агрегації клітин, їх прикріпленню до абіотичних поверхонь. Вони кодуються 2 оперонами: *csgBAC*, який регулює продукцію структурних компонентів волокон, та *csgDEFG*, активація якого забезпечує експорт *curli* та синтез транскрипційного регуляторного білка CsgD [56, 62]. Прикріплення клітин *S. aureus* до тканин організму господаря забезпечується поверхневими білковими адгезинами MSCRAMMs (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules). До них відносять білки FnBPA та FnBPB, що зв'язують фібрoneктин, пластівцевоутворюючі фактори А (ClfA) та В (ClfB), білки SdrC, SdrD, SdrE, багаті серином та аспарагіноювою кислотою тощо [4, 60, 63, 64].

Після адгезії, бактеріальні клітини проліферують та формують мікроколонії. На цьому етапі у бактерій активується експресія багатьох генів, що беруть участь у синтезі компонентів позаклітинного матриксу та регуляції формування біоплівки. Матрикс біоплівки складається з полісахаридів, білків, еДНК, ліпідів та інших полімерних сполук, співвідношення яких відрізняються залежно від умов навколишнього середовища та виду бактерій [56, 57, 61]. Полісахариди в основному відіграють ключову роль у дозріванні та рості біоплівки. Після формування EPS утворюється тривимірна структура біоплівки, яка містить заповнені водою канали для транспортування поживних речовин та виведення продуктів життєдіяльності бактерій [57, 61]. Позаклітинний матрикс є фізичним бар'єром, що перешкоджає проникненню антимікробних засобів всередину біоплівки та досягненню ними ефективних концентрацій, забезпечуючи антибіотикорезистентність бактерій. Зниження проникності зумовлено взаємодією АМП зі структурними компонентами матриксу, утворенням неактивних комплексів або їх ферментативним розщепленням [58, 62].

Різні види мікроорганізмів характеризуються особливостями структурних компонентів матриксу біоплівки. Так, основним компонентом EPS у *S. aureus* є

полісахаридний міжклітинний адгезин (PIA), який синтезується на перших етапах розвитку біоплівки. Його продукція кодується локусом *ica*, який складається з регуляторного гена *icaR* і оперону *icaADBC*. PIA має катіонну природу та відіграє значну роль у колонізації тканин господаря, структуруванні біоплівки, розвитку біоплівкових інфекцій, ухиленні від впливу імунної системи людини, резистентності бактерій до АМП [65, 66]. Для біоплівок *E. coli* характерними є наявність 3 екзополісахаридів: β -1,6-N-ацетил-D-глюкозаміновий полімер (PGA), целюлоза та коланова кислота (КА). PGA – це позитивно заряджений лінійний гомоглікан, який забезпечує міжклітинну адгезію, прикріплення клітин до субстрату та стабільність мікробних угруповань. Полісахарид PGA кодується опероном *pgaABCD*, що контролює його синтез, транспортування та локалізацію. Регуляція біосинтезу PGA здійснюється за участі вторинного месенджера c-di-GMP, який відповідає за посттрансляційну активацію полісахариду. Целюлоза – лінійний полімер D-глюкози, з'єднаної β -(1,4) зв'язками, що формує фібрили. Її синтез кодується оперонами *yhjR-bcsQABZC* та *bcsEFG*, які синтезують комплекс з 9 білків бактеріальної целюлозної синтази (Bcs). Білок BcsA є основною субодиницею, що забезпечує полімеризацію глюкози та контролюється c-di-GMP. Коланова кислота – це розгалужений негативно заряджений полімер, що складається з глюкози, галактози, фукози та глюкуронової кислоти. КА кодується кластером з 19 генів *wca* та відіграє важливу роль у виживанні *E. coli* в навколишньому середовищі та сприяє формуванню зрілої структури біоплівки [56, 61, 62].

Матрикс біоплівок *P. aeruginosa* в основному складається з Psl-, Pel-полісахаридів та альгінату [61, 67–70]. Полісахарид Psl – пентамер, що містить d-маннозу, l-рамнозу та d-глюкозу, утворює тканиноподібний матрикс, який з'єднує клітини біоплівки. Внаслідок надмірної продукції Psl-полісахариду підсилюється міжклітинна адгезія *P. aeruginosa* та адгезія до субстрату, що є критичним для ініціювання та підтримки структури біоплівки. Полісахарид Pel, катіонний екзополісахарид, утворений 1,4-глікозамідними зв'язками аміноцукрів N-ацетилгалактозаміну та N-ацетилглюкозаміну, відіграє важливу

роль у структурі біоплівки, утворених штамами, які не містять Psl. Pel є продуктом експресії генів локусу *pelABCDEFGH* [69], разом з eДНК забезпечує стабільність біоплівки. Альгінат – високомолекулярний ацетильований полісахарид, що складається з уронових кислот (мануринової та гіалуронової кислот) [67, 71]. Синтез альгінату контролюється транскрипційною активністю оперона *algD* та регуляторного σ -фактора AlgT. Альгінат відіграє важливу роль у дозріванні та стабільності біоплівки, прикріпленні бактерій до муцину у дихальних шляхах, а його ацетильні групи збільшують в'язкість, що призводить до накопичення води та поживних речовин у біоплівці. Альгінат сприяє персистенції бактерій, розвитку інфекційних запальних процесів, захищає клітини *P. aeruginosa* від імунного захисту макроорганізму та дії АМП. Також досліджена його роль в неефективності антибіотикотерапії завдяки здатності зв'язувати аміноглікозидні АМП та перешкоджати їх проникненню всередину біоплівки [67].

Окрім наявності позаклітинного матриксу антибіотикорезистентність клітин у складі біоплівки забезпечується їх гетерогенністю. У зрілій біоплівці формуються різні градієнти бактеріальних клітин відповідно до метаболічної активності та толерантності до кисню. Це призводить до наявності у її складі анаеробних бактерій та метаболічно неактивних клітин – персистерів [58]. Відмінність у метаболічній активності обумовлена фізико-хімічними умовами росту бактерій, впливом інших мікроорганізмів (синергічні, антагоністичні чи конкурентні міжклітинні взаємодії), нерівномірним розподілом поживних речовин та кисню, що сприяє асинхронному росту клітин. Повільніший ріст бактерій призводить до повільнішого поглинання антимікробних засобів та зниження внутрішньоклітинних концентрацій АМП. Так, бактеріальні клітини, які характеризуються швидким ростом та метаболічною активністю, більш чутливі до дії АМП. А метаболічно інертні персистери є резистентними до дії високих доз препаратів та імунної системи організму людини. Після зменшення концентрації АМП персистери можуть відновлювати метаболізм, ріст та розмноження в біоплівці. Вони формуються за дії стресових факторів

навколишнього середовища та характеризуються зниженою метаболічною активністю, уповільненим ростом і реплікацією, нечутливістю до дії АМП, підвищеною активацією системи токсин-антитоксин, фосфатного обміну, антиоксидантної системи та системи репарації ДНК [58, 62, 72, 73].

Зріла біоплівка діє як резервуар генів стійкості до АМП (ARG, резистом), які забезпечують антибіотикорезистентність бактеріальним клітинам. Вони легко та швидко поширюються серед бактерій всередині мікробних угруповань шляхом кон'югації, трансформації та трансдукції, що призводить до значного зростання кількості полірезистентних мікроорганізмів, які здатні диспергувати з біоплівки та колонізувати нові субстрати [74].

Дисперсія клітин зі складу біоплівки відбувається на останньому етапі розвитку мікробних спільнот. Основними факторами, які впливають на дисперсію, є надмірне зростання популяції бактерій, міжклітинна конкуренція, нестача поживних речовин, активація ферментів, які призводять до розщеплення позаклітинного матриксу, зміни умов навколишнього середовища, дефіцит кисню, накопичення метаболітів, а також активація експресії генів, відповідальних за рухливість клітин та деградацію EPS, зниження транскрипційної активності генів, пов'язаних з синтезом екзополісахаридів [56]. Дисперсія біоплівки забезпечує вивільнення клітин з її складу, що призводить до загострення інфекційного процесу, поширення збудників та колонізації нових субстратів.

Процес плівкоутворення у бактерій регулюється взаємодією декількох позитивних та негативних регуляторних механізмів, включаючи системи Quorum Sensing (QS), регуляторні невеликі молекули РНК (sRNA), альтернативні сигма-фактори, двокомпонентні системи та вторинні месенджери (наприклад, c-di-GMP) [58, 75]. Саме вторинний месенджер c-di-GMP відповідає за перехід планктонних бактерій у форму біоплівки. Його кількість є низька у планктонних клітинах та збільшується під час формування біоплівки. Специфічними регуляторами плівкоутворення кишкової палички є двокомпонентні сигнальні системи CpxA/CpxR, EnvZ/OmpR та регулятор

RcsCDB. Ці регуляторні системи беруть участь у контролюванні синтезу/активації факторів адгезії та продукції компонентів матриксу біоплівки. У *P. aeruginosa* утворення полісахаридних компонентів біоплівки контролюється багатьма регуляторними шляхами [69, 75, 76]. Встановлено, що опосередкована AlgC регуляція метаболізму координує загальну кількість екзополісахаридів у *P. aeruginosa* шляхом контролю пулу попередників для їхнього синтезу. У регуляції експресії Pel і Psl беруть участь FleQ (пригнічує транскрипцію оперонів *pel* і *psl*), c-di-GMP, RpoS, системи Gac-Rsm, QS.

QS – це залежна від щільності бактеріальних клітин система комунікації, яка характерна як для грампозитивних, так і грамнегативних мікроорганізмів та забезпечує відповідь бактерій на умови навколишнього середовища [77–79]. Сигнальні системи QS включають два обов'язкові компоненти: низькомолекулярний регулятор (ауоіндуктор – AI), який легко дифундує через клітинну мембрану, та рецепторний регуляторний білок, з яким зв'язується AI. У разі досягнення певної щільності популяції AI накопичуються до необхідного порогового значення та взаємодіють із відповідними рецепторами з утворенням комплексу «AI-рецепторний білок», який зв'язується з промоторними ділянками генів-мішеней та викликає різку індукцію їх експресії. Зокрема QS бере участь в активації генів, відповідальних за синтез компонентів матриксу біоплівок (екзополісахаридів, альгінату, ДНК) та факторів вірулентності (екзотоксинів, екзоферментів, піоціаніну, протеаз, еластази). Грамнегативні бактерії як сигнальні молекули використовують ацилгомосеринлактони, тоді як грампозитивні бактерії – олігопептиди. Останні вважаються універсальними AI, оскільки вони характерні для різних видів бактерій. Завдяки функціонуванню QS, мікроорганізми здійснюють внутрішньовидову, міжвидову комунікацію, взаємодіють з вищими еукаріотами, забезпечують виживаність за несприятливих умов, зокрема, впливу агресивних речовин – АМП та дезінфектантів [77–79].

Найбільш вивченими є системи QS у *P. aeruginosa*, що регулюють патогенність та плівкоутворення бактерій. У синьогнійної палички виділяють 4

системи – LasI/LasR, RhlI/RhlR, PQS та IQS, які ієрархічно взаємопов'язані [80, 81]. Система Las позитивно регулює функціонування трьох інших систем, IQS активує систему PQS, остання впливає на Rhl-систему. Rhl-система негативно регулює PQS. Сигнальними молекулами (аутоіндукторами) у Las і Rhl системах є два ацилгомосеринових лактони (АГЛ) – 3-оксо-додеканоїл-L-гомосерин лактон (3-охо- C_{12} -HSL) і *N*-бутаноїл-L-гомосерин лактон (C_4 -HSL), тоді як PQS-система використовує алкіл-4(1H)-хінолони (AQ), які включають дві молекули – 2-гептил-гідроксид-1H-хінолін-4-он (PQS) і його попередник 2-гептил-4(1H)-хінолон (HHQ). Інтегрована система QS (IQS) як AI використовує 2-(2-гідроксифеніл)-тіазол-4-карбальдегід [80, 81].

Системи QS *P. aeruginosa* відіграють ключову роль на різних етапах розвитку інфекційного процесу та плівкоутворення, включаючи адгезію, колонізацію тканин організму людини, інвазію, а також в ухиленні збудника від впливу імунної системи та резистентності до антимікробних засобів. Адгезія мікроорганізмів до тканин, їх колонізація та поширення бактерій по організму забезпечуються джгутиками (*swimming*-міграція) та пілями IV типу (*twitching*-міграція). Завдяки пілям і джгутикам *P. aeruginosa* переміщується у в'язкому середовищі (*swarming*-міграція) та колонізує легені пацієнтів із муковісцидозом [82, 83].

На етапах інвазії, розвитку запального процесу та при ухиленні збудника від впливу імунної системи важливу роль відіграють численні фактори вірулентності. У Las-системі QS синтаза LasI активує рецептор LasR, який є регулятором експресії генів, асоційованих із формуванням біоплівки, продукцією LasA-протеази, LasB-еластази, Apr-алкалін протеази, гемолізинів та екзотоксину A. Подібним чином система Rhl через синтазу RhlI активує рецептор RhlR і продукцію LasB-еластази, піоціаніну, рамноліпідів, ціаніду водню (HCN), сидерофорів, а також регулює рухливість мікроорганізмів. Система PQS модулює експресію генів, що беруть участь у плівкоутворенні, рухливості, HCN, лектинів, рамноліпідів, піохеліну та піовердину. Також PQS забезпечує уникнення збудника від імунного захисту макроорганізму та індукуює

лізис нейтрофілів і макрофагів [81, 84, 85]. Продукція клітинами *P. aeruginosa* протеаз (еластази, лужної протеази), феназинів (піоціаніну), токсинів (екзотоксину А), рамноліпідів та ціаністого водню призводить до деструкції клітин/тканин хазяїна через порушення проникного бар'єра та пригнічення синтезу білка.

Враховуючи роль біоплівок та патогенності бактерій у поширенні антибіотикорезистентності перспективним шляхом вирішення проблеми є дослідження механізмів антибіоплівкової активності нових та вже впроваджених у клінічну практику препаратів. Застосування антибіоплівкових засобів зможе підвищити ефективність антибіотикотерапії при лікуванні пацієнтів з інфекціями, пов'язаними з біоплівками, захистити здоров'я населення, зменшити поширення антибіотикорезистентних штамів бактерій та негативний вплив мікробних угруповань на навколишнє середовище. Цей підхід узгоджується з концепцією «Єдине здоров'я», яка підкреслює взаємозв'язок здоров'я людини, тварин та навколишнього середовища, і ефективність інтегрованих стратегій вирішення проблем громадського здоров'я [86].

1.2 Антимікробна хіміотерапія біоплівкових інфекцій: стан та перспективи

Серйозною проблемою у клінічній практиці залишається лікування пацієнтів з хронічними інфекціями, спричиненими мікроорганізмами у складі біоплівки. Зростання частоти та важкості перебігу інфекцій, пов'язаних з біоплівками, відсутність ефективних методів лікування, збільшення рівня смертності актуалізує пошук таргетних молекул, здатних порушувати різні ланки процесу плівкоутворення. Мікроорганізми у складі біоплівки виживають за дії АМП у 10 – 1000 разів вищих дозах, ніж їхні мінімальні інгібуючі концентрації щодо планктонних клітин [4, 5]. Мікроорганізми мають численні механізми протидії АМП. Крім відомих механізмів стійкості (модифікація структури мішені, інактивація антибіотика ферментами, гіперактивність

ефлюкських pomp, зниження проникності клітинної мембрани) біоплівці притаманні специфічні механізми захисту, зокрема: наявність позаклітинного матриксу, що перешкоджає проникненню АМП всередину мікробних угруповань, різні темпи росту та метаболічної активності клітин, горизонтальний перенос генів резистентності, посилений мутагенез, функціонування систем QS [58]. Саме це зумовлює необхідність зміни стратегії антимікробної терапії та пошуку нових мішеней дії АМП: від пригнічення метаболічних процесів, що призводить до загибелі бактеріальних клітин, до порушення різних етапів плівкоутворення, впливу на фактори та механізми, які беруть участь у формуванні мікробних спільнот та їх стійкості до АМП.

У клінічній практиці протоколи антибіотикотерапії розроблені для лікування гострих інфекцій, спричинених планктонними клітинами, які неефективні щодо біоплівки. На сьогодні є запропоновані нові підходи та стратегії для підвищення ефективності антимікробної терапії при біоплівкових інфекціях [47, 58, 87–89], які включають:

- дослідження антибіоплівкової активності впроваджених АМП та не-АМП, що застосовуються у медичній практиці для лікування пацієнтів з різними патологіями, на різних етапах плівкоутворення;
- застосування сполук, здатних руйнування позаклітинний матрикс (хелатори металів, ферменти);
- пошук та дослідження сполук з антивірулентними властивостями (наприклад, інгібіторів QS);
- застосування комбінованої антибіотикотерапії, включаючи комбінації різних груп АМП; антимікробних засобів з не-АМП, сполуками чи речовинами, які виявляють антивірулентні властивості, здатність порушувати структуру позаклітинного матриксу;
- комбінації антимікробних препаратів з ультразвуком або УФ-світлом;
- вакцинація відповідними біоплівкоутворюючими бактеріями для запобігання розвитку інфекцій (наприклад, використання вакцини *P. aeruginosa* у пацієнтів з муковісцидозом);

- модифікація поверхонь медичних пристроїв;
- застосування бактеріофагів, нанотехнологій, антимікробних пептидів, моноклональних антитіл;
- пошук сполук серед природних речовин (феноли, поліацетилени, терпеноїди, алкалоїди, лектини поліпептиди), різних хімічних класів, здатних запобігати плівкоутворенню та руйнувати сформовані біоплівки бактерій, і розробка на їх основі ефективних антимікробних препаратів.

Клінічні випробування. На сьогодні у клінічних випробуваннях на різних фазах досліджується ефективність різних методів лікування пацієнтів з інфекціями, пов'язаними з біоплівками. Зокрема вивчається ефективність та безпека моноклонального антитіла TRL1068 (1 та 2 фаза), комбінації ванкоміцину та тобраміцину (2 фаза) у пацієнтів з хронічними біоплівковими інфекціями після ендопротезування колінного чи кульшового суглобів [90–92], оцінюється ефективність та безпека Пронтосану [93], 2 % розчину оцтової кислоти (3 фаза) [94], препарату SoftOx (SBE) (1 фаза) [95], антимікробної пов'язки Procellera® [96] у пацієнтів з хронічними ранами, травмами та шкірними виразками. У клінічному випробуванні 2 фази досліджується здатність низьких доз оксиду азоту знижувати толерантність до АМП при муковісцидозі [97].

Активність АМП та не-АМП відносно біоплівок бактерій. Розробка нових антимікробних препаратів трудомісткий, економічно затратний та тривалий процес, тому альтернативою може бути дослідження антибіоплівкової активності впроваджених в клінічну практику препаратів та їх перепрофілювання для лікування інфекційних захворювань на основі даних доклінічних та клінічних випробувань, а також їх токсикологічних, фармакокінетичних та фармакодинамічних даних [87]. Наприклад, протиревматичний засіб ауранофін виявляє виразну антибіоплівкову активність щодо *S. aureus*, *P. aeruginosa* [98, 99], здатен запобігати плівкоутворенню *S. aureus* та *C. albicans* за умови його нанесення на поверхню венозного катетера [100]. Вплив на біоплівки *P. aeruginosa* пов'язаний з пригніченням QS,

пілей IV типу та регулятора вірулентності Vfr. Також відмічено ефективне руйнування біоплівки синьогнійної палички при комбінованому застосуванні ауранофіну та колістину [99]. Антигістамінні препарати терфенадин та ебастин виявляють антимікробну активність та пригнічують плівкоутворення *S. aureus*, механізм дії останнього пов'язаний з мембранотропними властивостями та індукцією утворення активних форм кисню (АФК) [87, 101]. Антибіоплівкову активність щодо *S. aureus*, включно з MRSA, виявляють нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) (напроксен натрію, ацетилсаліцилова кислота, піроксикам та диклофенак натрію) та АМП рифампіцин, азитроміцин, кліндаміцин та ванкоміцин [87]. Відмічено вплив НПЗЗ на антимікробну та антибіоплівкову активність АМП щодо *S. aureus*, *P. aeruginosa* з різною антибіотикочутливістю, та здатність ацетилсаліцилової кислоти та ібупрофену пригнічувати експресію генів плівкоутворення *icaA* та *algD* [102]. Протипухлинні засоби мітоміцин С та цисплатин здатні руйнувати біоплівки, сформовані *S. aureus* та *P. aeruginosa*. Мітоміцин С також виявляє виразний інгібувальний ефект щодо метаболічно неактивних клітин-персистерів *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* [87, 103, 104]. Протипухлинний препарат з групи антиметаболітів 5-фторурацил виявляє антибіоплівкову дію відносно *S. aureus* (MRSA), *P. aeruginosa*, здатен пригнічувати синтез факторів вірулентності, функціонування системи QS, та у комбінації з гентаміцином проявляє синергетичний ефект [105–107]. Запобігати плівкоутворенню бактерій шляхом пригнічення життєздатності клітин та системи QS здатний імуномодулятор фінголімод (FTY720), що застосовується при розсіяному склерозі [54].

Хелатори металів. Катіони металів (Mg^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}) відіграють ключову роль у підтримці цілісності структури матриксу бактеріальних біоплівок, сприяють внутрішньоклітинній адгезії та агрегації через їхню взаємодію з тейхоєвими кислотами клітинної стінки грампозитивних бактерій та ліпополісахаридів грамнегативних мікроорганізмів [108–110]. Наприклад, хелатор металів тетранатрій-ЕДТА здатен пригнічувати плівкоутворення,

руйнувати сформовані біоплівки бактерій та посилювати антимікробну активність препаратів [87, 111]. Ефективність комбінації гентаміцин-ЕДТА досліджується у клінічному випробуванні в пацієнтів з катетер-асоційованими інфекціями, спричиненими біоплівками [112]. Показано, що хелатуючі агенти Fe^{3+} коєва кислота та мальтол виявляють антибіоплівкову активність щодо *S. aureus* та *P. aeruginosa* окремо та у комбінації з АМП (тобраміцину та ципрофлоксацину), здатні порушували цілісність мембран бактерій у попередньо сформованих біоплівках *S. aureus*, пригнічувати продукцію факторів вірулентності (протеаз, ліпаз) та збільшувати утворення АФК [108].

Ферменти. Ферменти (гідролази, нуклеази, протеази) здатні руйнувати біоплівки шляхом розщеплення основних структурних компонентів матриксу біоплівок (полісахариди, нуклеїнові кислоти, білки) або порушення функціонування системи QS [58, 87]. Вони використовуються в поєднанні з іншими антимікробними засобами для підвищення їхньої ефективності. Адже ферментативна активність спрямована на руйнування позаклітинного матриксу та вивільнення бактерій зі складу біоплівки, без впливу на їх життєздатність. Прикладами ферментів є дисперсин В, альгінатліаза, лізостафін, трипсин, α -амілаза, лактонази.

Інгібітори QS. Однією з найбільш вивчених груп альтернативної антибіотикотерапії, яка може застосовуватися для подолання проблеми толерантності та резистентності бактерій до АМП, є інгібітори системи QS (QSI). До них належать природні (флавоноїди, індол-3-оцтова кислота, нарингенін) та синтетичні (тіофеноли, 3-ацилпірол, лактоназа, модифікована ацилаза PvdQ) речовини. Вплив на функціонування систем QS може бути зумовлений пригніченням синтезу AI, рецепторів AI або порушення їх взаємодії [58]. Застосування сполук, які впливають на функціонування аутоіндукторів за рахунок зменшення активності або деградації їх молекул, може стати новою стратегією для запобігання формування біоплівки мікроорганізмами [113]. Зокрема, ферменти АГЛ-лактонази гідролізують складно ефірний зв'язок гомосеринлактонового кільця, інактивуючи сигнальну

молекулу, АГЛ-ацилази інактивують сигнали АГЛ за рахунок розщеплення амідного зв'язку. Порушення QS знижує вірулентність мікроорганізмів та не призводить до розвитку резистентності. Застосування інгібіторів QS у комбінації з АМП може бути ефективним для лікування пацієнтів з рецидивуючими бактеріальними інфекціями, спричиненими полірезистентними штамми бактерій, здатних формувати біоплівки.

Бактеріофаги. Бактеріофаги – це віруси, які високоспецифічні до певних штамів бактерій та є перспективними для лікування пацієнтів з бактеріальними інфекціями, зокрема спричиненими біоплівками. Бактеріофаги виявляють виразну антибіоплівкову дію, оскільки здатні легко проникати всередину біоплівки, руйнувати клітинну стінку бактерій, спричиняти лізис бактеріальних клітин. Застосування комбінацій різних бактеріофагів, фагів з АМП посилює ерадикацію бактерій, руйнування біоплівки та зменшує розвиток резистентності. Ферменти, отримані з фагів, такі як деполімерази та лізини, здатні руйнувати матрикс біоплівки та посилювати дію АМП [58, 87, 114, 115].

Антимікробні пептиди. Антимікробні пептиди характеризуються широким спектром антибіоплівкової активності та низькою частотою виникнення бактеріальної резистентності. Механізм їх дії щодо планктонних клітин здебільшого пов'язаний з порушенням цілісності цитоплазматичної мембрани бактерій, щодо біоплівок – з впливом на адгезію, рухливість, систему QS, структурні компоненти матриксу (наприклад, еДНК, альгінат у *P. aeruginosa*, PIA/PNAG у *S. aureus*), з модуляцією імунної відповіді макроорганізму щодо формування біоплівок. Антимікробні пептиди також можуть посилювати активність інших АМП. Їх ефективність підтверджена у доклінічних та клінічних випробуваннях. Прикладами антимікробних пептидів, здатних впливати на біоплівки бактерій *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, є LL-37, пептид S4 (1–16), DRGN-1, ATRA1A, MH5C, MH5C-Cys, CONJX7 [116, 117].

Адамантанвмісні сполуки. Серед різних хімічних груп речовин перспективними сполуками з антимікробними та антибіоплівковими властивостями є адамантанвмісні похідні [118–127].

Адамантан – це найменша органічна хімічна сполука з класу діамантоїдів, що належить до поліциклічних вуглеводнів та була виділена у 1933 р. Вона характеризується унікальними фізико-хімічними властивостями, структурою, широко застосовується для розробки нових лікарських засобів або модифікації впроваджених в клінічну практику препаратів. Адамантан складається з міцного вуглецевого каркасу, що зумовлює високу ліпофільність молекули та проникність через біологічні мембрани. Так, введення адамантану або його похідних до нових сполук чи лікарських засобів призводить до збільшення їх біодоступності та терапевтичного ефекту [128, 129]. Похідні адамантану виявляють широкий спектр біологічної активності: протівірусну [130–133], протидіабетичну [10, 133–135], антимікробну [118–123], протималярійну [136–138], протипухлинну [122, 139–142] активність та протизапальні властивості [143]. На основі адамантану є багато препаратів, затверджених для застосування у клінічній практиці. Препарати амантадин, римантадин та тромантадин є прикладами амінних похідних адамантану з протівірусною активністю. Тромантадин також застосовується для лікування шкірної інфекції, спричиненої вірусом простого герпесу. Лікарські засоби вілдагліптин або саксагліптин [118], що мають адамантильний фрагмент, проявляють протидіабетичну активність і використовуються для лікування пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу, препарат адапален з протизапальною активністю застосовується у пацієнтів з акне [118, 143].

Через значне зростання антибіотикорезистентності та неефективності антимікробної терапії у пацієнтів з інфекційними захворюваннями, особливо тими, що спричинені біоплівковими формами мікроорганізмів, в останні роки дослідники звернули увагу на антимікробні властивості сполук, що містять адамантильний радикал [118–123, 138, 142].

Адамантанвмісні сполуки виявляють антимікробну активність щодо штамів MRSA, *P. acnes*, *E. faecalis* та *C. albicans* [12, 144–147]. Похідне адамантану CD437 з протипухлинною активністю характеризується бактерицидною дією щодо планктонних клітин *E. faecalis* та MRSA, демонструє здатність порушувати плівкоутворення, впливає на клітини-персистери. За дії сполуки відмічено зменшення продукції позаклітинного матриксу у біоплівках, сформованих *P. aeruginosa* та відмічено здатність підвищувати чутливість тест-штамів до АМП [12, 145]. Адамантанвмісні сполуки SQ109 (похідне етилендіаміну) та SQ609 (похідне дипіперидину) виявляють виразну активність щодо штамів *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) з різною чутливістю до АМП та знаходяться на стадії клінічних випробувань для розробки нових ефективних лікарських препаратів на їх основі [148, 149].

Показано [119], що сполука на основі рутенію (Ru) з адамантільним радикалом Ru1 виявляє антимікробну, антибіоплівкову та антивірулентну активність щодо *S. aureus*. Механізм її дії пов'язаний зі здатністю збільшувати проникність мембран бактеріальних клітин та сприяти утворенню АФК у бактерій. Встановлено, що Ru1 пригнічує утворення біоплівки, секрецію екзотоксинів та підвищує ефективність АМП. Сполука Ru1 характеризується низькою токсичністю *in vivo* та виявляє ефективність у двох моделях інфекційного процесу у тварин. Доведено, що до її впливу формується низька частота резистентності.

У лабораторії фармакології протимікробних засобів відділу фармакології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» впродовж тривалого часу досліджуються антимікробні властивості адамантавмісних сполук, зокрема АМ-166 та КВМ-97. Було встановлено їх спектр антибактеріальної та антифунгальної активності щодо планктонних клітин мікроорганізмів та вивчено механізм дії [125, 126, 150, 151]. Так, антимікробний ефект сполуки АМ-166 обумовлений мембранотропними властивостями (змінами ультраструктури клітин мікроорганізмів, здатністю взаємодіяти з білком, фосфоліпідами і ДНК, підвищувати проникність

цитоплазматичної мембрани). Сполука АМ-166 сприяє підвищенню вмісту в зовнішній мембрані бактерій ліпополісахаридів із зміненим моносахаридним та жирнокислотним складом і стимулює утворення ергостерину у грибів [150]. Механізм антимікробної дії сполуки KBM-97 щодо планктонних клітин мікроорганізмів пов'язаний з мембранотропною активністю, порушенням цілісності та проникності цитоплазматичної мембрани бактерій та грибів, складу жирних кислот у клітинах *E. coli*, зниженням вмісту білка у клітинах *P. aeruginosa* та *S. aureus*, змінами ендogenous та субстратного дихання у клітинах бактерій, пригніченням активності ефлюксних pomp *P. aeruginosa* [151, 152]. На основі адамантанвмісної сполуки АМ-166 було розроблено мазь для лікування інфікованих ран мікотичного та бактеріального походження, доведено її антимікробну активність у дослідженнях *in vitro*, ефективність та безпеку при гнійно-запальних ранових процесах в експериментах *in vivo* [124, 150]. У сполук, що містять адамантильний радикал, в лабораторії фармакології протимікробних засобів були виявлені антибіоплівкові властивості щодо тест-штамів бактерій та грибів [127, 151], проте механізми їх дії щодо біоплівок не з'ясовано. Також, незважаючи на зростання кількості публікацій щодо вивчення біологічної активності адамантанвмісних сполук, літературні дані щодо механізму їх антибіоплівкової дії обмежені.

Тому саме встановленням деяких аспектів механізму антибіоплівкової активності похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу присвячена дисертаційна робота, що доповнить та розширить наукові знання про біологічну дію адамантавмісних сполук, дасть можливість оцінити перспективність розробки нових антимікробних препаратів на їх основі для профілактики інфекційних захворювань, пов'язаних з біоплівкою.

Таким чином, проведений аналіз літературних джерел дозволив зробити висновок, що біоплівки – це складні гетерогенні багатоклітинні структури, є одними з факторів патогенності мікроорганізмів та причиною розвитку хронічних рецидивуючих інфекцій. Бактерії у складі біоплівки характеризуються стійкістю до АМП, яка забезпечується їх будовою, наявністю

позаклітинного матриксу, функціонуванням сигнальних систем QS, здатністю клітин переходити у метаболічно неактивний стан, швидким поширенням генів резистентності. Для підвищення ефективності антимікробної терапії у пацієнтів з біоплівковими інфекціями перспективними є застосування речовин, які порушують адгезію мікроорганізмів до субстрату, здатні руйнувати позаклітинний матрикс, підвищуючи його проникність, впливати на системи QS та клітини-персистери. Нині здійснюється пошук нових сполук та комбінацій, здатних запобігати плівкоутворенню та руйнувати сформовані біоплівки мікроорганізмів, а також оцінка антибіоплівкової активності вже впроваджених в клінічну практику препаратів різних фармакотерапевтичних груп.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для досягнення поставленої мети та завдань у роботі використовували мікробіологічні, фармакологічні, біохімічні, електронно-мікроскопічні, фізико-хімічні, молекулярні та статистичні методи дослідження.

2.1 Матеріали дослідження

Речовини. В роботі досліджували адамантанвмісні сполуки:

- 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил) бензол (шифр АМ-166), отримано від ПАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод» (Україна);
- 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-(N-бензил, N-диметиламіно)-2-пропанолу хлорид (шифр KBM-97), сполука синтезована в Інституті органічної хімії НАН України канд. фарм. наук Ю. В. Коротким.

Як препарати порівняння в експериментах використано антимікробні засоби з різними механізмами дії: азитроміцин (*Azithromycin*, субстанція, серія 1502000319, отримано від ПАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», Україна), ципрофлоксацин (*Ciprofloxacin*, розчин для інфузій, виробництва Євролайд Хелтнер П.в.т Л.т.д, Індія), меропенем (*Meropenim*, порошок для розчину для ін'єкцій, виробництва АО «Лекхім», Україна).

Мікроорганізми. В роботі використано 2 еталонних та 31 клінічних штамів мікроорганізмів, виділених від пацієнтів хірургічного та урологічного профілю. Клінічні штами отримано в ДУ «Інститут урології ім. акад. О. Ф. Возіанова НАМН України» та ДУ «Національний науковий центр хірургії та трансплантології ім. О. О. Шалімова НАМН України».

Мікроорганізми:

- грампозитивні бактерії: *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), *S. aureus* 2239, *S. aureus* 2247, *S. aureus* 2282, *S. aureus* 2284,

S. aureus 2287, *S. aureus* 2296, *S. aureus* 222, *S. epidermidis* 2265, *S. epidermidis* 284, *S. epidermidis* 304;

- грамнегативні бактерії: *E. coli* 1, *E. coli* 2, *E. coli* 47n, *E. coli* 51, *E. coli* 120, *E. coli* 311, *E. coli* 1392, *E. coli* 1512, *E. coli* 1545 (1), *E. coli* 2029, *P. aeruginosa* 424, *P. aeruginosa* 449, *P. aeruginosa* 1366, *P. aeruginosa* 13п, *P. aeruginosa* 350 (1), *P. aeruginosa* 658, *P. aeruginosa* 1461, *P. aeruginosa* 46, *P. aeruginosa* 24/3, *P. aeruginosa* 28/3;

- дріжджоподібні гриби: *C. albicans* 1486.

Поживні середовища. Для проведення досліджень використано поживні середовища (ПС): бульйон та агар Мюллера-Хінтон (МХБ та МХА), триптон-соевий бульйон (TSB), агар та бульйон Luria Bertani (LB), Кінг А бульйон залежно від виду мікроорганізмів. Підтвердження культуральних властивостей тест-штамів здійснювали за допомогою середовищ: агар МакКонки, цетримідний та манітно-сольовий агар [153].

2.2 Методи дослідження

Визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Дослідження антибактеріальних властивостей щодо планктонних клітин мікроорганізмів похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу проводили методом серійних мікророзведень у рідкому ПС із визначенням МІК [154, 155]. Густина інокуляту становила 10^5 КУО/мл, що визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 600 нм. Термін інкубації мікроорганізмів з відповідними концентраціями досліджуваних сполук становив 18–24 год за 35–37 °С. За МІК приймали максимальне розведення сполуки, при якому ріст мікроорганізмів візуально не реєструвався. Сполуки розчиняли у 10,0 % розчині диметилсульфоксиду (ДМСО), офіційальні АМП – у відповідних розчинниках [156].

Дослідження адгезивних властивостей та здатності до плівкоутворення штамів мікроорганізмів. Здатність досліджуваних тест-штамів до плівкоутворення визначали в полістиролових планшетах за стандартною

методикою O'Toole [157], адгезивні властивості мікроорганізмів до абіотичної поверхні (полістиролові планшети) досліджували за методикою Christensen [158]. Оцінку результатів здійснювали відповідно до [158, 159].

Антибіоплівкова активність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу. Здатність сполук запобігати плівкоутворенню та руйнувати сформовані біоплівки мікроорганізмів досліджували у полістиролових планшетах для імуноферментного аналізу згідно з [157]. Для вивчення впливу сполук на формування біоплівок розчини досліджуваних речовин (0,15 МІК, 0,25 МІК, 0,5 МІК, 5,0 МІК) та культури бактерій вносили одночасно; для оцінки впливу на сформовані біоплівки – сполуки додавали на 2-у добу експерименту для *S. aureus* та на 5-у добу – для *P. aeruginosa*, *E. coli*. Для приготування інокуляту нічну культуру розводили у 100 разів (1:100) у ПС. Термін інкубації зі сполуками та препаратами складав 24 год за 37 °С. Біомасу біоплівок фарбували 0,1 % розчином генціанвіолету, барвник екстрагували органічним розчинником (95,0 % етанол). Вимірювання оптичної щільності проводили на «Adsorbance Microplate Reader ELx800» (BioTek, США) при довжині хвилі 630 нм. Контролем слугували інтактні культури мікроорганізмів, вирощені за тих самих умов без додавання розчинів сполук або препаратів.

Визначення впливу сполук на кількість метаболічно активних клітин. Кількість метаболічно активних клітин *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу визначали на етапі плівкоутворення та у сформованих 2-добових (*S. aureus*) або 5-добових біоплівках (*P. aeruginosa*, *E. coli*) з використанням окисно-відновного індикатора резаурину (0,5 мкг/лунка) згідно з [160, 161]. Для приготування інокуляту нічну культуру розводили у поживному середовищі TSB у 100 разів (1:100). Для вивчення впливу сполук на життєздатність мікроорганізмів на етапі плівкоутворення внесення розчинів досліджуваних речовин (0,5 МІК, 2,0 МІК, 5,0 МІК) та культур проводили одночасно, для оцінки впливу на життєздатність клітин у сформованих біоплівках *S. aureus* сполуки додавали на 2-у добу, *P. aeruginosa*, *E. coli* – на 5-у добу експерименту. Культури в присутності розчинів сполук або

препаратів порівняння інкубували впродовж 24 год за 37 °С. Отримані результати реєстрували на флуоресцентному спектрофотометрі «НІТАСНІ, МРФ-3» (Японія) при λ_{ex} 550 нм – λ_{em} 590 нм.

Флуоресцентна мікроскопія. Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на життєздатність бактеріальних клітин у складі сформованих біоплівок досліджували у концентрації 5,0 МІК методом флуоресцентного забарвлення з використанням барвників акрединового оранжевого (5 мкг/мл) та пропідій йодиду (3 мкг/мл) згідно з [162, 163]. Біоплівки бактерій вирощували у стерильних пластикових чашках Петрі впродовж 96 год (*S. aureus*) та 120 год (*P. aeruginosa*, *E. coli*). Сформовані біоплівки з розчинами сполук або препаратів інкубували впродовж 24 год за 37 °С. Результати оцінювали на флуоресцентному мікроскопі «Olympus BX-41» (Японія) на зеленому та червоному фільтрах.

Формування та чутливість персистерів. Формування метаболічно неактивних клітин (персистерів) клінічними тест-штамами мікроорганізмів за дії досліджуваних речовин визначали згідно з [164]. В експериментах використовували агар Мюлера-Хінтон з додаванням 10 г/л $\text{MgCl}_2 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Для виділення клітин-персистерів з активованою SOS-відповіддю 1-добові культури пересівали у рідке поживне середовище (TSB) та вирощували впродовж 24 год за 37 °С. Отриману культуру розводили у 100 разів, інкубували за 37 °С впродовж 24 год, центрифугували при 6 000 об/хв протягом 10 хв (4,0 °С) та двічі промивали у 50 мл холодного 0,9 % розчину NaCl. Оптичну густину інокуляту вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 600 нм. Культури ($\text{OD}_{600} = 0,8$) зі сполуками чи препаратами порівняння інкубували у планшетах впродовж 5 год (*S. aureus*, *E. coli*) та 3,5 год (*P. aeruginosa*) за 37 °С. Після закінчення терміну інкубації готували серію 10-кратних розведень, висівали згідно методу 6×6 крапель (6×6 drop plate method) [165] та інкубували в термостаті впродовж 24 год за 37 °С. Результати оцінювали за кількістю КУО. Про формування персистерів свідчить статистично достовірне зменшення

кількості клітин у дослідних зразках порівняно з контролем. Результати представлені у вигляді десяткового логарифма від загального числа КУО.

Вплив АМ-166 та КВМ-97 на персистери *P. aeruginosa*, отримані з використанням ципрофлоксацину (20 мкг/мл), досліджували згідно з [164]. Отриману субпопуляцію персистерів інкубували зі сполуками впродовж 2 год. Після закінчення терміну інкубації проводили висіви на агар Мюлера-Хінтон згідно методу 6×6 крапель [165]. Чашки інкубували впродовж 24 год за 37 °С та здійснювали підрахунок колоній. Результати представлені у вигляді десяткового логарифма від загального числа КУО.

Антиадгезивні властивості адамантавмісної сполуки у дослідженні in vivo. Ефективність сполуки КВМ-97 в експериментах *in vivo* вивчали згідно з [166, 167] на щурах лінії Wistar масою 220 – 280 г. Хірургічні шкірні рани моделювали на бічній поверхні спини щурів (2 рани, $S \approx 113 \text{ мм}^2$) через 24 год після епіляції. Для наркотизації тварин застосували уретан та хлоралозу (30 мг/мл та 3 мг/мл, відповідно) за умови внутрішньоочеревинного введення у дозі 2,0 мл/100,0 г. На ранову поверхню, очищену від залишків жирової тканини, наносили мікст-культуру (*S. aureus* + *P. aeruginosa* + *C. albicans*), інфікуюча доза – $0,5 \times 10^5$ КУО/мл. Ефективність розчину оцінювали за контамінацією мікроорганізмами ранової поверхні (КУО/мл або КУО/г) [168].

Підрахунок колоній мікроорганізмів в 1,0 г тканини проводили за формулою (2.1) [169]:

$$N = n \times 10 \times 10 (100, 1000) \times K, \quad (2.1)$$

де N – кількість мікроорганізмів у 1,0 г тканини;

n – кількість мікроорганізмів на чашці Петрі;

10 – перерахунок на 1,0 г суспензії;

10 (100, 1000) – розведення матеріалу, засіяного на чашку Петрі;

K – коефіцієнт перерахунку маси біоптату на 1,0 г тканини ($K = 1/\text{маса біоптату}$).

Антимікробна активність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на засобах медичного призначення. Дослідження антимікробної дії сполук та препаратів, нанесених на полімерну сітку для відновлювальної хірургії, проводили згідно з [170, 171]. В експериментах використані стерильні медичні сітки з поліпропілену РРМ 601 6×11 см (ТОВ "OPUSMED"). Стерильні фрагменти сітки (1,0 см²), змочені відповідними розчинами сполук, поміщали в чашки Петрі з поживним середовищем (МХА), яке інокульоване однією з бактеріальних культур: *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), *P. aeruginosa* 449, *E. coli* 311, *C. albicans* 1486 або мікст-культурою (*P. aeruginosa* 449 + *E. coli* 311 + *C. albicans* 1486). Щільність інокуляту склала близько ($1,5 \times 10^6$) КУО/мл. Контролем слугували фрагменти сіток, змочені розчинником сполук (10,0 % ДМСО). Після закінчення терміну інкубації (24 год за 37 °С) реєстрували діаметри зон затримки росту мікроорганізмів. Сітки з чашок з наявними зонами затримки росту переносили на свіже ПС, інокульоване відповідним тест-штамом. Дослідження проводили до зникнення зон затримки росту мікроорганізмів.

Гідрофобність бактерій. Гідрофобність клітин бактерій досліджували за допомогою ВАТН-тесту у двофазній системі з етилацетатом [172]. Культури бактерій (у логарифмічній фазі росту) інкубували зі сполуками та АМП впродовж 90 хв за 37 °С. Після цього до 3,0 мл інокуляту у 0,9 % NaCl з оптичною густиною (OD₆₀₀) (0,18 – 0,22) (A₀) додавали 0,5 мл розчинника, витримували 10 хв, струшували на вортексі та залишали за кімнатної температури до повного розділення фаз з наступним вимірюванням оптичної густини (A). Величину адгезивної активності бактеріальних клітин обчислювали за формулою (2.2) :

$$Ad\% = 100 \times [1 - (A/A_0)], \quad (2.2)$$

де A₀ і A – оптична густина водної фази суспензії бактерій до і після розділення фаз, відповідно.

Рухливість бактерій. Вплив сполук на специфічні фактори адгезії оцінювали щодо грамнегативних бактерій *P. aeruginosa* та *E. coli* за дією на різні види рухливості: свіммінг (*swimming*), свормінг (*swarming*) та твітчінг (*twitching*) [173]. Термін інкубації суспензії клітин зі сполуками становив 30 – 45 хв у поживному середовищі за 37 °С. Здатність до свіммінг-міграції вивчали з використанням 0,3 % агаризованого середовища Luria-Bertani (LB-агар) [174]. Свормінг-міграцію визначали на поверхні 0,5 % LB-агару [175]. Дослідження здатності бактерій до твітчінг-міграції проводили з використанням 1,0 % LB-агару [176]. Чашки Петрі з мікроорганізмами інкубували за температури 37 °С впродовж 16 – 24 год. Активність сполук оцінювали за величиною діаметра колоній.

Продукція компонентів матриксу. Для оцінки впливу сполук на вміст білків та полісахаридів у біоплівках, сформованих грампозитивними та грамнегативними мікроорганізмами, культури інкубували у поживному середовищі TSB (*S. aureus*, *E. coli*) та середовищі PI (*Pseudomonas isolation medium*) (*P. aeruginosa*) за наявності розчинів досліджуваних речовин у концентрації 0,5 МІК протягом 48 год за 37 °С. Екстракцію білків та полісахаридів проводили у 1,5 М розчині NaCl згідно з [177].

Визначення вмісту білка проводили за методом Lowry et al [178]. Отримані результати аналізували на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 750 нм. Концентрацію білка визначали за стандартною калібрувальною кривою, побудованою за бичачим сироватковим альбуміном («Fluka»).

Визначення кількості полісахаридів здійснювали згідно з DuBois et. al. [179] з використанням 5 % розчину фенолу і концентрованої сірчаної кислоти. Вміст вуглеводів визначали на спектрофотометрі для мікропланшет «Absorbance Microplate Reader ELx800» (BioTek, США) при 490 нм за стандартною кривою, побудованою за глюкозою.

Дослідження здатності грамнегативних бактерій продукувати Pel-полісахарид (*P. aeruginosa*) та целюлозу (*E. coli*) визначали за рівнем зв'язування компонентів матриксу біоплівок з Конго червоним [180, 181]. Для

оцінки впливу сполук та препаратів на продукцію Pel та целюлози штамми бактерій розчини у концентрації 0,5 МІК вносили до ПС та вирощували протягом 48 год за 37 °С. До суспензії клітин ($OD_{600} = 0,3$) додавали 20 мкг/мл (*P. aeruginosa*) чи 50 мкг/мл (*E. coli*) розчину Конго червоного та інкубували протягом 90 хв (*P. aeruginosa*) або 120 хв (*E. coli*) за 37 °С.

Дослідження здатності *S. aureus* продукувати Вар-білок визначали за рівнем зв'язування амілоїдного компоненту матриксу з Конго червоним [182, 183]. Активність сполук досліджували у концентрації 0,5 МІК за умови інкубації з бактеріальною культурою впродовж 90 хв за 37 °С. До суспензії клітин ($OD_{600} = 0,3$) додавали 50 мкг/мл розчину Конго червоного та витримували протягом 10 хв за 37 °С.

Отримані результати визначення Pel, целюлози та Вар-білка реєстрували за кількістю незв'язаного барвника на «Adsorbance Microplate Reader ELx800» (BioTek, США) при 490 нм. Концентрацію Конго червоного розраховували за стандартною калібрувальною кривою.

Проникність сполук через сформовані біоплівки бактерій. Визначення проникності похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу через матрикс біоплівок проводили з використанням полікарбонатних мембран [184]. Мембрану зі сформованою 48-год біоплівкою поміщали на чашку Петрі, засіяну чутливою культурою (*S. aureus* 222). На неї накладали диски, просочені розчином досліджуваних сполук (концентрація 200 мкг), або стандартні диски для визначення чутливості з антимікробними препаратами азитроміцином чи ципрофлоксацином. Після інкубації протягом 24 год за 37 °С вимірювали діаметри зон затримки росту. Відсоток проникності досліджуваних сполук та препаратів розраховували за формулою (2.3):

$$\% \text{ проникності} = d_1/d_2 \times 100, \quad (2.3)$$

де d_1 – діаметр зон затримки росту навколо мембрани з біоплівкою;

d_2 – діаметр зон затримки росту навколо стерильної мембрани.

Утворення піоціаніну. Оцінку впливу сполук на продукцію піоціаніну синьогнійною паличкою здійснювали відповідно до [185] з використанням поживного середовища King A. Термін інкубації бактеріальної культури (10^6 КУО/мл) зі сполуками (0,15 МІК та 0,5 МІК) становив 24 год за 37 °С. Для кількісного визначення піоціаніну використовували 3 мл хлороформу та 1 мл 0,2 М НСІ. Оптичну щільність визначали на «Adsorbance Microplate Reader ELx×800» (BioTek, США) при довжині хвилі 540 нм. Концентрацію піоціаніну розраховували за формулою (2.4):

$$\text{mg/L} = \text{OD}_{540} * 17.072 \quad (2.4)$$

Для перерахування вмісту піоціаніну на кількість бактеріальних клітин застосовували співвідношення $\text{OD}_{540}/\text{OD}_{600}$.

Гемолітична активність. Оцінку впливу сполук з адамантильним радикалом на гемолітичну активність клінічного штаму *P. aeruginosa* 449 здійснювали згідно з [186]. Для визначення гемолітичної активності використовували культури, вирощені на LB-агарі зі сполуками/препаратами або без (контроль) впродовж 24 год за 37 °С. Отриману бактеріальну суспензію ($\text{OD}_{630} = 0,4$) змішували з еритроцитами (10^8 клітин/мл) у співвідношенні 1:1 та інкубували впродовж 2 год за 37 °С. Кількість вивільненого гемоглобіну у супернатанті оцінювали на «Adsorbance Microplate Reader ELx×800» (BioTek, США) при довжині хвилі 540 нм. Відсоток загального лізису розраховували за формулою (2.5):

$$\% \text{лізису} = [(X - B) / (T - B)] \times 100, \quad (2.5)$$

де X – значення оптичної щільності дослідного зразка;

B – негативний контроль (еритроцити інкубували у LB бульйоні);

T – позитивний контроль (повністю лізовані еритроцити, отримані шляхом інкубації клітин з 0,1 % SDS).

Протеазна активність. Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на протеазну активність бактерій досліджували, використовуючи агар з 1,5 % казеїном відповідно до [187]. У дослідженні використовували культури мікроорганізмів, вирощені у рідкому ПС TSB без (контроль) або з сполуками/препаратами (0,15 МІК та 0,5 МІК) впродовж 18 год за 37 °С. Після інкубації нічну культуру (50 мкл) вносили у лунки, сформовані у товщі агару з 1,5 % казеїном, та інкубували за 37 °С протягом 16–18 год. Для виявлення зон протеолізу використовували 5,0 % розчин трихлороцтової кислоти (ТХО).

Синтез лактонвмісних сполук. Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на синтез лактонвмісних сполук *P. aeruginosa* досліджували колориметричним методом згідно з [188]. Культуру (10^6 КУО/мл) зі сполуками інкубували 18 год за 37 °С. Для екстракції лактонвмісних сполук використовували етилацетат. Отримані речовини розчиняли у 100 % ДМСО. Для їх кількісного визначення до зразків додавали суміш 2 М гідроксил аміну та 3,5 М розчину NaOH з наступним внесенням 10 % розчину FeCl₃ в 4 М HCl та 95,0 % етанолу. Вимірювання оптичної щільності проводили на «Adsorbance Microplate Reader ELx800» (BioTek, США) при 540 нм. Концентрацію сполук розраховували за стандартною калібрувальною кривою за аутоіндуктором 3-охо-C₁₂-HSL (N-(3-оксо-додеканоїл)-l-гомосерин лактон).

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Для детекції генів плівкоутворення *pelA*, *pslA*, *algD*, *algR*, *algU*, *algL*, генів QS *lasI*, *lasR*, *rhlR*, *pqsR*, генів ефлюксних pomp *mexB*, *mexR*, *mexY*, генів домашнього господарства *rpsL*, *oprL*, *rpoS*, *rpoD* у *P. aeruginosa*; гена резистентності *mecA*, генів, що регулюють формування біоплівки та синтез компонентів матриксу, *icaA* (з праймерами *ica* та *icaA*), *icaD*, *fib*, *fnbB*, *sarA*, *agrA*, *cidA* у *S. aureus*; генів адгезії *fimA*, *papC*, *fliC*, *motB*, *afa* та генів домашнього господарства *purA*, *rpoA*, *gyrA* у *E. coli* екстракцію ДНК з бактерій проводили експрес-методом з використанням ТЕ-буферу [189]. У дослідженні використовували 1-добові культури, вирощені на TSA. Бактеріальну культуру ресуспендували у 200 мкл ТЕ-буферу та інкубували 5 хв за 95 °С. Залишки бактеріальних клітин осаджували

центрифугуванням при 5000 об/хв впродовж 2 хв. Супернатант (180 – 190 мкл), який містить виділені нуклеїнові кислоти, відбирали у стерильні пробірки та використовували для подальших досліджень.

Для ампліфікації ДНК бактерій використовували реакційну ПЛР-суміш, яка містила: ПЛР-буфер (1x) (Thermo Fisher Scientific), 2,5 ммоль dNTP (Thermo Fisher Scientific), 10 пмоль кожного праймеру, 2,5 ммоль $MgCl_2$ (Thermo Fisher Scientific), H_2O (вільну від нуклеаз), 1 од. Platinum™ Taq ДНК-полімерази (Thermo Fisher Scientific) або Taq 2x Master Mix (M0207L, New England BioLabs Inc.), 10 пмоль кожного праймеру, H_2O (вільну від нуклеаз). Приготовану суміш (кінцевий об'єм 20 мкл) ретельно перемішували на центрифугі-вортекс та додавали по 5 мкл досліджуваних зразків ДНК.

Для детекції генів плівкоутворення та вірулентності у *P. aeruginosa* – *tucA*, *aprA*, *exoA*, *exoS*, *toxA*; генів адгезії у *S. aureus* – *ebpS*, *eno*, *clfB*, *bbp*, *sna* інокулят 1-добової культури бактерій інкубували за 95 °C впродовж 10 хв, після чого зразки центрифугували 10 хв при 14000 об/хв. Надосадову фракцію використовували для проведення ПЛР. Реакційна суміш для ампліфікації ДНК містила 10 мкл Dream Taq Green PCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific), 0,5 мкл кожного праймеру (10 пмоль), 4 мкл H_2O (вільну від нуклеаз) та 5 мкл ДНК бактерій. Температурний профіль ампліфікації був специфічний для кожної пари праймерів *P. aeruginosa* [190–202], *E. coli* [203–207], *S. aureus* [208–214]. Постановка ПЛР супроводжувалася негативним контролем (ПЛР-суміш без матриці). Послідовності праймерів зазначено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Олігонуклеотиди, використані у молекулярних дослідженнях

Праймер	Послідовність, 5' – 3'	Посилання
1	2	3
<i>P. aeruginosa</i>		
<i>pelA</i> (Fw)	CCTTCAGCCATCCGTTCTTCT	[190]
<i>pelA</i> (Rv)	TCGCGTACGAAGTCGACCTT	

Продовж. табл. 2.1

1	2	3
<i>pslA</i> (Fw) <i>pslA</i> (Rv)	TCCCTACCTCAGCAGCAAGCTGGT CGGATGTCGTGGTTGCGTACCAGGTAT	[191]
<i>algD</i> (Fw) <i>algD</i> (Rv)	GCTCAACCTGTCGCGCTACT GAACTCGCCACCACTTCGTC	[192]
<i>algR</i> (Fw) <i>algR</i> (Rv)	GAAGAAGCGCTGACGCTGAT ATGGCGCAAGGTCACGTACT	[192]
<i>algU</i> (Fw) <i>algU</i> (Rv)	GATTGATCGTGCGGTTCGTG AAGATCCGCGACCGTACCGT	[192]
<i>algL</i> (Fw) <i>algL</i> (Rv)	CCGCTCGCAGATCAAGGACATC TCGCTCACCGCCCAGTCG	[193]
<i>mucA</i> (Fw) <i>mucA</i> (Rv)	CTCTGCAGCCTTTGTTGCGAGAAGC CTGCCAAGCAAAAGCAACAGGGAGG	[194]
<i>lasI</i> (Fw) <i>lasI</i> (Rv)	CGCACATCTGGGA ACTCA CGGCACGGATCATCATCT	[195]
<i>lasR</i> (Fw) <i>lasR</i> (Rv)	CTGTGGATGCTCAAGGACTAC AACTGGTCTTGCCGATGG	[195]
<i>rhlR</i> (Fw) <i>rhlR</i> (Rv)	GCCAGCGTCTTGTTTCGG CGGTCTGCCTGAGCCATC	[195]
<i>pqsR</i> (Fw) <i>pqsR</i> (Rv)	CTGATCTGCCGGTAATTGG ATCGACGAGGA ACTGAAGA	[195]
<i>exoS</i> (Fw) <i>exoS</i> (Rv)	GGCGGATGCGGAAAAGTAC CTGACGCAGAGCGCGATT	[196]
<i>toxA</i> (Fw) <i>toxA</i> (Rv)	GGTAACCAGCTCAGCCACAT TGATGTCCAGGTCATGCTTC	[197]
<i>exoA</i> (Fw) <i>exoA</i> (Rv)	GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT	[198]
<i>aprA</i> (Fw) <i>aprA</i> (Rv)	GCTTCAGCCAGAACCAGAAGAT TCGACACATTGCCCTTCAAC	[199]
<i>rpsL</i> (Fw) <i>rpsL</i> (Rv)	GCAACTATCAACCGACTGGTG GCTGTGCTCTTG CAGGTTGTG	[200]
<i>oprL</i> (Fw) <i>oprL</i> (Rv)	AACAGCGGTGCCGTTGAC GTCGGAGCTGTCTG TACTCGAA	[196]
<i>rpoS</i> (Fw) <i>rpoS</i> (Rv)	CTCCCCGGGCAACTCCAAAAG CGATCATCCGCTTCCGACCAG	[201]
<i>rpoD</i> (Fw) <i>rpoD</i> (Rv)	GGGCGAAGAAGGAAATGGTC CAGGTGGCGTAGGTGGAGAA	[202]

Продовж. табл. 2.1

1	2	3
<i>E. coli</i>		
<i>fimA</i> (Fw) <i>fimA</i> (Rv)	GTTGTTCTGTCGGCTCTGTC ATGGTGTGTTGGTTCCGTTATTC	[203, 204]
<i>papC</i> (Fw) <i>papC</i> (Rv)	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	[204]
<i>fliC</i> (Fw) <i>fliC</i> (Rv)	ATTCCGTTCTTCCCTCGGTG TGGACACTTCGGTCGCATAG	[205]
<i>motB</i> (Fw) <i>motB</i> (Rv)	GAAGTATGGTTCGGAGGGTT GCCTGTTCGGCTTGTTCGTTG	[205]
<i>afa</i> (Fw) <i>afa</i> (Rv)	GCTGGGCAGCAAAGTGAATACTCTC CATCAAGCTGTITTTGTTTCGTCCGCCG	[204]
<i>malP</i> (Fw) <i>malP</i> (Rv)	TCGGCTATCGTAATGGCGTG CACGGCATTGAGAAACGGTG	[205]
<i>malZ</i> (Fw) <i>malZ</i> (Rv)	CAGGTGCTGTATGCGGAAGA CACGGCATTGAGAAACGGTG	[205]
<i>appB</i> (Fw) <i>appB</i> (Fw)	CGACGGATTTGACATGGGGA AAATAATGCCCCACCAGCGA	[205]
<i>appX</i> (Rv) <i>appX</i> (Fw)	GTATTTACTTTGGTTCGTCGGCA GGTCCAGCCATACCAACACA	[205]
<i>purA</i> (Fw) <i>purA</i> (Rv)	CGCGCTGATGAAAGAGATGA CATACGGTAAGCCACGCAGA	[206]
<i>rpoA</i> (Fw) <i>rpoA</i> (Rv)	GCGCTCATCTTCTTCCGAAT CGCGGTCGTGGTTATGTG	[207]
<i>gyrA</i> (Fw) <i>gyrA</i> (Rv)	GTCGTGGCGGGAAAGGTAAA CGGCTGGAGAAGCACAGAA	[205]
<i>S. aureus</i>		
<i>mecA</i> (Fw) <i>mecA</i> (Rv)	GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	[208]
<i>ica</i> (Fw) <i>ica</i> (Rv)	TCGCACTCTTTATTGATAGTCGCTACGAG TGCGACAAGAAGTACTGCTGCGTTAAT	[209]
<i>icaA</i> (Fw) <i>icaA</i> (Rv)	ACACTTGCTGGCGCAGTCAA TCTGGAACCAACATCCAACA	[210]
<i>icaD</i> (Fw) <i>icaD</i> (Rv)	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA	[210]
<i>icaR</i> (Fw) <i>icaR</i> (Rv)	ATCTAATACGCCTGAGGA TTCTTCCACTGCTCCAA	[211]

Продовж. табл. 2.1

1	2	3
<i>agrA</i> (Fw) <i>agrA</i> (Rv)	ACGTGG CAGTAATTCAGTGTATGTT GGCAATGAGTCTGTGAGATTTTGT	[209]
<i>sarA</i> (Fw) <i>sarA</i> (Rv)	GCTGTATTGACATACATCAGCGAAA CGTTGTTTGCTTCAGTGATTC	[209]
<i>cidA</i> (Fw) <i>cidA</i> (Rv)	AGCGTAATTTTCGGAAGCAACATCCA CCCTTAGCCGGCAGTATTGTTGGTC	[212]
<i>fib</i> (Fw) <i>fib</i> (Rv)	CTACAACTACAATTGCGTCAACAG GCTCTTGTAAGACCATTTTCTTCAC	[210]
<i>fnbB</i> (Fw) <i>fnbB</i> (Rv)	GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC	[210]
<i>bbp</i> (Fw) <i>bbp</i> (Rv)	AACTACATCTAGTACTCAACAACAG ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT	[210]
<i>clfB</i> (Fw) <i>clfB</i> (Rv)	ACATCAGTAATAGTAGGGG TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC	[210]
<i>cna</i> (Fw) <i>cna</i> (Rv)	AAAGCGTTGCCTAGTGGAGA AGTGCCTTCCCAAACCTTTT	[210]
<i>ebpS</i> (Fw) <i>ebpS</i> (Rv)	CATCCAGAACCAATCGAAGAC AGTTACATCATCATGTTTATCTTTTG	[210]
<i>eno</i> (Fw) <i>eno</i> (Rv)	ACGTGCAGCAGCTGACT CAACAGCATCTTCAGTACCTTC	[210]
<i>16S pPHK</i> (Fw) <i>16S pPHK</i> (Rv)	CTGTCGTCAGCTCGTGTTGT TTCATGGAGTCGAGTTGCAG	[213]

Примітки:

1. «Fw» –forward;
2. «Rv» – reverse.

Розділення продуктів ампліфікації проводили в 1,2 – 1,7 % агарозному гелі з додаванням інтеркалюючого барвника етидію броміду 0,01 – 0,02 %. Електрофорез проводили за напруги 3 В/см впродовж 30 – 40 хв. Після закінчення електрофорезу результати реєстрували на транслюмінаторі під УФ-випромінюванням (Bio-Rad, Німеччина).

Кількісна ПЛР у реальному часі. Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та KBM-97 на експресію досліджуваних генів у грамнегативних та грампозитивних бактерій визначали за допомогою ПЛР в реальному часі за впливу концентрації 0,5 МІК. Загальну РНК виділяли з

суспензії клітин 1-добових культур з використанням TRIzol Reagent (Zymo Research) та набору Direct-zol RNA Miniprep Plus (Zymo Research) згідно з інструкцією виробника. кДНК за необхідності синтезували з РНК за допомогою набору ProtoScript[®] First Strand cDNA Synthesis Kit (New England BioLabs Inc.).

Кількісну ПЛР для оцінки експресії генів *pelA*, *pslA*, *algD*, *algR*, *algU*, *algL*, *lasI*, *lasR*, *rhlR*, *pqsR*, *mexB*, *mexR*, *mexY*, *oprM* у *P. aeruginosa* та *fimA*, *papC*, *fliC*, *motB* у *E. coli* проводили з використанням реакційної суміші, що містила:

- Luna Universal One-Step Reaction Mix (2x) об'ємом 10 мкл, Luna_WarmStart[®] RT Enzyme Mix – 1 мкл, 10 пмоль кожного праймеру – 1 мкл, РНК досліджуваних зразків бактерій – 5 мкл; або

- Luna Universal qPCR Mix (1x) об'ємом 10 мкл, 10 пмоль кожного праймеру – 1 мкл та кДНК бактерій – 5 мкл.

Послідовності праймерів до відповідних генів наведено у табл. 2.1. Ампліфікацію проводили на приладі CFX96 Real-TimeSystem (Bio-Rad, Німеччина) за температурних режимів:

- 10 хв за 55 °C, 5 хв за 94 °C, 35 циклів (30 с за 94 °C, 40 с за 52 °C, 50 с за 72 °C) для гена *pelA*;

- 10 хв за 55 °C, 5 хв за 95 °C, 40 циклів (15 с за 95 °C, 30 с за 60 °C) – *pslA*, *algD*, *algR*, *algU*;

- 10 хв за 55 °C, 5 хв за 95 °C, 35 циклів (30 с за 95 °C, 60 с за 65 °C, 90 с за 72 °C) – *algL*;

- 10 хв за 55 °C, 10 хв за 95 °C, 35 циклів (15 с за 95 °C, 55 с за 65 °C, 72 с за 72 °C) для генів *lasI*, *lasR*, *pqsR*;

- 10 хв за 55 °C, 5 хв за 95 °C, 40 циклів (15 с за 95 °C, 30 с за 60 °C) – *rhlR*;

- 10 хв за 55 °C, 5 хв за 95 °C, 45 циклів (15 с за 95 °C, 5 с за 53 °C, 10 с за 72 °C) для генів *mexB*, *mexY*;

- 10 хв за 55 °C, 5 хв за 94 °C, 35 циклів (30 с за 95 °C, 30 с 53 °C, 40 с за 72 °C) для генів *mexR*, *oprM*;

– 10 хв за 55 °C, 4 хв за 95 °C, 40 циклів (20 с за 95 °C, 30 с за 55 °C, 30 с за 72 °C) – *fimA*, *motB*, *fliC*.

– 10 хв за 55 °C, 4 хв за 95 °C, 35 циклів (60 с за 95 °C, 60 с за 65 °C, 60 с за 72 °C) – *papC*.

Реєстрацію флюоресценції комплексу κДНК/SYBRGreen проводили на стадії синтезу (72 °C) у кожному циклі ампліфікації. За ендogenous контроль приймали експресію генів *rpsL*, *rpoS* або *rpoD* (*P. aeruginosa*), *gyrA* (*E. coli*).

Порівняльний аналіз експресії генів *tucA*, *aprA*, *exoA*, *exoS*, *toxA* у *P. aeruginosa*; *appB*, *appX*, *malP*, *malZ* у *E. coli*, *icaA* (з праймерами *ica* та *icaA*), *icaD*, *icaR*, *agrA*, *sarA*, *cidA*, *fib*, *fnbB*, *clfB*, *eno*, *ebpS* у *S. aureus* проводили за допомогою кількісної ПЛР. Сумарну РНК виділяли з суспензії клітин добової культури з використанням TRIzol Reagent (Invitrogen) з подальшою обробкою ДНКазою I («Fermentas», Литва). Концентрацію РНК визначали на спектрофотометрі DS-11 FX+ («DeNovix», США). Як ендogenous контроль приймали експресію гена *16S pPHK* [213]. Послідовності праймерів до досліджуваних генів наведено у табл. 2.1.

Ампліфікацію генів проводили за допомогою набору Luna Universal One-Step Reaction Mix (2x) (New England BioLabs Inc.) або PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix («Applied Biosystems™», США) на приладі QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System («Applied Biosystems™», США) за температурних режимів:

– 1 хв за 95 °C, 45 циклів (15 с за 95 °C, 60 с за 60 °C) для генів *tucA*, *aprA*, *exoA*, *exoS*, *toxA*;

– 1 хв за 95 °C, 45 циклів (15 с за 95 °C, 15 с за 58 °C, 30 с за 72 °C) для генів *appB*, *appX*, *malP*, *malZ*;

– 2 хв за 50 °C, 2 хв за 95 °C, 40 циклів (15 с за 95 °C, 15 с за 58 °C, 60 с за 72 °C) – *icaA*, *icaD*;

– 1 хв за 95 °C, 45 циклів (15 с за 95 °C, 60 с за 72 °C) – *icaR*;

– 2 хв за 50 °C, 2 хв за 95 °C, 40 циклів (15 с за 95 °C, 60 с за 60 °C) – *agrA*, *sarA*, *cidA*;

– 10 хв за 55 °C, 1 хв за 95 °C, 45 циклів (10 с за 95 °C, 15 с за 55 °C, 60 с за 72 °C) для генів *fib*, *fnbB*, *clfB*;

– 10 хв за 55 °C, 1 хв за 95 °C, 45 циклів (10 с за 95 °C, 15 с за 57 °C, 60 с за 72 °C) – *eno*, *ebpS*.

Застосовуючи набір для ПЛР в реальному часі Luna Universal One-Step Reaction Mix (2x) (New England BioLabs Inc.) реакційна суміш містила: Luna Universal One-Step Reaction Mix (2x) об'ємом 10 мкл, Luna_WarmStart® RT Enzyme Mix (20x) – 1 мкл, 10 пмоль кожного праймеру – 0,25 мкл, РНК досліджуваних зразків бактерій – 1 мкл.

При використанні набору PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix («Applied Biosystems™», США) реакційна суміш для кількісної ПЛР об'ємом 10 мкл містила: 5 мкл PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix («Applied Biosystems™», США), 10 пмоль кожного праймеру та 2 мкл препарату кДНК, синтезованого з РНК за допомогою набору RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) відповідно до інструкції виробника.

Розрахунок відносного рівня експресії кожного гена проводили за методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [214]. Кожна постановка ПЛР містила негативний контроль (ПЛР-суміш без матриці), ампліфікацію для кожного зразка і для кожного гена проводили у двох повторах. Специфічність цільового продукту встановлювали за допомогою аналітичного плавлення по завершенню процесу ампліфікації у діапазоні температур від 65 °C до 95 °C.

Геномна мінливість. Ампліфікацію з праймерами до нуклеотидних повторів проводили у 20 мкл реакційної суміші, що містила 10 мкл Dream Taq Green PCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific), 15 пмоль праймеру та 30 нг ДНК. Для аналізу використовували праймери до мікросателітного повтору M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') та до тринуклеотидного повтору (5'-(GTG)₄-3'). Реакційна суміш містила лише один праймер. ПЛР здійснювали, використовуючи прилад «Mastercycler Personal 5332» («Eppendorf», Німеччина) за температурного режиму: початкова денатурація – 95 °C, 2 хв; 40 циклів: 95 °C, 20 с; 51 °C, 45 с; 72 °C, 2 хв; кінцева елонгація – 72 °C, 7 хв.

Продукти ПЛР розділяли у 1,7 % агарозному гелі, що містив 0,01 % бромистого етидію, протягом 60 хв при 3 В/см. Результати візуалізували в УФ-світлі. Розмір ампліконів визначали за допомогою маркера молекулярної маси Gene Ruler 100 bp Plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific).

*Секвенування гена *tusA*.* Для визначення можливих мутацій у гені *tusA* геномну ДНК *P. aeruginosa* 449 виділяли з 1-добової культури методом кип'ятіння [215]. Реакційна суміш для ампліфікації гена *tusA* (об'єм 20 мкл) містила: 10 мкл DreamTaq Hot Start Green PCR Master Mix (2×) (Thermo Fisher Scientific), 20 пмоль кожного праймера (табл. 2.1) та 5 мкл ДНК бактерій. ПЛР проводили на приладі «Mastercycler Personal 5332» («Eppendorf», Німеччина) за температурного режиму: початкова денатурація – 95 °С, 2 хв; 30 циклів: 95 °С, 10 с; 60 °С, 15 с; 72 °С, 30 с; кінцева елонгація – 72 °С, 5 хв. Продукти ПЛР розділяли за допомогою електрофорезу в 1,7 % агарозному гелі з бромистим етидієм (0,01 %) та візуалізували в УФ-світлі. Отриманий амплікон вирізали та очищали за допомогою набору для екстракції ДНК з гелю Monarch® Spin (New England BioLabs Inc.). Концентрацію ДНК вимірювали за допомогою DS-11 FX+ («DeNovix», США). Реакцію секвенування проводили з обома праймерами на «Genetic Analyzer 3130» («Applied Biosystems», США) з використанням набору BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific). Отриману нуклеотидну послідовність порівнювали з послідовністю гена *tusA* у тест-штаму *P. aeruginosa* PAO1 (NC_002516), депонованого в GenBank (дата звернення: 07 липня 2025 р.). Для вирівнювання та аналізу послідовностей використовували MEGA 11 [216].

Статистичний аналіз. Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням програм Excel 2010 (Microsoft Corp., США) та Statistica 10.0 (StatSoft, США). Усі наведені дані подано у вигляді середнього арифметичного (M) і стандартної помилки середнього (m). Для оцінки результатів досліджень та виявлення відмінностей між дією сполук та антимікробних препаратів були використані критерії Шапіро-Уїлка (встановлення нормальності розподілу значень вибірки), Краскела-Уолеса при

розподілі, відмінному від нормального, дисперсійний аналіз ANOVA (критерії Ньюмена-Кейлса та Тьюкі) для множинних порівнянь при нормальному розподілі. Вірогідними вважалися відмінності між групами при рівні значущості $p < 0,05$ [217].

Експерименти супроводжувались контролюми культури, поживного середовища та відповідних розчинів сполук/препаратів. Дослідження проведені не менше ніж у трьох повторях.

РОЗДІЛ 3

ПЛІВКОУТВОРЕННЯ ГРАМПОЗИТИВНИХ ТА ГРАМНЕГАТИВНИХ
БАКТЕРІЙ ЗА ДІЇ ПОХІДНИХ 4-(1'-АДАМАНТИЛ)-1R-БЕНЗОЛУ3.1 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на формування біоплівки
в експериментах *in vitro*

Планктонні клітини мікроорганізмів, потрапляючи на біотичний чи абіотичний субстрат, утворюють складні структури – біоплівки, що спричиняють хронічні, рецидивуючі запальні процеси. Формування біоплівки – багатоетапний процес, початковим етапом є адгезія клітин до поверхні.

Для визначення антибіоплівкової дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на першому етапі оцінювали адгезивність та здатність до плівкоутворення на абіотичній поверхні клінічних тест-штамів *Staphylococcus* spp. (*S. aureus*, *S. epidermidis*), *E. coli* та *P. aeruginosa*. Отримані дані наведено на рис. 3.1.

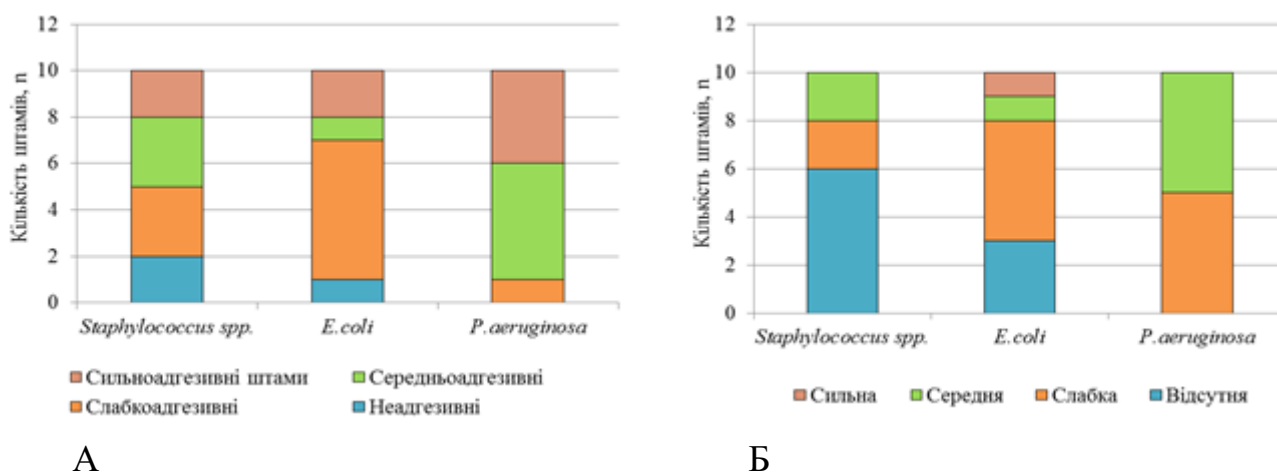


Рис. 3.1 Адгезивні властивості (А) та здатність до плівкоутворення (Б) клінічних ізолятів грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів

Отримані результати (рис. 3.1 А) показали, що серед грампозитивних бактерій роду *Staphylococcus* ($n = 10$) сильноадгезивними були два клінічні ізоляти *S. aureus* 222 та *S. epidermidis* 2265, грамнегативних мікроорганізмів –

два тест-штами *E. coli* (*E. coli* 1, *E. coli* 311) та чотири штами *P. aeruginosa* (*P. aeruginosa* 424, *P. aeruginosa* 449, *P. aeruginosa* 350, *P. aeruginosa* 1461).

При визначенні здатності досліджених штамів до плівкоутворення встановлено (рис. 3.1 Б), що неадгезивні або слабоадгезивні штами характеризувалися слабкою здатністю або не утворювали біоплівки, середньоадгезивні – проявляли слабку або середню здатність до формування біоплівки, сильноадгезивні – середню або сильну здатність до плівкоутворення.

Враховуючи адгезивні властивості тест-штамів для наступних експериментів було відібрано *S. aureus* 222, *E. coli* 311 та *P. aeruginosa* 449. Встановлено, що тест-штам *S. aureus* 222 є метицилін-резистентний (MRSA), що підтверджено молекулярними методами за транскрипційною активністю гена *mecA* та антибіотикочутливістю культури (стійка до оксациліну, цефокситину, чутлива до ванкоміцину та кліндаміцину) [218].

Чутливість відібраних тест-штамів мікроорганізмів до дії досліджуваних речовин та антимікробних лікарських засобів оцінювали методом серійних мікророзведень з визначенням МІК. Отримані результати наведено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Чутливість клінічних штамів бактерій до дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу (МІК, мкг/мл)

Сполуки та препарати	<i>S. aureus</i> 222	<i>E. coli</i> 311	<i>P. aeruginosa</i> 449
АМ-166	2,5	25,0	100,0
КВМ-97	2,0	25,0	50,0
Азитроміцин	0,12	—	31,25
Ципрофлоксацин	16,0	0,01	0,25
Меропенем	—	0,015	2,5

Примітка. «—» — дослідження не проводили, враховуючи антибіотикочутливість тест-штаму [155, 156].

Згідно з результатами проведених експериментів (табл. 3.1) досліджувані сполуки найбільш виразно пригнічують ріст та розмноження планктонних клітин грампозитивних мікроорганізмів, мінімальна інгібуюча концентрація АМ-166 та КВМ-97 щодо золотистого стафілококу у межах (2,0 – 2,5) мкг/мл. Встановлено, що антимікробна активність сполук щодо грамнегативних бактерій поступається такій щодо грампозитивних, МІК відносно *E. coli* 311 і *P. aeruginosa* 449 у межах від 25,0 мкг/мл до 100,0 мкг/мл. За інгібуючим ефектом АМ-166 та КВМ-97 поступаються АМП ципрофлоксацину та меропенему.

Порушення першого етапу плівкоутворення у бактерій є однією з ключових стратегій профілактики та хронізації інфекцій, пов'язаних з біоплівкою [47]. Здатність сполук, що містять адамантильний радикал, запобігати формуванню біоплівок на абіотичному субстраті вивчали, використовуючи полістиролові планшети для імуноферментного аналізу. Концентрації АМ-166 та КВМ-97 становили 0,15 МІК, 0,25 МІК, 0,5 МІК та 5,0 МІК. Вибір діапазону субінгібуючих концентрацій (суб-МІК) обумовлений тим, що суб-МІК антимікробних речовин по різному впливають на формування біоплівки, від пригнічення її утворення до стимуляції синтезу біоплівкоутворюючих компонентів [219–222]. Пригнічення плівкоутворення за впливу суб-МІК може бути використано при розробці стратегій профілактики та лікування пацієнтів з інфекційними процесами, тоді як стимуляція росту є джерелом додаткових ризиків, як для інфікування біоплівкою тканин хазяїна, так і для забруднення імплантів та медичних пристроїв.

Окрім біомаси біоплівок, що утворилась за дії АМ-166 та КВМ-97 на початковому етапі, визначали життєздатність клітин грампозитивних (*S. aureus*) та грамнегативних (*E. coli*, *P. aeruginosa*) бактерій. Як антимікробні препарати у дослідженнях антибіоплівкової активності щодо *S. aureus* використовували макролідний АМП азитроміцин, *E. coli* та *P. aeruginosa* – меропенем та ципрофлоксацин. Отримані дані представлені на рис. 3.2 – 3.5.

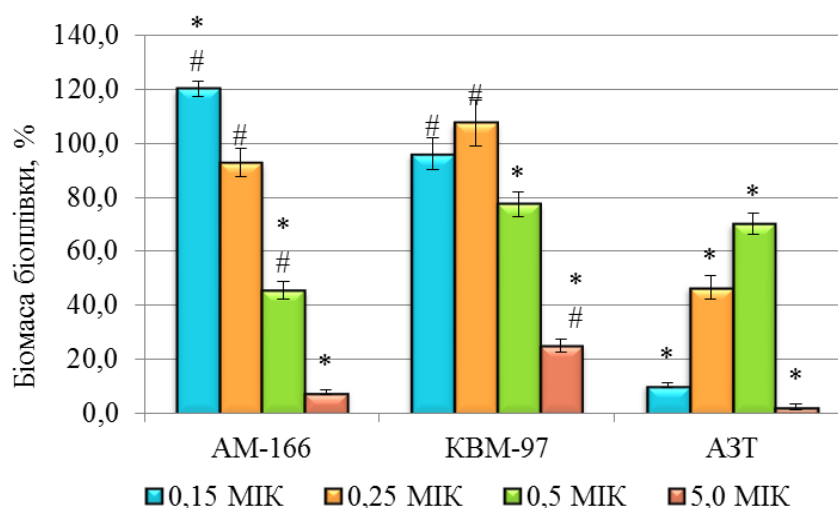


Рис. 3.2 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на плівкоутворення *S. aureus* 222

Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «А3Т» – азитроміцин;
3. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
4. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації азитроміцину ($p < 0,05$);
5. Розмір вибірки: $n = 6$.

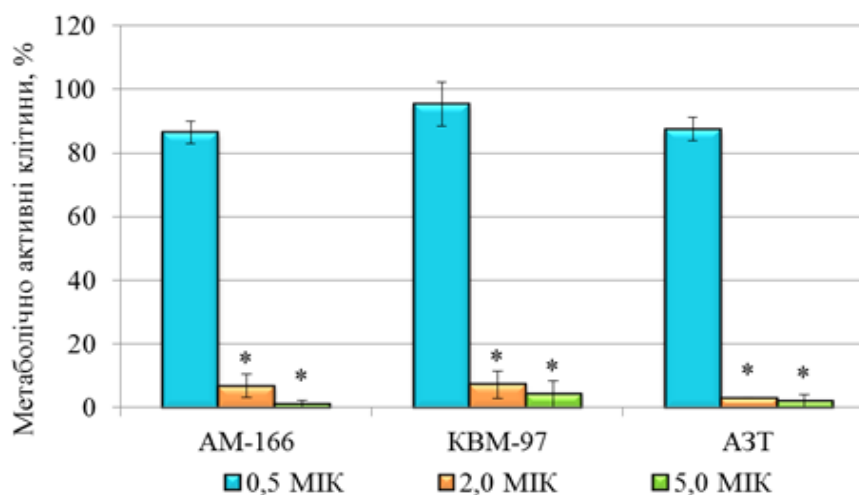


Рис. 3.3 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на життєздатність клітин *S. aureus* 222 на етапі плівкоутворення

Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «А3Т» – азитроміцин;
3. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
4. Розмір вибірки: $n = 3$.

Отримані дані (рис. 3.2) свідчать, що сполуки з адамантильним радикалом пригнічують плівкоутворення *S. aureus* 222 у концентраціях 0,5 МІК та 5,0 МІК. За дії АМ-166 та КВМ-97 у концентрації 5,0 МІК біомаса зменшується на 92,3 % та 75,0 %, при 0,5 МІК – на 54,5 % та 22,5 %, відповідно (порівняно з інтактним контролем). За умови зменшення концентрації похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу до 0,25 МІК та 0,15 МІК антибіоплівковий ефект або не проявляється або спостерігається незначне збільшення біомаси біоплівки. Аналіз отриманих даних показав, що сполуки АМ-166 та КВМ-97 у концентрації 5,0 МІК не поступаються активності азитроміцину ($p > 0,05$). Представник макролідів виявляє інгібувальну дію у всіх досліджуваних концентраціях (зменшення біомаси у межах від 29,8 % до 97,6 %).

Враховуючи, що біоплівка складається з клітин з різною метаболічною активністю, що є одним з факторів стійкості мікробних спільнот до дії АМП, на наступному етапі було оцінено зміну кількості метаболічно активних клітин на етапі плівкоутворення за впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу (0,5 МІК, 2,0 МІК та 5,0 МІК). Дослідження проводили з використанням окисно-відновного індикатора резазурину. Активність бактеріальних клітин реєстрували за зміною кольору інкубаційного середовища з синього на рожевий та інтенсивністю флуоресценції (λ_{ex} 550 нм; λ_{em} 590 нм) [160, 161].

Встановлено (рис. 3.3), що за умови інкубації клітин MRSA з адамантанвмісними сполуками АМ-166 та КВМ-97 у концентраціях 2,0 МІК та 5,0 МІК відмічено значне зниження кількості метаболічно активних клітин (у межах від 92,7 % до 99,3 %). За дії 0,5 МІК сполуки активності не виявляють. Подібний ефект спостерігається за дії азитроміцину.

Виявлений інгібувальний ефект сполук на біомасу біоплівок та кількість метаболічно активних клітин у концентраціях, більших за 1,0 МІК, може бути пов'язаний з впливом на планктонні клітини мікроорганізмів та відповідним механізмом дії (мембранотропна активність, вплив на метаболічні процеси, порушення ендогенного та субстратного дихання) [150, 151]. Проте виявлені зміни у біомасі біоплівки за дії суб-МІК похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

свідчить про порушення початкових етапів плівкоутворення у *S. aureus* 222, що може реалізовуватися впливом на фізико-хімічні властивості бактеріальної поверхні, біосинтез адгезинів, що беруть участь у адгезії та колонізації субстрату.

Отримані дані антибіоплівкової дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу щодо представника грамнегативних бактерій *E. coli* 311 наведено на рис. 3.4.

Встановлено (рис. 3.4 А), що сполука АМ-166 запобігає плівкоутворенню *E. coli* 311 за дії у всіх досліджуваних концентраціях, біомаса біоплівки зменшується у межах від 36,9 % до 85,3 %.

Антибіоплівкова активність KBM-97 виявлена за дії 0,5 МІК та 5,0 МІК, інгібіція становить 83,6 % та 71,1 % ($p < 0,05$). У нижчих концентраціях 0,15 МІК та 0,25 МІК сполука KBM-97 виявляє стимулюючий ефект (збільшення біомаси на 28,6 % та 17,0 %, відповідно).

Встановлено, що за інгібуючим ефектом адамантанвмісна сполука АМ-166 (0,15 МІК, 0,25 МІК, 5,0 МІК) не поступається активності ципрофлоксацину ($p > 0,05$), у концентрації 0,25 МІК – переважає дію меропенему ($p < 0,05$).

Отримані дані щодо визначення кількості метаболічно активних клітин *E. coli* 311 на етапі плівкоутворення за дії сполук та АМП свідчать (рис. 3.4 Б), що сполука АМ-166 в усіх концентраціях впливає на життєздатність кишкової палички, спостерігається зниження кількості метаболічно активних клітин у межах від 85,4 % до 96,5 %. Похідне 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу KBM-97 у концентрації 5,0 МІК та 2,0 МІК знижує кількість життєздатних клітин *E. coli* 311 на (86,0 – 89,2) %, проте у субінгібуючій концентрації життєздатність бактерій відповідає такій у контролі.

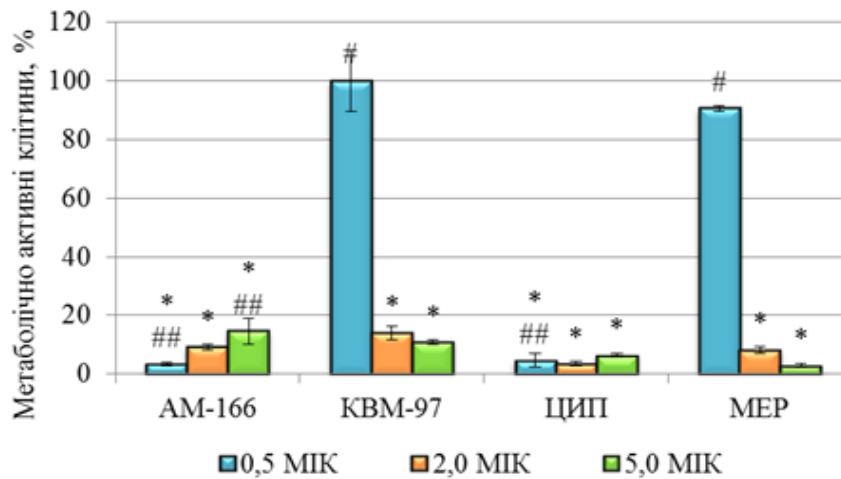
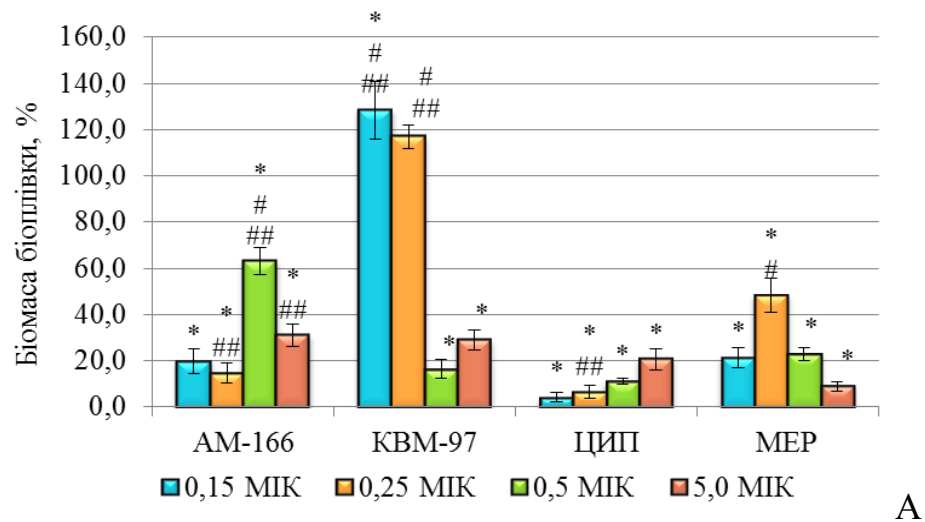


Рис. 3.4 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на плівкоутворення (А) та життєздатність клітин (Б) *E. coli* 311

Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «ЦИП» – ципрофлоксацин; «МЕР» – меропенем;
3. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
4. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації ципрофлоксацину ($p < 0,05$);
5. «##» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації меропенему ($p < 0,05$);
6. Розмір вибірки: $n = 6$ при визначенні біомаси біоплівки (А), $n = 3$ при визначенні кількості метаболічно активних клітин (Б).

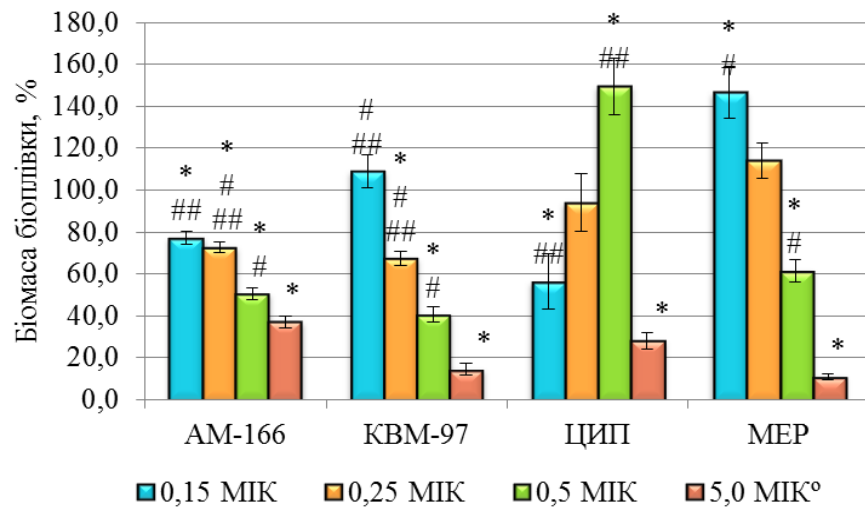
Аналіз отриманих результатів свідчить (рис. 3.4 Б), що дія сполуки АМ-166 подібна або не поступається активності ципрофлоксацину в усіх досліджених концентраціях (інгібування за дії АМП у межах від 93,6 % до 96,5 %) та меропенему у концентраціях 2,0 МІК та 5,0 МІК (зменшення кількості метаболічно активних клітин на 91,8 % та 97,1 %, відповідно). Інгібуючий ефект КВМ-97 при 2,0 МІК та 5,0 МІК наближається до такого досліджуваних АМП.

Експериментами встановлено вплив АМ-166 та КВМ-97 на утворення біоплівки іншим грамнегативним патогеном – *P. aeruginosa* 449. У попередніх дослідженнях [151, 225] була виявлена антибіоплівкова активність сполуки КВМ-97 щодо тест-штаму *P. aeruginosa* 449 у концентраціях 0,5 МІК та 5,0 МІК. Нами був розширений діапазон досліджуваних субінгібуючих концентрацій (додано 0,15 МІК та 0,25 МІК), оскільки відомо, що АМП у концентраціях, нижчих за 1,0 МІК, здатні як пригнічувати, так і стимулювати формування бактеріальних біоплівок [219, 226–228].

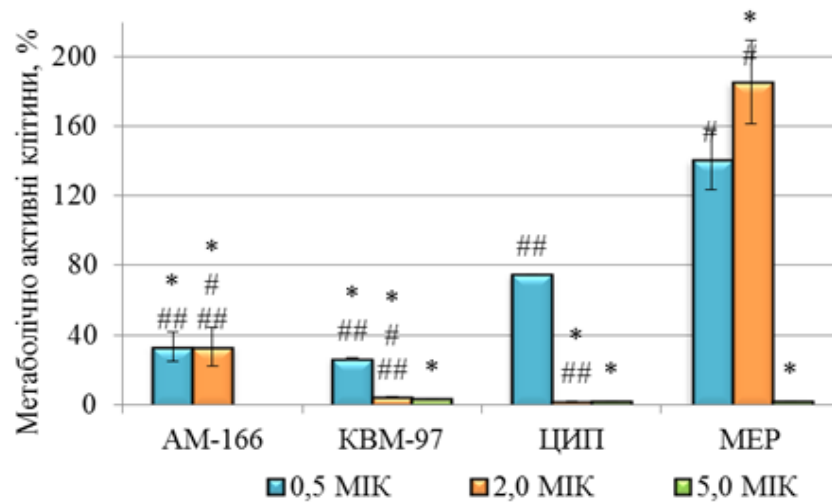
Максимальна досліджувана концентрація сполуки АМ-166 щодо *P. aeruginosa* 449 становила 2,0 МІК, враховуючи її розчинність та появу мутності розчину у вищих концентраціях, що може призвести до некоректного аналізу результатів дослідження. Отримані результати наведено на рис. 3.5.

Встановлено (рис. 3.5 А), що за дії АМ-166 в субінгібуючих концентраціях біомаса біоплівок *P. aeruginosa* 449 зменшується в межах від 22,8 % до 49,4 %, залежно від концентрації, при 2,0 МІК – на 62,9 %. За дії КВМ-97 також виявлено зменшення біомаси біоплівок *P. aeruginosa* 449 від 32,6 % до 85,6 %.

Отримані дані свідчать, що сполуки АМ-166 та КВМ-97 у концентраціях 0,25 МІК та 0,5 МІК за антибіоплівковою дією переважають або не поступаються ципрофлоксацину і меропенему; у концентраціях, що перевищують 1,0 МІК, наближаються або не поступаються антибіоплівковій активності АМП (зменшення біомаси на 71,9 % та 89,0 %, відповідно).



А



Б

Рис. 3.5 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на плівкоутворення (А) та життєздатність клітин (Б) *P. aeruginosa* 449

Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «ЦИП» – ципрофлоксацин; «МЕР» – меропенем;
3. «°» – максимальна досліджувана концентрація сполуки АМ-166 становить 2,0 МІК;
4. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
5. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації ципрофлоксацину ($p < 0,05$);
6. «##» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації меропенему ($p < 0,05$);
7. Розмір вибірки: $n = 6$ при визначенні біомаси біоплівки (А), $n = 3$ при визначенні кількості метаболічно активних клітин (Б).

Результати дослідження життєздатності клітин *P. aeruginosa* 449 на етапі плівкоутворення за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу свідчать (рис. 3.5 Б), що адамантанвмісні сполуки виразно зменшують кількість метаболічно активних клітин: за дії АМ-166 – на 66,7 %, сполуки КВМ-97 – у межах від 73,4 % до 96,6 %.

Встановлено (рис. 3.5 Б), що активність адамантанвмісних сполук у субінгібуючій концентрації подібна або переважає дію препаратів порівняння ципрофлоксацину та меропенему. Сполука КВМ-97 у концентраціях 2,0 МІК та 5,0 МІК наближається до дії досліджуваних АМП. За дії на *P. aeruginosa* 449 препаратів порівняння ципрофлоксацину (2,0 МІК та 5,0 МІК) та меропенему (5,0 МІК) метаболічно активні клітини синьогнійної палички не виявлені (інгібування 100,0 %).

Таким чином, похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та КВМ-97 у концентраціях, що перевищують 1,0 МІК та субінгібуючих виявляють антимікробні властивості щодо біоплівки, сформованих грамнегативними бактеріями на ранніх етапах плівкоутворення.

Адамантанвмісні сполуки АМ-166 та КВМ-97 здатні зменшувати біомасу біоплівки та кількість метаболічно активних клітин. Отриманий ефект може бути пов'язаний зі здатністю сполук зумовлювати зміни у регуляторних механізмах, зокрема функціонуванні QS, та порушувати прикріплення клітин до субстрату, впливаючи на специфічні та неспецифічні фактори адгезії. Пригнічення кількості метаболічно активних клітин за дії сполук може бути обумовлене їх впливом на енергетичні процеси у бактерій [151] або перехід клітин у метаболічно неактивний стан та формування персистерів.

3.2 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на неспецифічні та специфічні фактори адгезії мікроорганізмів

Першим етапом формування біоплівки є адгезія клітин до абіотичної чи біотичної поверхні, яка на початкових стадіях забезпечується фізико-хімічними

властивостями поверхонь бактеріальних клітин та субстрату (рівнем гідрофобності, величиною заряду, шорсткістю і хімічним складом поверхні), електростатичними взаємодіями, Ван-дер-Ваальсовими силами, а пізніше незворотне прикріплення бактерій обумовлене поверхневими адгезинами (джгутики, пілі/фімбрії, нефімбріальні адгезини) та відбувається за допомогою диполь-дипольних, гідрофобних взаємодій, водневих, іонних та ковалентних зв'язків [19, 229]. Вплив на фактори, які беруть участь у прикріпленні бактерій до субстрату, є перспективним напрямком досліджень при розробці нових АМП для профілактики розвитку інфекцій, пов'язаних з біоплівкою [219–222].

3.2.1 Вплив сполук на неспецифічні фактори адгезії

Важливим фактором, що впливає на неспецифічну адгезію бактерій є гідрофобність, яка визначається складом їх клітинних стінок, зокрема ліпополісахаридами та деякими білками. Збільшення гідрофобності клітинної поверхні може супроводжуватись підсиленням здатності мікроорганізмів до плівкоутворення [230].

При дослідженні впливу АМ-166 та KBM-97 на гідрофобні властивості клітин грампозитивних (*S. aureus*) та грамнегативних (*P. aeruginosa*, *E. coli*) бактерій, мікроорганізми інкубували зі сполуками впродовж 90 хв за 37 °С. Оцінку здійснювали за зміною ступеня адгезивної активності бактеріальних поверхонь. Згідно з результатами проведених експериментів, тест-штами характеризуються різним ступенем адгезивної активності: *S. aureus* 222 – 76,3 %, *P. aeruginosa* 449 – 62,6 % та *E. coli* 311 – 39,2 %.

Отримані дані щодо зміни гідрофобності поверхні бактерій за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу наведено на рис. 3.6 – 3.7.

Встановлено (рис. 3.6), що за дії сполуки АМ-166 у концентрації 2,0 МІК гідрофобність поверхні клітин зменшувалась на 20,1 %, при 0,5 МІК – на 30,1 %.

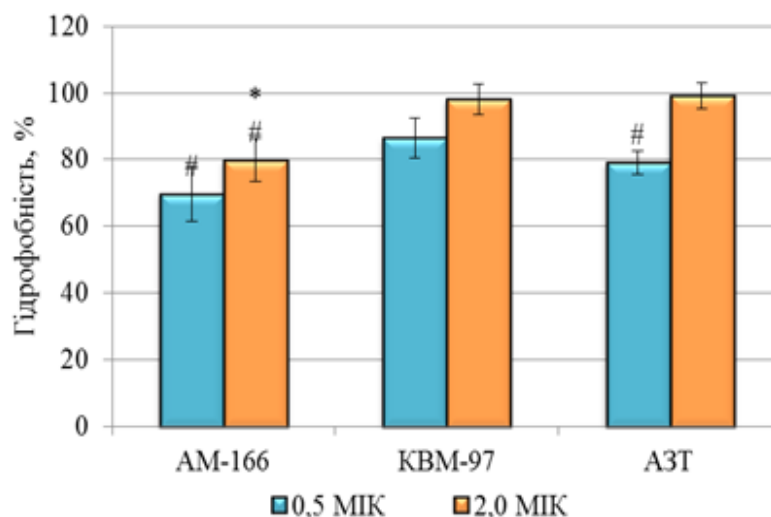


Рис. 3.6 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на гідрофобність бактеріальних клітин *S. aureus* 222

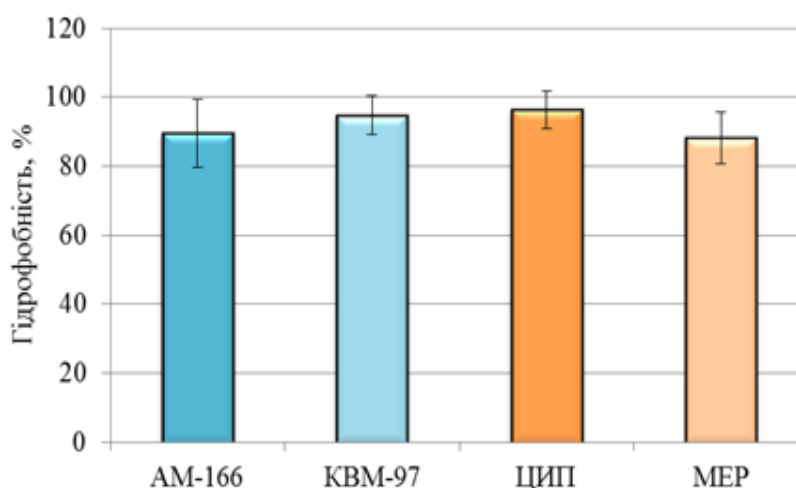
Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «АЗТ» – азитроміцин;
3. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
4. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації азитроміцину ($p < 0,05$);
5. Розмір вибірки: $n = 3$.

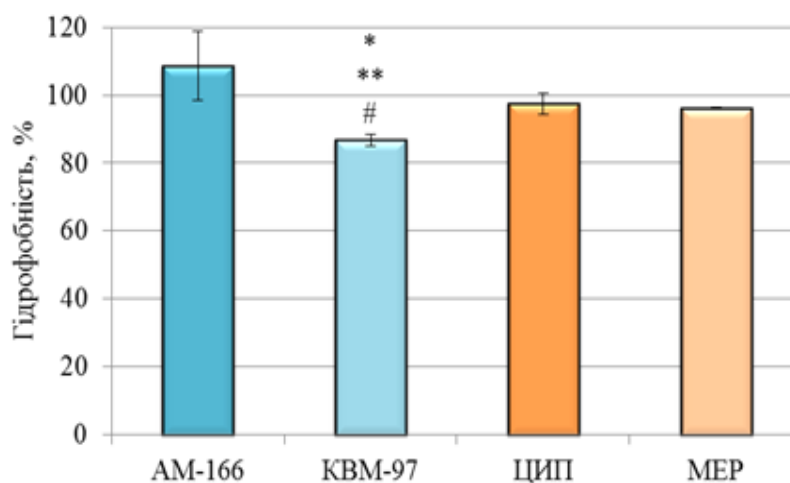
Показано (рис. 3.6), що сполука KBM-97 при 0,5 МІК зменшувала гідрофобність на 13,5 % ($p > 0,05$), при 2,0 МІК – практично не впливала на гідрофобні властивості метицилін-резистентного *S. aureus* 222. Антимікробний препарат азитроміцин у концентрації 0,5 МІК зменшував гідрофобність на 20,9 %, за впливу у концентрації 2,0 МІК змін не виявлено.

Вплив сполук на гідрофобність *E. coli* та *P. aeruginosa* здійснювали за дії 0,5 МІК через високу мутність розчинів при збільшенні концентрації та неможливість проведення коректного аналізу отриманих даних. Результати дослідження наведено на рис. 3.7.

Отримані дані (рис. 3.7) свідчать, що на відміну від впливу на гідрофобність *S. aureus* 222, сполука AM-166 не призводить до статистично достовірних змін у гідрофобності представників грамнегативних бактерій.



А



Б

Рис. 3.7 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на гідрофобність бактеріальних клітин: А – *E. coli* 311, Б – *P. aeruginosa* 449

Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «ЦИП» – ципрофлоксацин; «МЕР» – меропенем;
3. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
4. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до ципрофлоксацину ($p < 0,05$);
5. «**» – відмінності вірогідні по відношенню до меропенему ($p < 0,05$);
6. Розмір вибірки: $n = 3$.

Незначне зниження гідрофобності поверхні клітин *P. aeruginosa* 449 відмічено лише за дії KBM-97 у дослідженій концентрації 0,5 МІК (зменшення на 13,2 % порівняно з інтактним контролем, $p < 0,05$). Антимікробні препарати ципрофлоксацин та меропенем не змінюють гідрофобності *E. coli* 311 та *P. aeruginosa* 449, та за цим параметром вірогідно поступаються досліджуваним сполуці KBM-97.

Таким чином встановлено, що адамантанвмісні сполуки здатні впливати на неспецифічний фактор адгезії – гідрофобність: сполука AM-166 сприяє зниженню гідрофобних властивостей клітин *S. aureus*, KBM-97 – *P. aeruginosa* ($p < 0,05$). Отримані результати можуть бути зумовлені особливостями хімічної структури сполук та складу клітинних стінок бактерій (наявністю поверхнево-асоційованих білків). Зниження гідрофобних властивостей сприяє зниженню адгезії бактеріальних клітин до субстрату, міжклітинної агрегації та може призводити до порушення першого етапу формування біоплівки.

3.2.2 Вплив сполук на специфічні фактори адгезії

Одним з важливих факторів адгезії та колонізації бактерій абіотичного чи біотичного субстрату є рухливість мікроорганізмів, яка обумовлена джгутиками або пілями. Бактерії здатні переміщуватись на поверхні чи у товщі середовища різними способами: у рідкому середовищі клітини рухаються за типом «плавання» (свіммінг-міграція, від англ. *swimming*) за допомогою джгутика, у напіврідкому середовищі для грамнегативних мікроорганізмів характерний швидкий рух по типу «роїння» (свормінг-міграція, від англ. *swarming*), що здійснюється за участю джгутиків та пілей IV типу, по вологій поверхні бактерії переміщуються по типу «твітчінг» (від англ. *twitching*) за допомогою пілей IV типу [231, 232]. Останній вид рухливості виявляють при культивуванні мікроорганізмів на поверхні щільного поживного середовища в чашках Петрі у просторі між шаром агару та дном чашки.

Для встановлення впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на рухливість грамнегативних бактерій у дослідженні використовували клінічні ізоляти *P. aeruginosa* 449 та *E. coli* 311. Препаратами порівняння слугували меропенем та ципрофлоксацин. Концентрації досліджуваних речовин складали 0,5 МІК та 2,0 МІК. Оскільки тривалість інкубації зі сполуками становила 30 – 45 хв використання концентрації 2,0 МІК не призводило до повного пригнічення росту планктонних клітин. Результати впливу сполук та препаратів порівняння на міграцію *P. aeruginosa* 449 наведено у табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на міграцію *P. aeruginosa* 449

Умови дослідження	Міграція (D, мм)					
	<i>Swimming</i> -міграція		<i>Swarming</i> -міграція		<i>Twitching</i> -міграція	
Контроль	7,0 ± 0,0		10,7 ± 0,4		9,0 ± 0,9	
Концентрації	0,5 МІК	2,0 МІК	0,5 МІК	2,0 МІК	0,5 МІК	2,0 МІК
АМ-166	4,1 ± 0,24 #, *, **	—	7,5 ± 0,41 *, **	—	7,5 ± 0,76	—
КВМ-97	10,2 ± 0,6 #, *, **	—	13,2 ± 0,6	12,3 ± 1,5	8,3 ± 2,6	—
Ципрофлоксацин	6,7 ± 0,2	6,7 ± 0,2**	14,7 ± 1,6	—	14,2 ± 5,4	—
Меропенем	6,0 ± 0,0	6,0 ± 0,0 ^{#,*}	11,5 ± 1,7	—	12,2 ± 2,9	—

Примітки:

1. «D» – діаметр колонії;
2. «—» – повне пригнічення рухливості;
3. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
4. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації ципрофлоксацину ($p < 0,05$);
5. «**» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації меропенему ($p < 0,05$);
6. Розмір вибірки: $n = 6$.

Експериментально встановлено (табл. 3.2), що за дії похідного 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 відмічено пригнічення усіх типів рухливості, у субінгібуючій концентрації 0,5 МІК зони міграції зменшуються у межах від 1,5 мм до 3,2 мм, при 2,0 МІК – зони міграції відсутні. Виявлені зміни у *twitching*-міграції *P. aeruginosa* 449 (при 0,5 МІК) статистично не достовірні ($p > 0,05$).

За дії сполуки KBM-97 у субінгібуючій концентрації 0,5 МІК спостерігається збільшення зон *swimming*- та *swarming*-міграції на 3,2 мм та 2,5 мм, зони *twitching*-міграції *P. aeruginosa* 449 практично не змінюються. При 2,0 МІК спостерігається повне пригнічення *swimming*- та *twitching*-рухливості. Значущих змін *swarming*-міграції *P. aeruginosa* 449 за дії сполуки KBM-97 не виявлено ($p > 0,05$).

Згідно з результатами проведених досліджень, активність АМ-166 (0,5 МІК) переважає таку препаратів порівняння ципрофлокацину та меропенему (*swimming*- та *swarming*-рухливості). Дія сполуки KBM-97 (0,5 МІК) поступається (*swimming*-міграція) або подібна до такої досліджуваних АМП (*swarming*-рухливість).

Антимікробні препарати ципрофлоксацин та меропенем у концентрації 2,0 МІК не впливають на міграцію синьогнійної палички по типу «*swimming*» (діаметри зон рухливості у межах від 6,0 мм до 6,7 мм), та повністю пригнічують *swarming*- та *twitching*-рухливості.

При дослідженні впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на рухливість по типу «*swimming*» іншого представника грамнегативних бактерій *E. coli* 311 зареєстровано ріст культури по всій товщі агару у чашках Петрі у контрольних та дослідних пробах, що свідчить про відсутність порушення рухливості *swimming*-міграції кишкової палички.

Результати дослідження впливу сполук на *swarming*- та *twitching*-рухливість *E. coli* 311 представлено у табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на міграцію *E. coli* 311

Умови дослідження	Міграція (D, мм)			
	<i>Swarming</i> -міграція		<i>Twitching</i> -міграція	
Контроль	29,8 ± 1,7		36,8 ± 3,3	
Концентрації	0,5 МІК	2,0 МІК	0,5 МІК	2,0 МІК
АМ-166	45,2 ± 2,2 ^{*,**}	36,5 ± 11,0	27,7 ± 2,5	21,0 ± 1,0 [#]
КВМ-97	78,0 ± 3,2 ^{#,**}	57,5 ± 4,7 ^{#,*,**}	33,0 ± 4,7	10,2 ± 2,1 ^{#,*}
Ципрофлоксацин	73,0 ± 1,0 ^{#,**}	35,0 ± 0,7	24,0 ± 2,5 [#]	27,5 ± 4,2 ^{#,**}
Меропенем	32,0 ± 9,0 [*]	18,5 ± 1,6	21,0 ± 1,8 [#]	16,0 ± 0,8 ^{#,*}

Примітки:

1. «D» – діаметр колонії;
2. «–» – повне пригнічення рухливості;
3. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
4. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації ципрофлоксацину ($p < 0,05$);
5. «**» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації меропенему ($p < 0,05$);
6. Розмір вибірки: $n = 6$.

Отримані дані свідчать (табл. 3.3), що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та КВМ-97 стимулюють *swarming*-рухливість кишкової палички: діаметри зон міграції при 0,5 МІК збільшуються на 15,4 мм та 48,2 мм, при 2,0 МІК – на 6,7 мм та 27,7 мм, відповідно, порівняно з контролем. За дії сполуки АМ-166 виявлені зміни статистично не достовірні ($p > 0,05$). Подібний ефект зареєстровано у препараті порівняння ципрофлоксацину (0,5 МІК). Представник карбапенемів меропенем не впливає на *swarming*-міграцію у субінгібуючій концентрації, при 2,0 МІК зменшує зону міграції на 11,3 мм.

Встановлено (табл. 3.3), що штам *E. coli* 311 характеризується виразною *twitching*-міграцією, діаметр зон міграції інтактної культури між щільним середовищем та склом складає 36,8 мм.

Сполуки АМ-166 та КВМ-97 в обох досліджуваних концентраціях пригнічують *twitching*-міграцію кишкової палички, обумовлену пілями IV типу. За дії АМ-166 у концентрації 0,5 МІК та 2,0 МІК діаметри зон рухливості зменшуються на 9,1 мм та 15,8 мм, КВМ-97 – на 3,8 мм та 26,6 мм, відповідно. Препарати порівняння ципрофлоксацин та меропенем виявляють подібний інгібуючий ефект.

Таким чином, похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та КВМ-97 більш виразно пригнічують рухливість грамнегативних бактерій, обумовлену пілями IV типу (*twitching*-міграція). Сполуки не впливають на міграцію по типу «*swimming*» та стимулюють *swarming*-рухливість у *E. coli* 311. Проте за їх дії у концентрації, що перевищує МІК, пригнічується рухливість *P. aeruginosa* 449, окрім *swarming*-міграції (КВМ-97). Отримані дані можуть свідчити, що досліджувані сполуки здійснюють негативний вплив саме на пілі IV типу, а не на джгутики мікроорганізмів.

3.3 Утворення клітин-персистерів грампозитивними та грамнегативними бактеріями за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Дослідження впливу адамантанвмісних сполук АМ-166 та КВМ-97 на плівкоутворення грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів показало, що антибіоплівкова дія сполук реалізовується зменшенням біомаси біоплівки та кількості метаболічно активних клітин, що може свідчити про формування метаболічно неактивних клітин – персистерів. Утворення персистерів є одним з факторів резистентності бактерій у складі біоплівки, вони характеризуються стійкістю до АМП та є резервуаром бактеріальних клітин для відновлення мікробних спільнот. Найчастіше персистери утворюються за дії АМП, які впливають на метаболічні процеси бактерій, зокрема фторхінолони (ципрофлоксацин, офлоксацин) чи аміноглікозиди (тобраміцин, гентаміцин) [233, 234].

Літературні дані свідчать, що клітини бактерій переходять у персистуючий стан за дії АМП у концентраціях $\geq 5,0$ МІК, підвищення концентрації не супроводжується збільшенням або зменшенням кількості утворених клітин-персистерів [235].

Для *S. aureus* 222 та *E. coli* 311 експериментально встановлено, що найбільш оптимальним для виділення персистерів була інкубація зі сполуками та препаратами впродовж 5 год (середина логарифмічної фази росту для золотистого стафілококу та стаціонарна фаза росту кишкової палички), для *P. aeruginosa* 449 тривалість інкубації сполук зі штамом становила 3,5 год, що відповідало часу досягнення культурою середини логарифмічної фази росту.

Концентрація сполук АМ-166 та КВМ-97, препарату порівняння азитроміцину (щодо *S. aureus* 222) відповідала 5,0 МІК, ципрофлоксацину (щодо *E. coli* 311 та *P. aeruginosa* 449) – 20 мкг/мл. Досліджувана концентрація АМ-166 щодо *P. aeruginosa* 449 становила 2,0 МІК, враховуючи розчинність сполуки.

Результати дослідження показали (табл. 3.4), що за дії сполук з адамантильним радикалом спостерігається утворення персистерів грампозитивними та грамнегативними мікроорганізмами, але їх кількість не перевищує таку за дії АМП ($\leq 1,0$ %) [236, 237]. За впливу сполуки АМ-166 частка персистерів *S. aureus* 222 становить 0,11 %, КВМ-97 – 0,71 %. Азитроміцин не впливав на кількість клітин порівняно з контролем ($p > 0,05$), вони залишались метаболічно активними, що підтверджено реакцією з резазурином.

Досліджувані сполуки значно знижують кількість утвореної субпопуляції персистуючих клітин *E. coli* 311, сполука КВМ-97 практично повністю інгібує ріст клітин *E. coli* (частка персистерів – 10^{-8} %), за дії сполуки АМ-166 кількість персистерів становить $0,67 \times 10^{-4}$ %. За дії ципрофлоксацину кількість клітин *E. coli* 311 вірогідно зменшується, проте вони залишаються метаболічно активними.

Таблиця 3.4

Формування клітин-персистерів за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-
бензолу

Умови експерименту	Кількість клітин-персистерів, lg КУО/мл		
	<i>S. aureus</i> 222	<i>E. coli</i> 311	<i>P. aeruginosa</i> 449
Контроль	8,99 ± 0,22	10,47 ± 0,24	9,94 ± 0,06
АМ-166	6,06 ± 0,27 ^{*,##}	4,30 ± 0,00 ^{*,#}	6,15 ± 0,29 ^{*,#}
КВМ-97	7,84 ± 0,24 ^{*,##}	0,50 ± 0,00 ^{*,#}	7,43 ± 0,21 [*]
Азитроміцин	8,92 ± 0,28	—	—
Ципрофлоксацин	—	8,91 ± 0,20 [*]	7,90 ± 0,13 [*]

Примітки:

1. «—» – дослідження не проводили, враховуючи чутливість тест-штаму;
2. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
3. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації ципрофлоксацину ($p < 0,05$);
4. «##» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації азитроміцину ($p < 0,05$);
5. Розмір вибірки: $n = 7$.

За даними різних досліджень частота утворення персистерів у популяції синьогнійної палички за дії антимікробних засобів (зокрема, ципрофлоксацину) виявляється в межах від $<0,001$ % [237] до 0,01–0,1 % [165].

Отримані дані свідчать (табл. 3.4), що сполука АМ-166 не запобігає утворенню метаболічно неактивних клітин *P. aeruginosa*, частка клітин-персистерів у популяції становить 0,016 %, за дії КВМ-97 – 0,31 %, що нижче, ніж за дії ципрофлоксацину (0,9 %, $p > 0,05$). Проте, при підтвердженні утворення персистерів (клітини синьогнійної палички відмивали від сполук та повторно витримували з тією ж самою концентрацією за тих самих умов) за дії КВМ-97 (5,0 МІК) та АМ-166 (2,0 МІК) реєструвалось повне інгібування росту клітин. Такий ефект міг бути зумовлений тривалим постантибіотичним ефектом (ПАЕ) сполук (до 6 год) [151] чи їх впливом на метаболічно неактивні клітини. Для з'ясування цього ефекту на наступному етапі оцінено чутливість

персистерів, що утворились за впливу ципрофлоксацину, до досліджуваних сполук. Виділені клітини інкубували впродовж 2 год з АМ-166 (2,0 МІК), КВМ-97 (5,0 МІК) та ципрофлоксацином (20 мкг/мл). Отримані дані наведено на рис. 3.8.

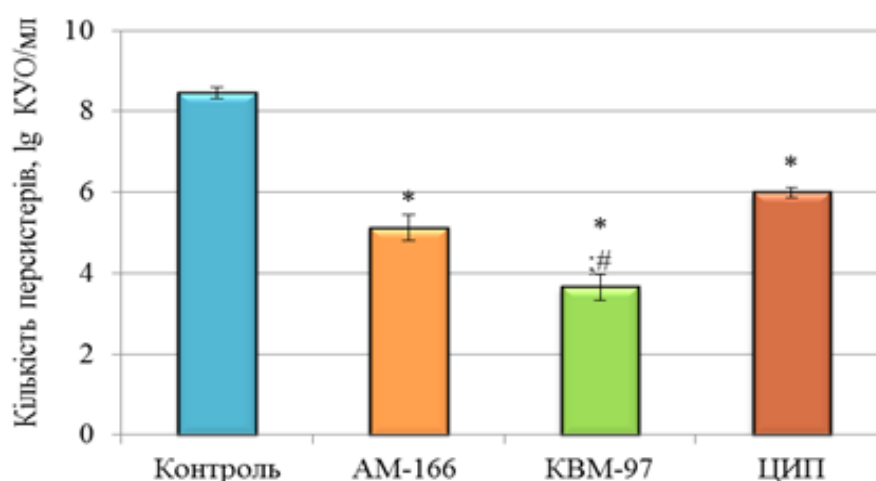


Рис. 3.8 Чутливість клітин-персистерів *P. aeruginosa* 449 до дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
2. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до ципрофлоксацину ($p < 0,05$);
3. Розмір вибірки: $n = 10$.

Проведені експерименти показали (рис. 3.8), що АМ-166 знижує кількість клітин-персистерів з 8,46 lg КУО/мл (контроль) до 5,12 lg КУО/мл, КВМ-97 – до 3,65 lg КУО/мл. Ципрофлоксацин достовірно знижував кількість утворених персистерів до 5,99 lg КУО/мл.

Таким чином, отримані дані свідчать, що досліджувані сполуки з адамантильним радикалом АМ-166 та КВМ-97 здатні зменшувати або запобігати формуванню персистерів *E. coli* 311, але не перешкоджають утворенню персистерів *S. aureus* 222 та *P. aeruginosa* 449. З іншого боку, похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу виявляють специфічну антимікробну активність щодо клітин-персистерів *P. aeruginosa* 449, що може бути пов'язано

з їх тривалим антибіотичним ефектом; прямою дією на метаболічно неактивні клітини або відновленням метаболічно активного стану бактерій і дією на безпосередню мішень. Отримані дані є важливими, оскільки вплив на персистери може підвищити ефективність антибіотикотерапії та запобігти хронізації інфекційного процесу.

3.4 Антиадгезивна активність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу в експериментах *in vivo* та на засобах медичного призначення

В експериментах *in vitro* було встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та КВМ-97 виявляють антибіоплівкову активність щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій на початкових етапах формування біоплівок, що свідчить про їх здатність запобігати плівкоутворенню та розвитку хронічних інфекцій. Для оцінки перспективності створення на їх основі антимікробних препаратів та засобів медичного призначення, були проведені дослідження щодо інгібувальної дії сполук на моделі шкірної хірургічної рани та засобах медичного призначення (медична сітка для відновлювальної хірургії). Ці дослідження доповняють дані попередніх досліджень щодо ефективності адамантанвмісних сполук в експериментах *in vivo* та *in vitro* [124, 127, 150, 151, 225, 238].

Формування біоплівок бактерій в експериментах in vivo на моделі хірургічної шкірної рани за дії похідного 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу.

Для встановлення перспективності створення на основі сполуки, що містить у структурі адамантильний радикал, препаратів з антибіоплівковою дією, враховуючи результати досліджень *in vivo* на моделі генералізованої інфекції та місцевого гнійно-запального процесу (стафілококовий кон'юнктивіт) [151], було оцінено здатність КВМ-97 попереджувати колонізацію ранової поверхні, інфікованої мікст-культурою (*S. aureus* + *P. aeruginosa* + *C. albicans*), на щурах лінії *Wistar* згідно [166].

Ефективність сполуки вивчали у концентрації 0,05 % (згідно з даними дослідження її токсичності та місцевоподразнюючої дії [151, 239]) за умови одночасного з інфікуванням нанесення на ранову поверхню, а також через 15 хв після інфікування.

Тварини були розподілені на 4 групи:

- I і II групи – контроль, обробка рани 0,9 % розчином NaCl;
- III і IV групи – обробка рани 0,05 % KBM-97.

Щурам I, III груп розчини сполуки 0,9 % NaCl або KBM-97 (0,05 %) наносили на рану в об'ємі 0,8 мл/рана одноразово, одночасно з інфікуванням (лікувально-профілактичний режим застосування). Через 15 хв поверхню рани промивали 0,9 % NaCl і відбирали рідину для мікробіологічного аналізу.

Тваринам II та IV груп розчини 0,9 % NaCl або 0,05 % KBM-97 наносили на рану через 15 хв після інфікування (лікувальний режим застосування). Через 30 хв (з лівої рани) і 60 хв (з правої рани) відбирали рідину і тканину з дна рани. Кількість мікроорганізмів на поверхні рани і в тканинах визначали висівом відібраних зразків на чашки Петрі з TSA після інкубації за 37 °C впродовж 18–24 год. Ефективність розчину KBM-97 оцінювали за контамінацією мікроорганізмами ранової поверхні (КУО/мл або КУО/г) [169].

Результати представлені у табл. 3.5 – 3.6 та на рис. 3.9.

Таблиця 3.5

Лікувально-профілактична ефективність KBM-97 на моделі шкірних площинних ран, інфікованих мікст-збудниками

Характер досліджу	Контамінація, КУО/мл		Зменшення контамінації, lg КУО/мл
	вихідні дані	15 хв	
Контроль, 0,9 % NaCl	$0,5 \times 10^5$	$1,9 \times 10^3$	–
KBM-97, 0,05 % розчин	$0,5 \times 10^5$	$2,8 \times 10^{1*}$	1,79

Примітки:

1. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
2. Розмір вибірки: $n = 4$.

Таблиця 3.6

Лікувальна ефективність KBM-97 на моделі шкірних площинних ран,
інфікованих мікст-збудниками

Характер досліджу	Мікробна контамінація				
	вихідні дані	поверхня рани, КУО/мл		тканини, КУО/г	
		30 хв	60 хв	30 хв	60 хв
Контроль	$0,5 \times 10^5$	$1,9 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$4,3 \times 10^4$	$4,2 \times 10^4$
KBM-97, 0,05 % розчин	$0,5 \times 10^5$	$4,2 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2^*$	$1,5 \times 10^4^*$	$3,6 \times 10^3^*$

Примітки:

1. «*»– відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
2. Розмір вибірки: $n = 4$.

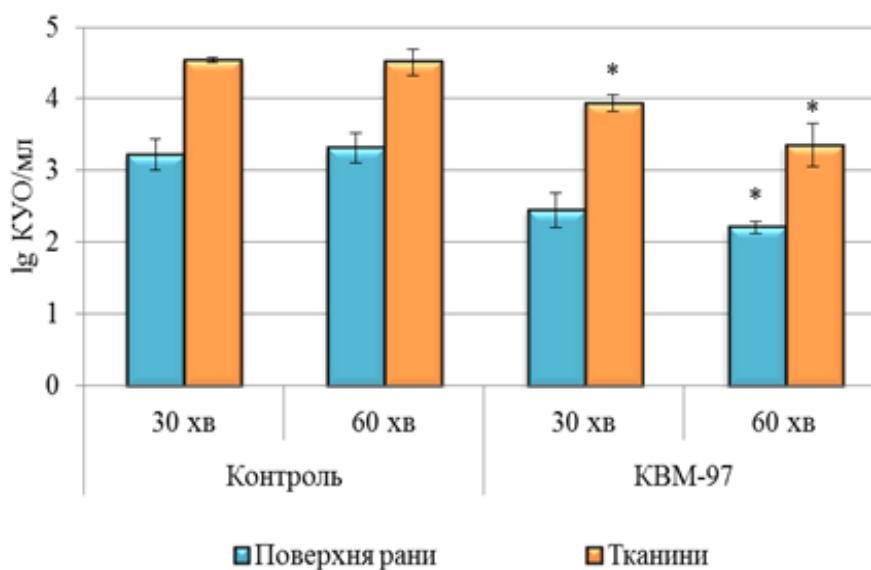


Рис. 3.9 Динаміка обсіменіння ран щурів (lg КУО) за дії KBM-97

Примітки:

1. «*»– відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
2. Розмір вибірки: $n = 4$.

Результати проведених досліджень (табл. 3.5) свідчать, що через 15 хв після застосування розчину KBM-97 зареєстровано зниження рівня обсіменіння поверхні рани на 1,79 lg КУО.

Встановлено (табл. 3.6 та рис. 3.9), що через 30 хв та 60 хв після нанесення 0,05 % розчину KBM-97 кількість мікроорганізмів на поверхні рани зменшилась на 0,77 lg КУО та 1,1 lg КУО, у тканинах – на 0,59 lg КУО та 1,2 lg КУО, відповідно.

Ефективність сполуки KBM-97 може забезпечуватися антимікробною дією щодо планктонних клітин бактерій та грибів, зокрема його мембранотропними властивостями [151], а також впливом на фактори адгезії (поверхневі адгезини, пілі IV типу), що потребує подальших поглиблених досліджень.

Таким чином, дослідження *in vivo* показали, що сполука KBM-97 (0,05 % розчин) проявляє антиадгезивні властивості, зменшуючи мікробну контамінацію у глибині рани та на її поверхні, запобігає бактеріальній колонізації тканин та поширенню інфекційного процесу.

Колонізація засобів медичного призначення за дії похідних (1'-адамантил)-1R-бензолу.

Дослідження антимікробної дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу, нанесених на медичну сітку для відновлювальної хірургії проводили згідно з [170, 171]. В експериментах використані фрагменти стерильних медичних сіток з поліпропілену PPM 601 (6 × 11) см (ТОВ «OPUSMED») площею 1,0 см², які поміщали на інокульоване мікроорганізмами агаризоване поживне середовище та наносили розчини сполук (100 мкг/фрагмент сітки та 300 мкг/фрагмент сітки, враховуючи чутливість *P. aeruginosa* 449) чи АМП ципрофлоксацину (5 мкг/ фрагмент сітки). Представник групи фторхінолонів виявляє широкий спектр антимікробної дії (окрім грибів *C. albicans*), пригнічує ріст та розмноження грампозитивних та грамнегативних бактерій.

Отримані результати наведено у табл. 3.7.

Таблиця 3.7

Антимікробна активність похідних (1'-адамантил)-1R-бензолу, нанесених на засіб медичного призначення

Сполуки/ препарати		Діаметри зон затримки росту, мм				
		1 доба	2 доба	3 доба	4 доба	5 доба
1		2	3	4	5	6
<i>S. aureus</i> ATCC 25923						
АМ-166		21,0 ± 0,6	10,0 ± 0	0	—	—
КВМ-97		20,5 ± 0,5	15,0 ± 0	10,0 ± 0	0	—
Ципрофлоксацин		30,0 ± 0	0	—	—	—
<i>S. aureus</i> ATCC 43300						
АМ-166		20,0 ± 0	10,0 ± 0	0	—	—
КВМ-97		20,5 ± 0,3	10,5 ± 0,3	10,0 ± 0	0	—
Ципрофлоксацин		30,0 ± 0	0	—	—	—
<i>C. albicans</i> 1486						
АМ-166		29,0 ± 0,6*	21,3 ± 1,1*	13,0 ± 0*	0	—
КВМ-97		28,0 ± 0*	17,5 ± 0,3*	8,8 ± 0,9*	0	—
Ципрофлоксацин		—	—	—	—	—
<i>E. coli</i> 311						
АМ-166		14,5 ± 0,5*	0	—	—	—
КВМ-97		15,0 ± 0*	0	—	—	—
Ципрофлоксацин		50,0 ± 0*	10,5 ± 0,3*	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i> 449						
АМ-166	100,0	10,0 ± 0*	0	—	—	—
	300,0	11,8 ± 0,5*	0	—	—	—
КВМ-97	100,0	10,0 ± 0*	0	—	—	—
	300,0	12,5 ± 0,3 *	0	—	—	—
Ципрофлоксацин		34,0 ± 0*	0	—	—	—
Мікст-культура (<i>P. aeruginosa</i> 449 + <i>E. coli</i> 311 + <i>C. albicans</i> 1486)						
АМ-166		10,0 ± 0	0	—	—	—

Продовж. табл. 3.7

1	2	3	4	5	6
КВМ-97	10,0 ± 0	0	–	–	–
Ципрофлоксацин	31,5 ± 0,5*	0	–	–	–

Примітки:

1. «*» – зона затримки росту зберігається впродовж 7 діб;
2. «0» – зона затримки росту відсутня;
3. «–» – дослідження не проводили;
4. Розмір вибірки: n = 6.

Встановлено (табл. 3.7), що сполуки КВМ-97 та АМ-166 при нанесенні на поліпропіленову сітку виявляють найбільш виразну антимікробну активність щодо штамів грампозитивних бактерій та дріжджоподібних грибів роду *Candida*. Антибактеріальна дія сполуки АМ-166 щодо чутливого до АМП тест-штаму *S. aureus* ATCC 25923 та метицилін-резистентного *S. aureus* ATCC 43300 зберігається впродовж 2 діб, хоча і відмічено зниження її активності. Так, діаметри зон затримки росту мікроорганізмів на 1 добу становлять від 20,0 мм до 21,0 мм, на 2 добу – 10,0 мм, на 3 добу експерименту антибактеріальна активність АМ-166 відсутня.

Результати проведених експериментів показали, що антистафілококова дія сполуки КВМ-97 зберігається протягом 3 діб, вираженість антибактеріальної активності зменшується зі збільшенням терміну спостереження (1 доба – 20,5 мм, 3 доба – 10,0 мм). Встановлено, що за тривалістю інгібувального ефекту похідні (1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та КВМ-97 переважають ципрофлоксацин (антибактеріальна активність відмічена лише на першу добу).

При дослідженні антифунгальних властивостей досліджуваних сполук використано клінічний тест-штам *C. albicans* 1486, резистентний до дії азолів (флуконазолу, кетоконазолу, клотримазолу) та тербінафіну. Згідно з отриманими даними (табл. 3.7), адамантанвімісні сполуки АМ-166 та КВМ-97 виявляють виразний антифунгальний ефект протягом перших 2 діб (діаметри зон затримки росту в межах від 17,5 мм до 29,0 мм). Пригнічення росту також реєструється і на 3 день експерименту.

При дослідження здатності сполук пригнічувати ріст та розмноження грамнегативних бактерій *E. coli* 311 та *P. aeruginosa* 449 встановлено (табл. 3.7), що за антибактеріальною активністю речовини поступаються такому щодо грампозитивних. Тривалість інгібувальної активності АМ-166 та КВМ-97 – 1 доба (діаметри зон затримки росту в межах від 10,0 мм до 15,0 мм). Подібний ефект сполуки виявляють і щодо мікст-культури (*P. aeruginosa* 449 + *E. coli* 311 + *C. albicans* 1486). Тривалість антибактеріального ефекту препарату порівняння ципрофлоксацину становила 1 добу, проте за вираженістю інгібувальної дії ципрофлоксацин переважав досліджувані сполуки.

Таким чином, проведені дослідження показали, що похідні (1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та КВМ-97, нанесені на поліпропіленову хірургічну сітку, виявляють більш виразну активність щодо монокультур грампозитивних бактерій, порівняно з мікробною асоціацією, що пояснюється спектром їх дії та можливо наявністю метаболітів у складі мікст-культури. Найбільш тривалий ефект спостерігається за впливу на гриби роду *Candida* зі зниженою чутливістю до антифунгальних засобів.

Висновки до розділу 3

1. Таким чином, похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та КВМ-97 виявляють антибіоплівкову активність щодо представників грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів на ранніх етапах формування біоплівки, про що свідчить як вплив на біомасу біоплівки, так і на її життєздатність. Порушення перших етапів плівкоутворення обумовлене впливом сполук на гідрофобність бактеріальних клітин та міграцію грамнегативних мікроорганізмів.

2. Похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу не запобігають утворенню метаболічно неактивних клітин *S. aureus* та *P. aeruginosa*, а також здатні зменшувати або запобігати формуванню персистерів *E. coli*. Сполуки виявляють антимікробну активність щодо клітин-персистерів *P. aeruginosa*.

3. Встановлено, що адамантанвмісні сполуки виявляють антиадгезивні властивості в експериментах *in vivo*, запобігаючи контамінації ранової поверхні, та антимікробну активність щодо представників грампозитивних, грамнегативних мікроорганізмів та дріжджоподібних грибів за умови нанесення розчинів сполук на сітку для відновлювальної хірургії.

4. Отримані дані свідчать про перспективність проведення подальших поглиблених досліджень антибіоплівкової активності сполук з адамантильним радикалом в експериментах *in vivo* та встановлення їх фармакокінетичних властивостей для оцінки доцільності створення на їх основі ефективних та безпечних антимікробних препаратів.

Матеріали даного розділу представлені у наступних публікаціях:

1. Антибактеріальна активність амінопропанолів з адамантильним і N-алкіларильним радикалом відносно біоплівок *E. coli* / Дудікова Д. М., Вринчану Н. О., Короткий Ю. В., Дронова М. Л., Суворова З. С., Шарова А. О., Гринчук Н. І., Недашківська В. В. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2017. № 6. С. 37–42. (Особистий внесок – брала участь у дослідженнях, обробці, узагальненні результатів та підготовці тексту статті до публікації).

2. Біоплівки. Сучасний стан та перспективи антимікробної терапії / Вринчану Н. О., Дудікова Д. М., Гринчук Н. І., Недашківська В. В. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2019. № 5. С. 311–321. <https://doi.org/10.33250.13.05.311>. (Особистий внесок – аналіз літературних джерел та підготовка тексту статті до публікації).

3. Antibiofilm effect of adamantane derivative against *Staphylococcus aureus* / Hrynychuk N. I., Vrynchanu N. O., Buchtyarova T. A., Dudikova D. M., Korotkyi Yu. V., Bondarenko L. B. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*. 2021. Vol. 83, № 1. P. 58–67. <https://doi.org/10.15407/microbiolj83.01.058> (Scopus, Q4). (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, проведення експериментів, аналіз результатів та підготовка тексту статті до публікації).

4. Гринчук Н. І., Бойко І. О., Вринчану Н. О. Антибіоплівкова дія ципрофлоксацину щодо *Pseudomonas aeruginosa*. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. Т. 15, № 2. С. 82–91. <https://doi.org/10.33250/15.02.082>. (Особистий внесок – брала участь у дослідженнях, аналізі та обговоренні результатів, підготовці тексту статті до публікації).

5. Anti-adhesion properties of 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl) benzole against *Escherichia coli* / Hrynychuk N., Bukhtiarova T., Vrychanu N., Ishchenko L., Vazhnichay E. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. Т. 15, № 6. С. 380–393. <https://doi.org/10.33250/15.06.380>. (Особистий внесок – брала участь у аналізі літературних джерел, проведенні досліджень, аналізі та обговоренні результатів, підготовці тексту статті до публікації).

6. Antibiofilm activity of 4-(adamantyl-1) -1- (1-aminobutyl) benzol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Hrynychuk N., Zelena L., Bukhtiarova T., Vrychanu N, Ishchenko L., Vazhnichaya E. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*. 2022. Vol. 84, № 3. С. 39–50. <https://doi.org/10.15407/microbiolj84.03.039> (Scopus, Q4). (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, проведення досліджень, аналіз результатів та підготовка тексту статті до публікації).

7. Гуменюк Н. І., Вринчану Н. О., Іщенко Л. М. Вплив похідного адамантану на експресію генів плівкоутворення *P. aeruginosa*. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2023. Т. 17, № 1. С. 44–52. <https://doi.org/10.33250/17.01.044>. (Особистий внесок – брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів, підготовці тексту статті до публікації).

8. КПКВ-6561040 Похідне адамантану (ПА) 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензилдиметиламіно)-2-пропанолу хлорид для профілактики інфікування ран та формування біоплівки / Вринчану Н. О., Гринчук Н. І., Недашківська В. В., Бойко І. О. Інформаційний Бюлетень. Київ. 2021. Випуск 51. С. 162–163.

9. Гринчук Н. І. Вплив азитроміцину на адгезивні властивості *Staphylococcus aureus*. Мат. Буковинського міжнар. медико-фармацевтичного

конгресу студентів і молодих учених, ВІМСО – 2018, м. Чернівці, 4 – 6 квітня 2018 р. Чернівці, 2018. С. 408.

10. Dudikova D, Hrynychuk N, Vrynchanu N. Influence of KVM-97 on cell surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. 4th International conference of cell biology, Krakow, May 11–12, 2018. Krakow, Poland, 2018. P. 71.

11. Отримання клітин-персистерів *Pseudomonas aeruginosa* / Гринчук Н. І. Дудікова Д. М., Суворова З. С., Вринчану Н. О. Мат. Наукової конференції присвяченій 100-річчю кафедри мікробіології, вірусології та імунології «Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології», м. Київ, 5 листопада 2019 р. Київ, 2019. С. 44–45.

12. Гринчук Н. І., Вринчану Н. О., Дудікова Д. М. Формування персистерів *Escherichia coli* за дії сполуки з адамантильним радикалом. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в сучасній клінічній і лабораторній медицині: матеріали дистанційної наук.-практ. конф., м. Харків, 19 березня 2020 р. Х. : НФаУ, 2020. С. 27.

13. Influence of adamantane derivative on the formation of *Pseudomonas aeruginosa* persisters / Humeniuk N, Boiko I, Nedashkivska V, Vrynchanu N, Vazhnichaya E, Korotkij Yu. “Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology”: materials of IV Scientific and practical Conference of young researchers, Kyiv, November 15–17, 2022. Kyiv, Ukraine. 2022. P. 10.

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ ПОХІДНИХ 4-(1'-АДАМАНТИЛ)-1R-БЕНЗОЛУ НА СФОРМОВАНІ БІОПЛІВКИ ГРАМПОЗИТИВНИХ ТА ГРАМНЕГАТИВНИХ БАКТЕРІЙ

4.1 Чутливість сформованих біоплівок бактерій до дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Бактеріальні клітини у сформованих біоплівках, порівняно з планктонними, є менш чутливими до АМП. Резистентність біоплівки до дії антимікробних засобів зумовлена багатьма факторами, включаючи наявність позаклітинного матриксу, що перешкоджає проникненню АМП всередину мікробних спільнот та досягненню їх ефективних концентрацій [58, 240, 241], наявність систем QS [58, 240, 241], формування персистерів [58], відмінності у метаболічній активності клітин у різних кластерах біоплівки та швидкість росту [58, 242]. Ці особливості надають значну перевагу мікроорганізмам – виживати за дії АМП, що призводить до розвитку хронічних рецидивуючих інфекцій. Тому здатність нових досліджуваних сполук не лише запобігати плівкоутворенню, але і руйнувати сформовані біоплівки є ключовою стратегією при розробці нового антимікробного засобу з антибіоплівковою активністю для застосування у пацієнтів з хронічними інфекціями.

На наступному етапі досліджень оцінювали здатність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу впливати на сформовані біоплівки грампозитивних (*S. aureus*) та грамнегативних (*E. coli*, *P. aeruginosa*) бактерій. Дію сполук та препаратів щодо 2-добових біоплівок *S. aureus* та 5-добових біоплівок, сформованих *E. coli* та *P. aeruginosa*, вивчали у межах концентрацій від 0,15 МІК до 5,0 МІК. Вибір широкого діапазону концентрацій зумовлена різними ефектами, що спостерігаються за впливу субінгібуючих концентрацій, та концентрацій, що виявляють пригнічуючий вплив на планктонні клітини бактерій [219–222, 242].

Також у дослідженні враховано термін, протягом якого формується зріла біоплівка: *S. aureus* – 2 доби [243], *E. coli*, *P. aeruginosa* – 5 діб [244, 245].

Отримані результати щодо впливу досліджуваних речовин на 2-добові біоплівки, сформовані метицилін-резистентним *S. aureus* 222, наведено на рис. 4.1.

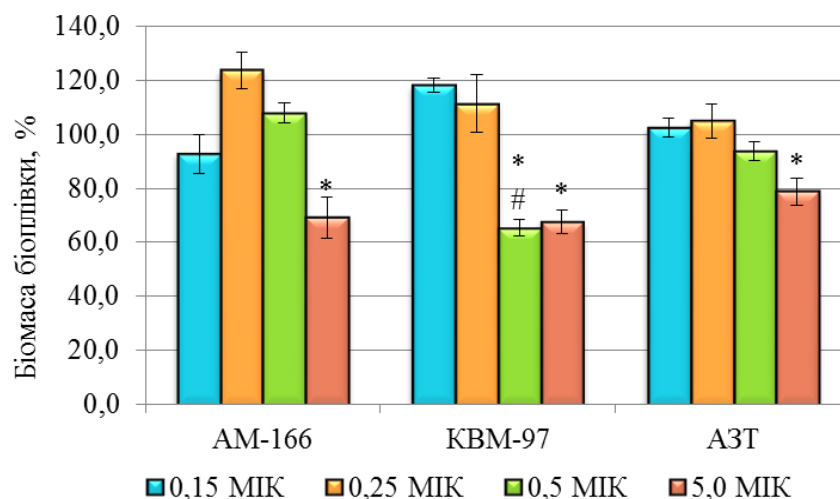


Рис. 4.1 Чутливість 2-добової біоплівки *S. aureus* 222 до дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «АЗТ» – азитроміцин;
3. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
4. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації азитроміцину ($p < 0,05$);
5. Розмір вибірки: $n = 6$.

Встановлено (рис. 4.1), що сполука АМ-166 у концентрації 5,0 МІК здатна руйнувати дводобові біоплівки, сформовані метицилін-резистентним *S. aureus* 222 (зменшення біомаси на 30,9 %, $p < 0,05$).

За дії АМ-166 у субінгібуючих концентраціях статистично достовірних змін у біомасі біоплівок порівняно з контролем не виявлено ($p > 0,05$). Сполука КВМ-97 при 0,5 МІК та 5,0 МІК зумовлює зменшення біомаси біоплівки у межах від 34,5 % до 32,4 %. Встановлено, що антибіоплівкова активність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та КВМ-97 у концентрації

5,0 МІК подібна до такої азитроміцину, а КВМ-97 при 0,5 МІК переважає дію макролідного АМП.

За впливу антимікробних засобів може спостерігатися не лише зміна біомаси біоплівки, але й зміна морфології клітин мікроорганізмів та кількості життєздатних бактерій [246–249], тому на наступному етапі визначали кількість метаболічно активних клітин *S. aureus* 222 у складі сформованих 2-добових біоплівках за дії досліджуваних сполук. Експерименти проводили з використанням окисно-відновного індикатора резазурину [160, 161]. Результати досліджень наведено на рис. 4.2.

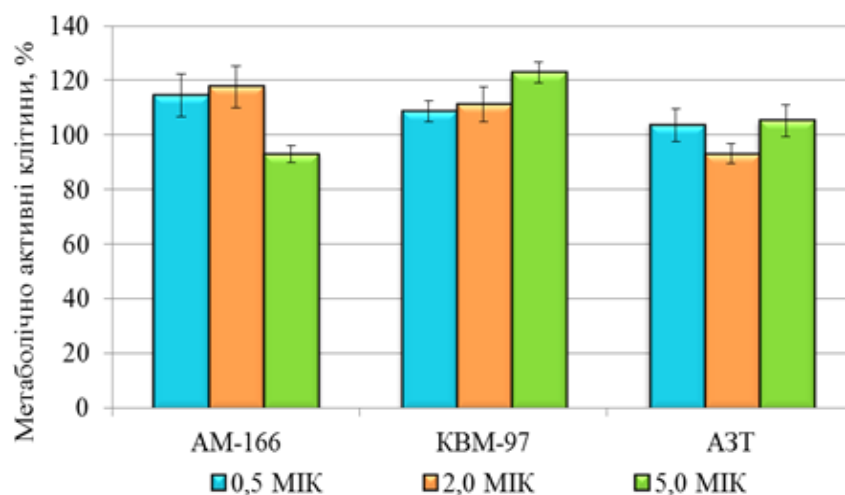


Рис. 4.2 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на життєздатність 2-добових біоплівок *S. aureus* 222

Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «АЗТ» – азитроміцин;
3. Розмір вибірки: $n = 3$.

Отримані дані (рис. 4.2) свідчать, що досліджувані сполуки АМ-166 та КВМ-97 не впливають на кількість метаболічно активних клітин *S. aureus* 222 у складі сформованої біоплівки. За їх дії, як і препарату порівняння азитроміцину, достовірних змін порівняно з контролем не зареєстровано ($p > 0,05$). Хоча спостерігається незначне їх зменшення (на 6,9 %) за впливу АМ-166 при 5,0 МІК та азитроміцину при 2,0 МІК.

На наступному етапі дослідження оцінено життєздатність клітин *S. aureus* 222 у складі 2-добових біоплівки з використанням специфічних барвників для живих (акридиновий оранжевий) та нежиттєздатних (пропідій йодид) клітин за допомогою флуоресцентної мікроскопії згідно з [162, 163]. Концентрація сполук складала 5,0 МІК. Візуалізацію живих та мертвих клітин здійснювали за допомогою флуоресцентного мікроскопа Olympus BX41. Отримані дані наведено на рис. 4.3.

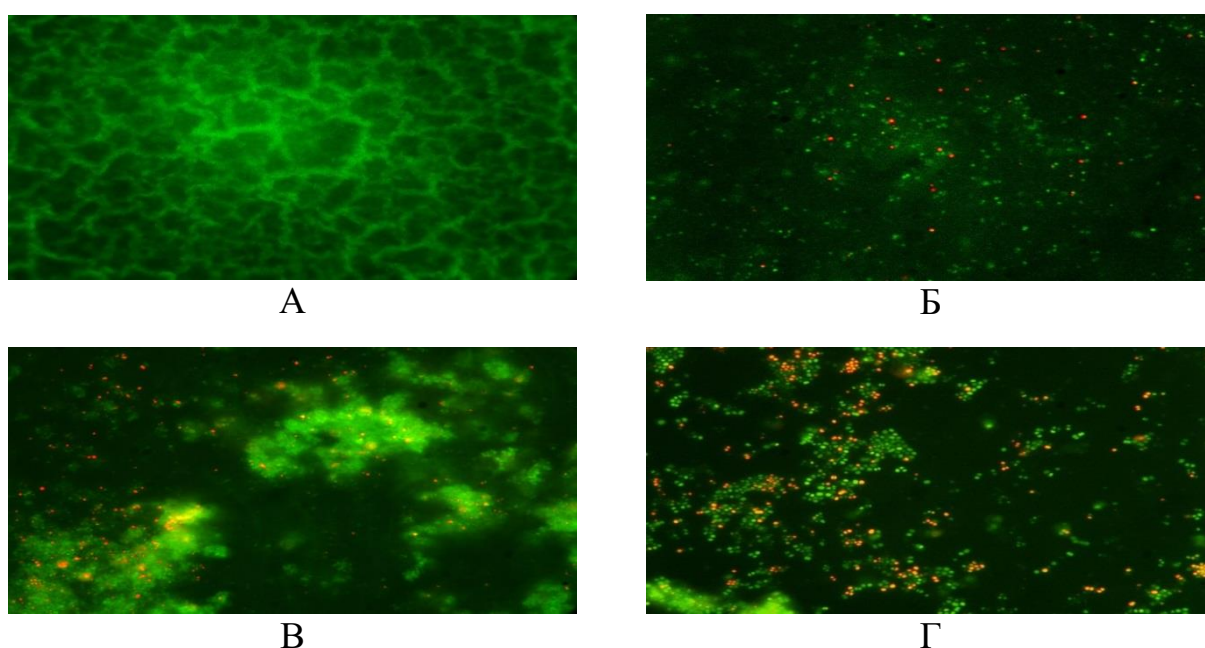


Рис. 4.3 Життєздатність клітин 2-добової біоплівки *S. aureus* 222 за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу: А – контроль культури, Б – АМ-166, В – КВМ-97, Г – азитроміцин

Примітки:

1. Флуоресцентна мікроскопія, збільшення: $\times 1000$;
2. «зелене забарвлення» – живі клітини, «червоне забарвлення» – нежиттєздатні клітини.

Результати мікроскопії (рис. 4.3) свідчать, що клітини у контролі формували щільний шар зеленого кольору, тобто були життєздатними. При додаванні сполук та азитроміцину спостерігались окремі бактеріальні скупчення та візуально збільшувалась кількість клітин, що мали забарвлення від жовто-помаранчевого до червоного, тобто були нежиттєздатними.

Отриманий ефект може бути пов'язаний з мембранотропними властивостями адамантанвмісних сполук [150, 151].

Таким чином, за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на 2-добові біоплівки *S. aureus* 222 відмічено зменшення біомаси (АМ-166 у концентрації 5,0 МІК, КВМ-97 – 0,5 МІК та 5,0 МІК) та появу нежиттєздатних клітин у їх складі. Антибіоплівкова дія АМ-166 та КВМ-97 на сформовані біоплівки бактерій може бути обумовлена пригніченням міжклітинної агрегації за рахунок змін гідрофобності бактеріальної поверхні, посиленням формування АФК та зв'язування з еДНК, що призводить до руйнування сформованих біоплівок, що потребує детального вивчення [250, 251].

Отримані дані щодо здатності сполук та АМП впливати на 5-добові біоплівки кишкової палички наведені на рис. 4.4.

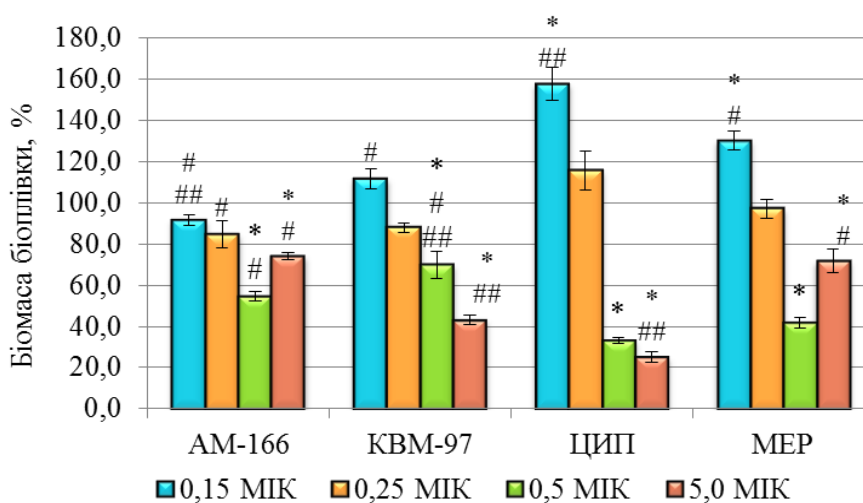


Рис. 4.4 Чутливість 5-добової біоплівки *E. coli* 311 до дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «ЦИП» – ципрофлоксацин; «МЕР» – меропенем;
3. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
4. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації ципрофлоксацину ($p < 0,05$);
5. «##» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації меропенему ($p < 0,05$);
6. Розмір вибірки: $n = 6$.

Результати проведених експериментів свідчать (рис. 4.4), що АМ-166 та КВМ-97 у концентраціях 0,5 МІК та 5,0 МІК зменшують біомасу біоплівки *E. coli* 311 (у межах від 25,9 % до 56,8 %). За дії сполук у нижчих концентраціях статистично достовірних змін порівняно з контролем не виявлено. Відмічено, що ципрофлоксацин за дії 0,25 МІК та 0,15 МІК збільшує біомасу на 15,5 % та 57,9 %, та меропенем – на 30,3 % при 0,15 МІК. Досліджувана сполука АМ-166 за антибіоплівковою дією (0,5 МІК та 5,0 МІК) подібна до меропенему та поступаються такій ципрофлоксацину. КВМ-97 при 5,0 МІК наближається до дії фторхінолонового АМП та переважає активність меропенему.

Отримані результати щодо визначення кількості метаболічно активних клітин *E. coli* 311 у 5-добових біоплівках за дії сполук та АМП (0,5 МІК, 2,0 МІК та 5,0 МІК) наведено на рис. 4.5.

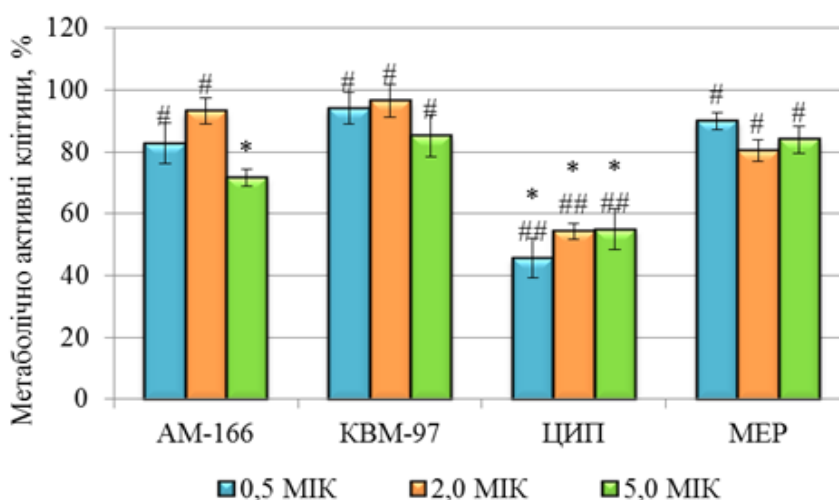


Рис. 4.5 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на життєздатність клітин *E. coli* 311 у складі 5-добових біоплівки

Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «ЦИП» – ципрофлоксацин; «МЕР» – меропенем;
3. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
4. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації ципрофлоксацину ($p < 0,05$);
5. «##» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації меропенему ($p < 0,05$);
6. Розмір вибірки: $n = 3$.

Встановлено (рис. 4.5), що сполука АМ-166 за дії у концентрації 5,0 МІК зменшує кількість метаболічно активних клітин у 5-добових біоплівках *E. coli* 311 на 28,2 % та за вираженістю ефекту не поступається препарату порівняння ципрофлоксацину ($p > 0,05$). Сполука КВМ-97 в усіх досліджених концентраціях не впливає на життєздатність *E. coli* 311 у сформованій біоплівці.

За допомогою флуоресцентної мікроскопії оцінено життєздатність клітин *E. coli* 311 у складі 5-добової біоплівки за дії досліджуваних речовин у концентрації 5,0 МІК. Отримані дані наведено на рис. 4.6.

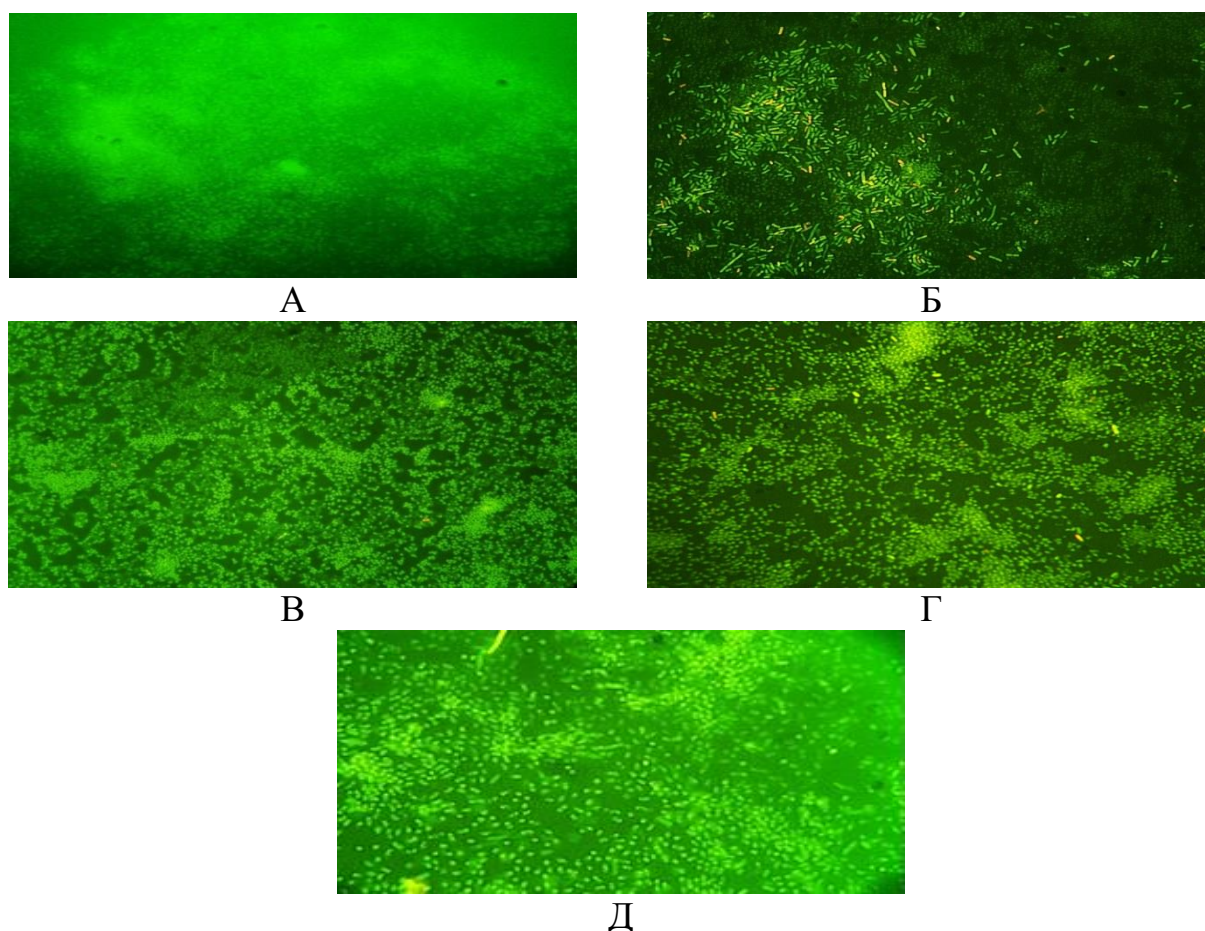


Рис. 4.6 Життєздатність клітин 5-добової біоплівки *E. coli* 311 за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу: А – контроль культури, Б – АМ-166, В – КВМ-97, Г – меропенем, Д – ципрофлоксацин

Примітки:

1. Флуоресцентна мікроскопія, збільшення $\times 1000$;
2. «зелене забарвлення» – живі клітини, «червоне забарвлення» – нежиттєздатні клітини.

Результати дослідження (рис. 4.6 А) показали, що у контролі клітини були життєздатними. Візуально спостерігався поверхневий прозорий шар (імовірноше, матрикс), який був менш виражений за впливу сполук та препаратів порівняння. Встановлено (рис. 4.6 Б), що за дії АМ-166 спостерігається поява нежиттєздатних клітин та відмічено морфологічні зміни у клітинах верхнього шару (більш видовжена форма). Сполука КВМ-97 та препарати порівняння (ципрофлоксацин, меропенем) (рис. 4.6 В – Д) спричиняли менш виразні зміни.

Таким чином, досліджувані сполуки обумовлюють деструкцію біоплівки, сформованих грамнегативними бактеріями *E. coli* 311, за їх впливу (0,5 МІК та 5,0 МІК) відмічено зменшення біомаси біоплівки та кількості життєздатних бактеріальних клітин (АМ-166 при 5,0 МІК). Пригнічення життєздатності може бути пов'язано зі зменшенням біомаси, формуванням персистерів, а вплив на біомасу біоплівки – взаємодією сполук з позаклітинними структурними компонентами матриксу, активацією АФК, що призводить до руйнування мікробних спільнот. Подібну активність виявляє ципрофлоксацин, що може бути пов'язано із його проникністю через матрикс біоплівки та механізмом дії на планктонні клітини бактерій (пригнічення синтезу нуклеїнових кислот).

Раніше співробітниками лабораторії фармакології протимікробних засобів було виявлено, що сполука КВМ-97 (0,5 МІК та 5,0 МІК) зумовлює деструкцію 1-добової та 5-добової біоплівки *P. aeruginosa* 449 [151, 225]. Враховуючи, що речовини різних хімічних груп у субінгібуючих концентраціях можуть впливати на біоплівки бактерій [252–254], нами був розширений діапазон досліджуваних субінгібуючих концентрацій (додано 0,15 МІК та 0,25 МІК) та оцінено чутливість 5-добової біоплівки *P. aeruginosa* 449 до дії адамантанвмісних сполук. Результати проведених експериментів наведено на рис. 4.7.

Встановлено (рис. 4.7), що сполука АМ-166 в усіх досліджених концентраціях спричиняє деструкцію сформованої біоплівки *P. aeruginosa* 449: біомаса знижується у межах від 36,6 % до 46,2 %. У дослідженні не виявлено

достовірних відмінностей у вираженості ефекту при застосуванні сполуки у різних концентраціях ($p > 0,05$). Адамантанвмісна сполука KBM-97 зменшує біомасу біоплівки *P. aeruginosa* 449 при 0,5 МІК на 24,3 %, при 5,0 МІК – на 80,1 %. За дії у концентрації 0,15 МІК відмічено збільшення біомаси біоплівки синьогнійної палички на 21,5 %.

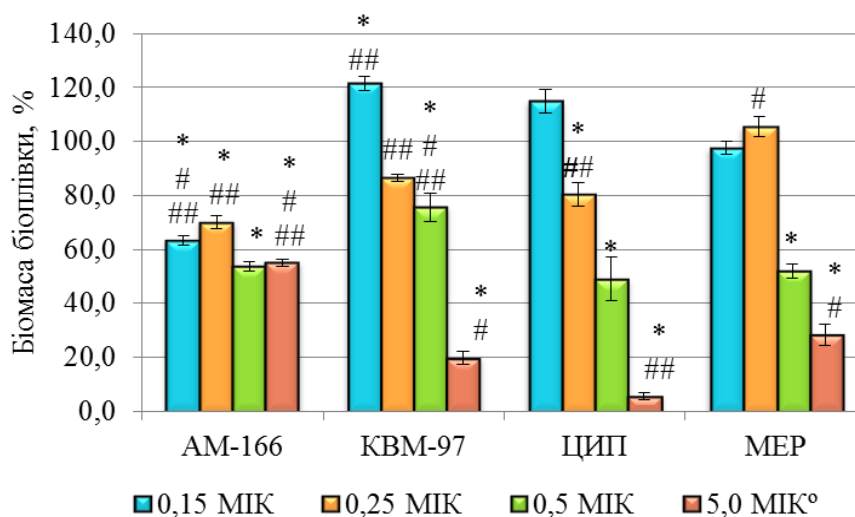


Рис. 4.7 Чутливість 5-добової біоплівки *P. aeruginosa* 449 до дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «ЦІП» – ципрофлоксацин; «МЕР» – меропенем;
3. «°» – максимальна досліджувана концентрація сполуки АМ-166 становить 2,0 МІК;
4. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
5. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації ципрофлоксацину ($p < 0,05$);
6. «##» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації меропенему ($p < 0,05$);
7. Розмір вибірки: $n = 6$.

Аналіз отриманих результатів свідчить, що АМ-166 (0,15 МІК, 0,25 МІК, 0,5 МІК) наближається або переважає дію ципрофлоксацину та меропенему, при 5,0 МІК – поступається активності АМП. Дія KBM-97 щодо біоплівок, сформованих *P. aeruginosa* 449, є подібною до такої ципрофлоксацину, проте антибіоплівковий ефект (0,5 МІК та 5,0 МІК) є менш виразним. За впливу

ципрофлуксацину (у межах концентрацій від 0,25 МІК до 5,0 МІК) та меропенему (0,5 МІК та 5,0 МІК) спостерігається зменшення біомаси біоплівки *P. aeruginosa* 449 (у межах від 48,0 % до 94,4 %).

Життєздатність клітин *P. aeruginosa* 449 у 5-добових біоплівках за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу досліджено кількісно з використанням барвника резазурину та за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Результати відображено на рис. 4.8 – 4.9.

Встановлено (рис. 4.8), що кількість метаболічно активних клітин *P. aeruginosa* 449 у складі 5-добової біоплівки після її деструкції АМ-166 (0,5 МІК та 2,0 МІК) зменшується в межах від 64,3 % до 81,0 %.

За дії KBM-97 у концентраціях 2,0 МІК та 5,0 МІК кількість метаболічно активних клітин зменшується на 69,0 % та 42,8 %, відповідно. У концентрації 2,0 МІК сполука KBM-97 не поступається дії АМП.

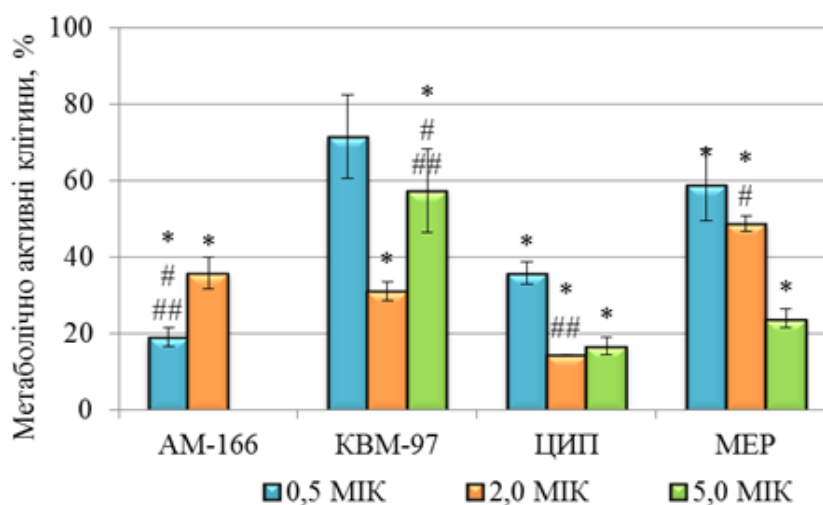


Рис. 4.8 Життєздатність клітин *P. aeruginosa* 449 у складі 5-добових біоплівок за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «ЦИП» – ципрофлуксацин; «МЕР» – меропенем;
3. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
4. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації ципрофлуксацину ($p < 0,05$);
5. «###» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації меропенему ($p < 0,05$);
6. Розмір вибірки: $n = 3$.

Відмічено, що як ципрофлоксацин, так і меропенем пригнічують життєздатність клітин *P. aeruginosa* 449 у складі сформованих біоплівок.

Результати дослідження життєздатності клітин у складі 5-добової біоплівки *P. aeruginosa* 449, отримані з використанням флуоресцентних барвників, свідчать (рис. 4.9), що клітини синьогнійної палички у контролі були життєздатними та формували рівномірний щільний шар.

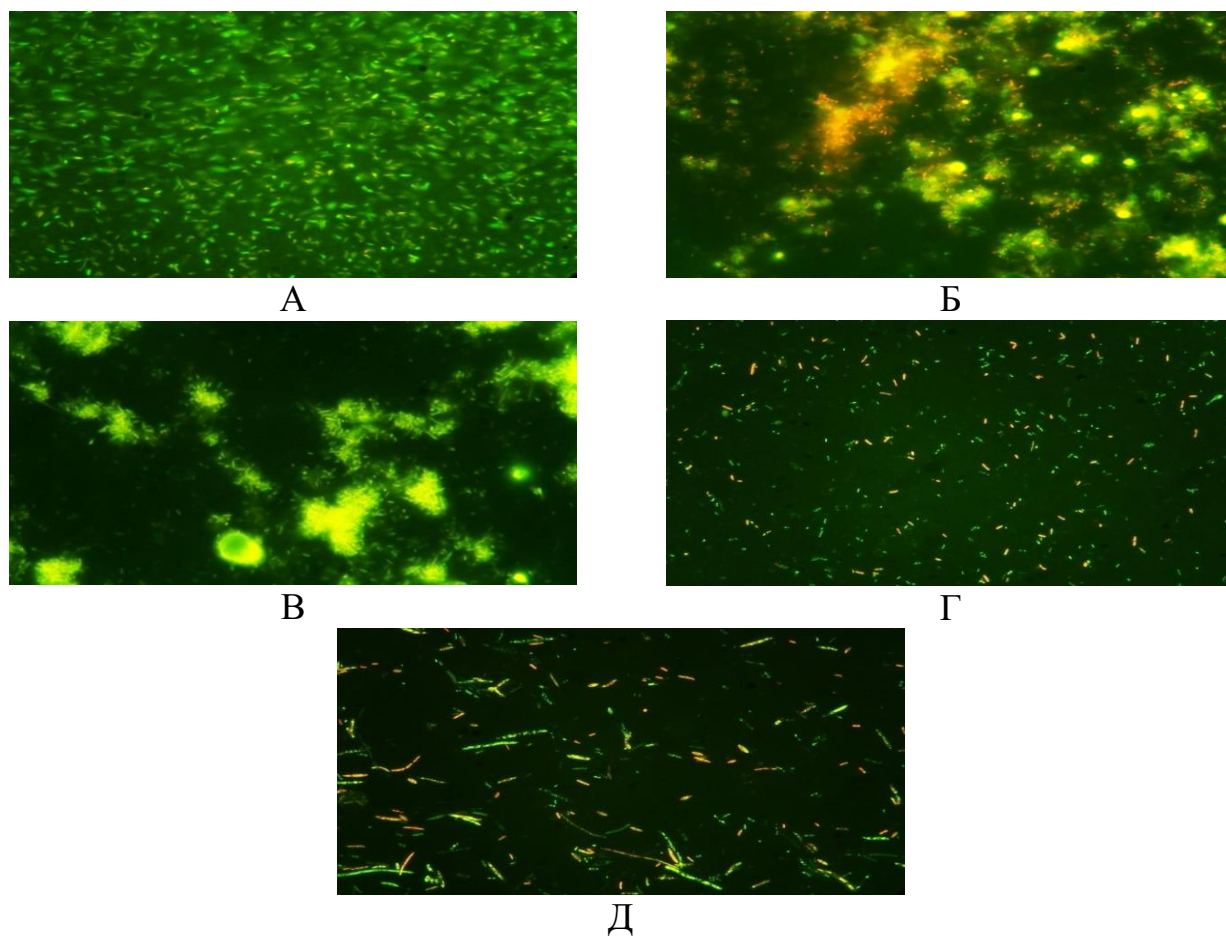


Рис. 4.9 Життєздатність клітин 5-добової біоплівки *P. aeruginosa* 449 за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу: А – контроль культури; Б – АМ-166, В – КВМ-97; Г – меропенем; Д – ципрофлоксацин

Примітки:

1. Флуоресцентна мікроскопія, збільшення $\times 1000$;
2. «зелене забарвлення» – живі клітини, «червоне забарвлення» – нежиттєздатні клітини.

Встановлено (рис. 4.9), що за дії сполуки АМ-166 (2,0 МІК) та АМП (5,0 МІК) спостерігалась поява нежиттєздатних клітин. Ципрофлоксацин обумовлював зміни у морфології клітин (більш видовжена форма порівняно з контролем).

Таким чином, похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та КВМ-97 виявляють антибіоплівкову дію та пригнічують життєздатність клітин у сформованих біоплівках *P. aeruginosa* 449. Вираженість ефекту АМ-166 не залежить від концентрації. Виявлений антибіоплівковий ефект може бути пов'язаний з впливом на компоненти матриксу (полісахариди, білки, еДНК), підвищенням рівня АФК [254, 255] та мембранотропними властивостями адамантанвмісних сполук [150, 151], що призведе до порушення структури біоплівки та зменшення кількості життєздатних клітин у її складі.

4.2 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на продукцію компонентів позаклітинного матриксу біоплівок

Після прикріплення клітин мікроорганізмів до поверхні субстрату починається синтез компонентів позаклітинного матриксу, який захищає бактерії від негативного впливу зовнішнього середовища, у тому числі дії АМП та імунної системи макроорганізму [256, 257]. Тому порушення синтезу компонентів матриксу та зниження вмісту білків та полісахаридів у його складі може розглядатися як перспективний механізм дії антимікробних засобів з антибіоплівковою активністю.

Вивчення впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на компоненти матриксу біоплівок S. aureus.

Основними структурними компонентами матриксу стафілококових біоплівок є полісахаридний міжклітинний адгезин (PIA, polysaccharide intercellular adhesin), позаклітинна ДНК (еДНК), білки (Aap, Spa, Embp, SasG), амілоїдні (білково-полісахаридні) агрегати (білок Var) [4, 258, 259].

Отримані дані щодо впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу та азитроміцину (0,5 МІК) на вміст компонентів матриксу наведено на рис. 4.10.

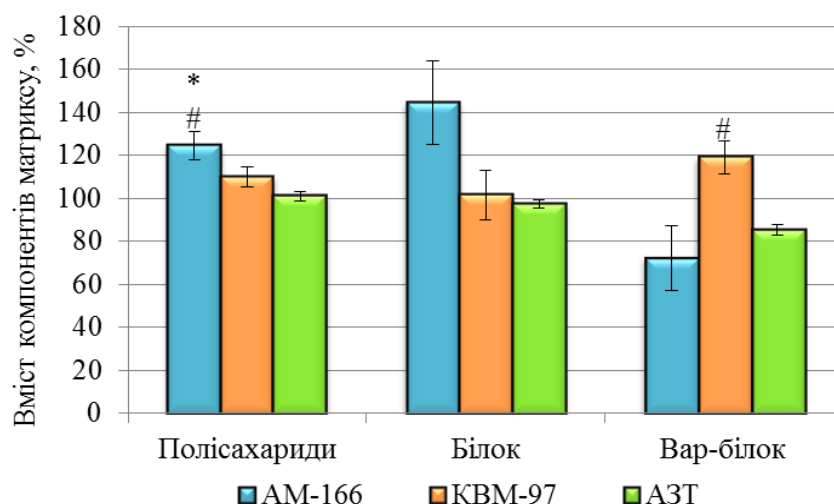


Рис. 4.10 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на компоненти матриксу біоплівки *S. aureus* 222

Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «АЗТ» – азитроміцин;
3. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
4. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації азитроміцину ($p < 0,05$);
5. Розмір вибірки: $n = 3$ при визначенні загального білка, $n = 6$ при визначенні полісахаридів та Вар-білка.

Результати дослідження (рис. 4.10) свідчать, що за дії сполук AM-166 та KBM-97 відмічено збільшення продукції полісахаридів *S. aureus* 222 (в межах від 10,0 % до 24,5 %), білка (на 44,6 % за дії AM-166) та Вар-білка (на 19,0 % за впливу KBM-97). Адамантанвмісна сполука AM-166 призводить до зменшення кількості Вар-білка.

Таким чином, похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу впливають на вміст компонентів матриксу стафілококових біоплівок, проте виявлені зміни статистично не достовірні порівняно з контролем ($p > 0,05$), окрім дії AM-166 на вміст полісахаридів. Посилення продукції компонентів матриксу *S. aureus*

може бути обумовлено захисною реакцією бактерій на дію досліджуваних сполук у субінгібуючій концентрації.

Вивчення впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на компоненти матриксу біоплівки E. coli.

Ключовими компонентами матриксу біоплівки кишкової палички, які забезпечують дозрівання та структурну стійкість мікробних угруповань, є: транспортні білки – антиген 43 (*Ag43*), *AidA* та *TibA*, які сприяють агрегації бактерій; целюлоза, полі- β -1,6-N-ацетил-глюкозамін (β -1,6-GlcNAc) та коланова кислота [56, 260].

Отримані результати впливу АМ-166 та КВМ-97 (0,5 МІК) на синтез компонентів матриксу біоплівки *E. coli* 311 наведено на рис. 4.11.

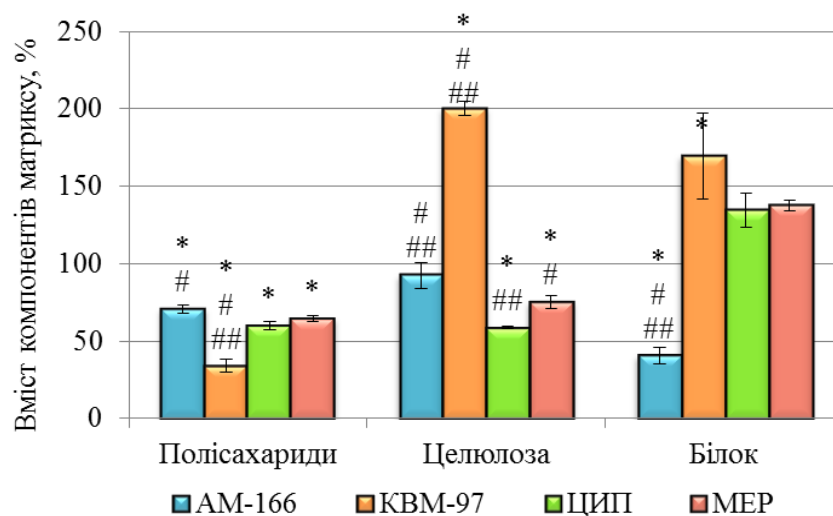


Рис. 4.11 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на компоненти матриксу біоплівки *E. coli* 311

Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «ЦИП» – ципрофлоксацин; «МЕР» – меропенем;
3. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
4. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації ципрофлоксацину ($p < 0,05$);
5. «##» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації меропенему ($p < 0,05$);
6. Розмір вибірки: $n = 12$ при визначенні полісахаридів, $n = 3$ при визначенні целюлози та загального білка.

Встановлено (рис. 4.11), що АМ-166 та КВМ-97 пригнічують синтез полісахаридів клітинами *E. coli* 311, за дії сполук їх вміст зменшується в межах від 29,3 % до 66,0 %. За виявленою активністю похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу переважають (КВМ-97) або не поступаються (АМ-166) ципрофлоксацину (зменшення кількості полісахаридів на 39,9 %) та меропенему (на 35,3 %). Встановлено, що сполука АМ-166 не виявляє вірогідної інгібувальної активності на синтез целюлози *E. coli* 311, КВМ-97 – збільшує її кількість у 2 рази порівняно з контролем.

Отримані результати свідчать (рис. 4.11), що сполуки АМ-166 та КВМ-97 здатні як зменшувати (на 59,3 % за дії АМ-166), так і збільшувати (на 69,5 % за дії КВМ-97) кількість білка. Сполука АМ-166 за своєю активністю переважає дію досліджуваних АМП ($p < 0,05$).

Таким чином, отримані результати щодо впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на компоненти матриксу біоплівки кишкової палички свідчать, що сполуки виявляють інгібувальний ефект на продукцію білка та полісахаридів *E. coli* 311, окрім КВМ-97 щодо кількості білка. За дії КВМ-97 навпаки відмічено збільшення вмісту білка та целюлози у матриксі біоплівки кишкової палички. Експериментально встановлено, що АМ-166 не виявляє інгібувального впливу на продукцію целюлози клітинами *E. coli* 311.

Вивчення впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на компоненти матриксу біоплівки P. aeruginosa.

Основними складовими матриксу біоплівки *P. aeruginosa* є альгінат, Psl-, Pel-полісахариди, білки (Psl-зв'язуючий білок CdrA), еДНК [261, 262]. Структурний компонент матриксу Pel бере участь у формуванні біоплівки та зумовлює стійкість до АМП, білки відіграють важливу роль в адгезії, агрегації бактеріальних клітин та структурній цілісності мікробних угруповань [261].

Отримані дані щодо впливу сполук АМ-166 та КВМ-97 (0,5 МІК) на синтез компонентів матриксу біоплівки синьогнійної палички наведено на рис. 4.12.

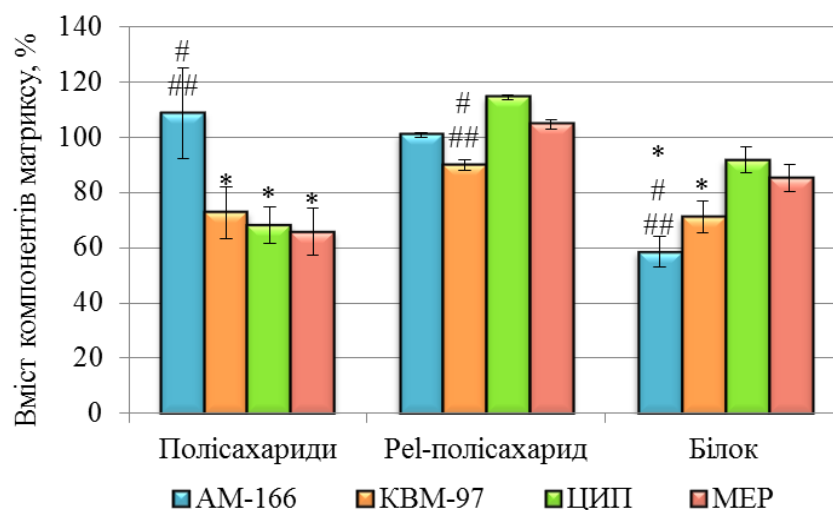


Рис. 4.12 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на компоненти матриксу біоплівки *P. aeruginosa* 449

Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «ЦИП» – ципрофлоксацин; «МЕР» – меропенем;
3. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
4. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації ципрофлоксацину ($p < 0,05$);
5. «##» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації меропенему ($p < 0,05$);
6. Розмір вибірки: $n = 6$ при визначенні полісахаридів, $n = 8$ при визначенні Pel-полісахариду, $n = 4$ при визначенні загального білка.

Результати експериментів (рис. 4.12) свідчать, що сполука AM-166 не впливає на продукцію полісахаридів клітинами *P. aeruginosa* 449, а за дії KBM-97 відмічено їх зменшення на 27,3 % ($p < 0,05$), Pel-полісахариду – на 10,1 %. Сполука KBM-97 за своєю дією не поступається або переважає АМП.

Встановлено (рис. 4.12), що AM-166 та KBM-97 пригнічують синтез білка, за їх дії відмічено зменшення його вмісту на 41,6 % та 29,0 %, відповідно, порівняно з контролем ($p < 0,05$).

Таким чином, сполуки, що містять адамантильний радикал, у концентрації 0,5 МІК зменшують вміст полісахаридів та білка у матриксі біоплівки *P. aeruginosa* 449, окрім сполуки AM-166 щодо синтезу полісахаридних компонентів.

4.3 Проникність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу через матрикс біоплівки грампозитивних та грамнегативних бактерій

Захисним бар'єром для клітин у складі біоплівки є матрикс, який може перешкоджати проникненню АМП у біоплівку та забезпечує їй стійкість до дії протимікробних засобів [184, 241, 263 – 265]. Проте, варто відмітити, що повне проникнення АМП всередину мікробних спільнот не завжди може забезпечити ефективний антибіоплівковий ефект через наявність у клітин бактерій інших механізмів резистентності (активація ефлюкських pomp, знижена метаболічна активність, горизонтальний перенос генів стійкості між клітинами) [263, 266].

Проникність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу через матрикс мікробних спільнот оцінювали за діаметрами зон затримки росту чутливої культури з використанням полікарбонатних мембран [184]. Сполуки досліджували у концентрації 200 мкг, АМП азитроміцин та ципрофлоксацин – 15 мкг та 5 мкг, що відповідає кількості антибіотику у стандартному диску для визначення чутливості. Як чутливу до похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу культуру використовували *S. aureus* 222 (МІК АМ-166 та КВМ-97 становить 2,5 мкг/мл та 2,0 мкг/мл, відповідно). Отримані результати наведено у табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Проникність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу через матрикс біоплівки

Умови експерименту	Проникність, %		
	<i>S. aureus</i> 222	<i>E. coli</i> 311	<i>P. aeruginosa</i> 449
АМ-166	81,1	0	0
КВМ-97	100,0	0	0
Азитроміцин	100,0	–	–
Ципрофлоксацин	–	99,8	100,0

Примітка. «–» – дослідження не проводили з урахуванням чутливості тест-штамів [155, 156].

Результати досліджень показали (табл. 4.1), що сполуки АМ-166 та КВМ-97 проникають через біоплівки грампозитивних мікроорганізмів, проникність АМ-166 через матрикс *S. aureus* 222 становить 81,1 %, КВМ-97 – 100,0 %.

Проте у похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу у досліджуваних концентраціях не виявлено здатності проникати через біоплівки *P. aeruginosa* 449 та *E. coli* 311. Враховуючи те, що адамантавмісні сполуки впливають на біоплівки, сформовані грамнегативними бактеріями, зменшуючи їх біомасу та кількість життєздатних клітин, отриманий ефект може бути пов'язаний з недостатньою концентрацією досліджуваних речовин, яка би могла проникнути через біоплівку бактерій та здатністю сполук взаємодіяти з компонентами матриксу через гідрофобні та електростатичні взаємодії [150].

Відмічено, що АМП азитроміцин та ципрофлоксацин майже повністю проникають всередину бактеріальних біоплівок.

Висновки до розділу 4

1. Таким чином, похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу впливають на 2-добові біоплівки *S. aureus* 222: АМ-166 у концентрації 5,0 МІК, КВМ-97 – 0,5 МІК та 5,0 МІК. Відмічено їх антибіоплівкову активність щодо 5-добових біоплівок *E. coli* 311 та *P. aeruginosa* 449 у концентраціях, що перевищують 1,0 МІК. Сполука АМ-166 зменшує біомасу біоплівки *P. aeruginosa* 449 та кількість метаболічно активних клітин у її складі також за дії субінгібуючих концентрацій. Похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу за антибіоплівковою активністю у суб-МІК наближаються або переважають препарати порівняння азитроміцин (щодо *S. aureus*), ципрофлоксацин та меропенем (*E. coli* та *P. aeruginosa*).

2. Механізм антибіоплівкової активності похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу щодо *S. aureus* не пов'язаний з впливом на компоненти матриксу біоплівок, проте активність АМ-166 та КВМ-97 може бути зумовлена здатністю

проникати всередину стафілококових біоплівки і діяти безпосередньо на планктонні клітини. Інгібуючий ефект похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу щодо біоплівки *E. coli* та *P. aeruginosa* може реалізовуватися впливом на продукцію білків та полісахаридів.

3. Сполуки, що містять адамантильний радикал, як і азитроміцин, здатні проникати через матрикс біоплівки метицилін-резистентного *S. aureus* (проникність в межах 81,1 – 100,0 %). У дослідженій концентрації сполуки АМ-166 та KBM-97 через матрикс грамнегативних бактерій (*E. coli*, *P. aeruginosa*) не проникають.

Матеріали даного розділу представлені у наступних публікаціях:

1. Антибактеріальна активність амінопропанолів з адамантильним і N-алкіларильним радикалом відносно біоплівки *E. coli* / Дудікова Д. М., Вринчану Н. О., Короткий Ю. В., Дронова М. Л., Суворова З. С., Шарова А. О., Гринчук Н. І., Недашківська В. В. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2017. № 6. С. 37–42. (Особистий внесок – брала участь у дослідженнях, обробці, узагальненні результатів та підготовці тексту статті до публікації).

2. Вплив 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензил, N-диметиламіно)-2-пропанол хлориду на компоненти матриксу біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* / Дудікова Д. М., Гринчук Н. І., Суворова З. С., Недашківська В. В., Вринчану Н. О. *The scientific heritage*. 2018. № 25. С. 3–9. (Особистий внесок – виконано частину експериментального блоку, проведено статистичну обробку та аналіз даних, підготовлено статтю до публікації).

3. Біоплівки. Сучасний стан та перспективи антимікробної терапії / Вринчану Н. О., Дудікова Д. М., Гринчук Н. І., Недашківська В. В. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2019. № 5. С. 311–321. <https://doi.org/10.33250.13.05.311>. (Особистий внесок – аналіз літературних джерел та підготовка тексту статті до публікації).

4. Antibiofilm effect of adamantane derivative against *Staphylococcus aureus* / Hrynchuk N. I., Vrynchanu N. O., Buchtyarova T. A., Dudikova D. M.,

Korotkyi Yu. V., Bondarenko L. B. *Mikrobiolohichni Zhurnal*. 2021. Vol. 83, № 1. P. 58–67. <https://doi.org/10.15407/microbiolj83.01.058> (Scopus, Q4). (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, проведення експериментів, аналіз результатів та підготовка тексту статті до публікації).

5. Гринчук Н. І., Бойко І. О., Вринчану Н. О. Антибіоплівкова дія ципрофлоксацину щодо *Pseudomonas aeruginosa*. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. Т. 15, № 2. С. 82–91. <https://doi.org/10.33250/15.02.082>. (Особистий внесок – брала участь у дослідженнях, аналізі та обговоренні результатів, підготовці тексту статті до публікації).

6. Antibiofilm activity of 4-(adamantyl-1) -1- (1-aminobutyl) benzol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Hrynychuk N., Zelena L., Bukhtiarova T., Vrychanu N, Ishchenko L., Vazhnichaya E. *Mikrobiolohichni Zhurnal*. 2022. Vol. 84, № 3. С. 39–50. <https://doi.org/10.15407/microbiolj84.03.039> (Scopus, Q4). (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, проведення досліджень, аналіз результатів та підготовка тексту статті до публікації).

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ПОХІДНИХ 4-(1'-АДАМАНТИЛ)-1R-БЕНЗОЛУ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ У БАКТЕРІЙ

Біоплівки – бактеріальні спільноти, укладені в жорсткий та динамічний позаклітинний матрикс. Вирішальну роль у зміні способу життя від планктонного до сидячого відіграють фактори навколишнього середовища. Зміна способу існування мікроорганізмів забезпечується специфічними та неспецифічними факторами адгезії, синтезом компонентів матриксу та регулюється експресією різних генів на кожному етапі формування біоплівки.

Для з'ясування механізму антибіоплівкової дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу проведено дослідження впливу сполук на експресію генів, що забезпечують прикріплення клітин бактерій до поверхні та утворення біоплівки.

5.1 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на транскрипційну активність генів *S. aureus*

Дослідження щодо впливу сполук з адамантильним радикалом на експресію генів, відповідальних за плівкоутворення здійснювали, використовуючи клінічний ізолят золотистого стафілококу – *S. aureus* 222. Оскільки тест-штам *S. aureus* 222 виявив стійкість до метициліну [218], на першому етапі за допомогою ПЛР визначали наявність гена *tesA*, відповідального за стійкість до цього антимікробного препарату. Ген *tesA* кодує додатковий пеніцилін-зв'язуючий білок (PBP), PBP2a, який запобігає потраплянню β -лактамів до мішені [208, 267]. Резистентність до β -лактамічних антибіотиків, що виявляється у штамів MRSA, може бути пов'язана з наявністю в бактеріальному геномі переносимих геномних островів *SCCtes*, де ген *tes* визначає резистентність до метициліну [267].

Отримані дані наведено на рис. 5.1.

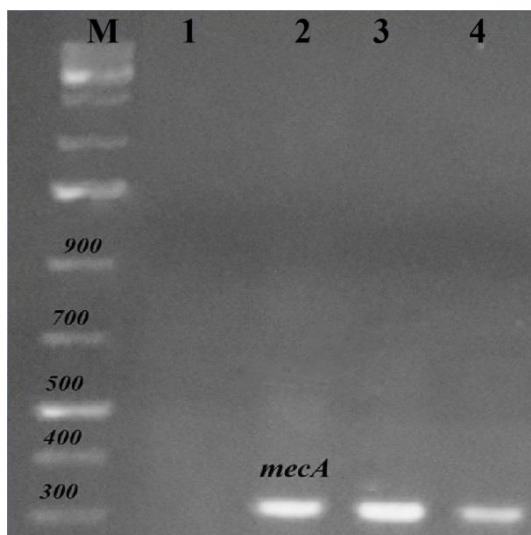


Рис. 5.1 Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації гена *mecA* у *S. aureus* 222

Примітки:

1. «М» – ДНК-маркер молекулярних мас;
2. «1» – негативний контроль;
3. «2» – позитивний контроль;
4. «3, 4» – продукти ампліфікації гена *mecA* у *S. aureus* 222.

Результати дослідження свідчать (рис. 5.1), що у штаму *S. aureus* 222 наявний ген *mecA*, що підтверджує віднесення клінічного ізоляту до MRSA.

Для дослідження здатності похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу змінювати транскрипційну активність генів плівкоутворення, на першому етапі визначали наявність генів *icaA*, *icaD*, *fib*, *fnbB*, *sarA*, *cidA*, *agrA*, *clfB*, *ebpS*, *eno*, *bbp*, *sna* у досліджуваного тест-штаму *S. aureus* 222, які експресуються на різних стадіях формування біоплівки [268, 269].

Отримані результати зображено на рис. 5.2 – 5.3.

Встановлено (рис. 5.2), що у метицилін-резистентного тест-штаму *S. aureus* 222 наявні гени *icaA* (з праймерами *ica* та *icaA*), *icaD*, що відповідають за синтез компонента матриксу PIA-полісахариду, міжклітинну адгезію та формування біоплівки. У золотистого стафілокока виявлено гени регуляції плівкоутворення (*sarA*), функціонування системи QS (*agrA*) та вивільнення еДНК (*cidA*).

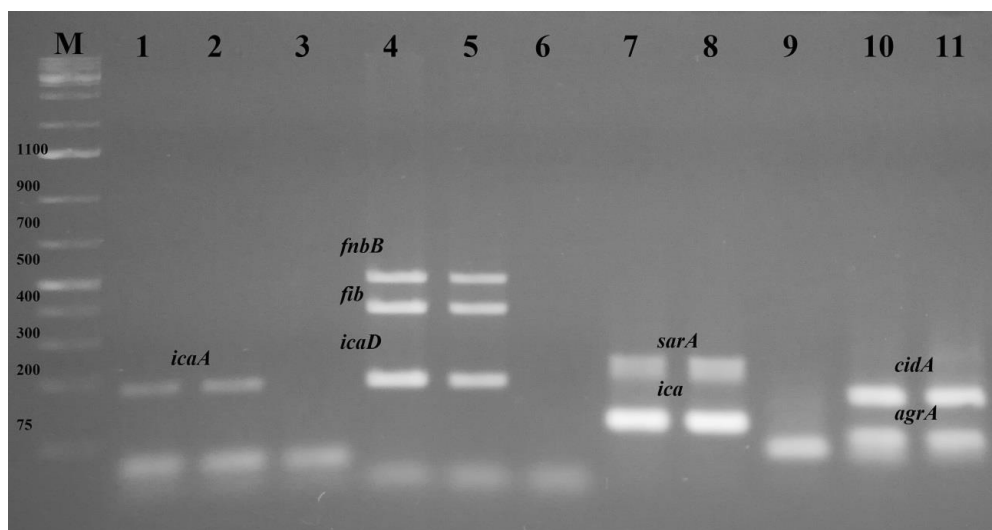


Рис. 5.2 Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації з праймерами до генів плівкоутворення у *S. aureus* 222

Примітки:

1. «М» – ДНК-маркер молекулярних мас;
2. «1, 2» – продукти ампліфікації гена *icaA* (188 п. н.);
3. «4, 5» – продукти ампліфікації генів *fmbB* (523 п. н.); *fib* (405 п. н.); *icaD* (198 п. н.);
4. «7, 8» – продукти ампліфікації генів *sarA* (250 п. н.); *ica* (113 п. н.);
5. «10, 11» – продукти ампліфікації генів *cidA* (170 п. н.); *agrA* (82 п. н.);
6. «3, 6, 9» – негативний контроль.

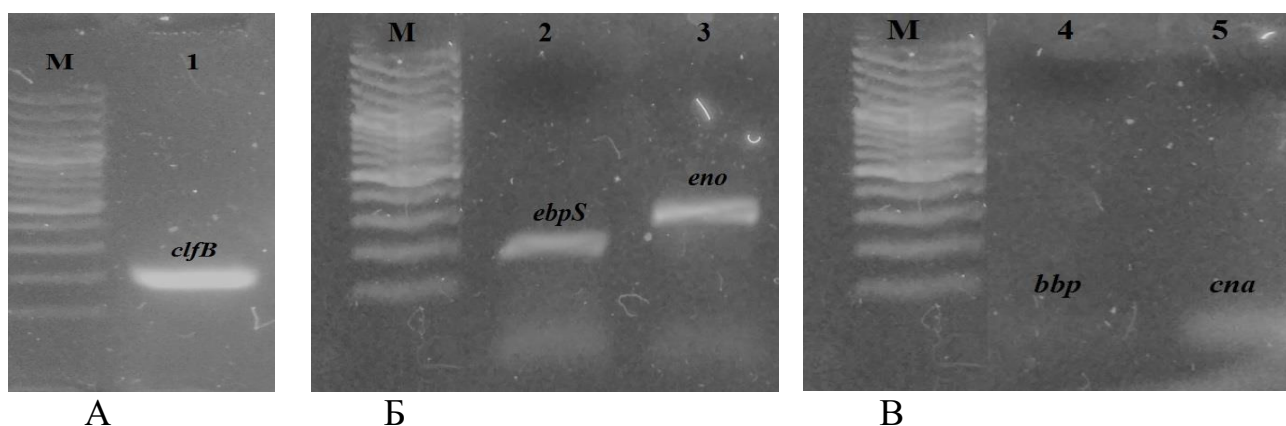


Рис. 5.3 Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації з праймерами до генів адгезії у *S. aureus* 222: А – *clfB*; Б – *ebpS*, *eno*; В – *bbp*, *cna*

Примітки:

1. «М» – ДНК-маркер молекулярних мас (GeneRuler 100 bp Plus, ThermoScientific);
2. «1» – *clfB* (203 п. н.); «2» – *ebpS* (180 п. н.), «3» – *eno* (302 п. н.), «4» – *bbp* (574 п. н.), «5» – *cna* (192 п. н.).

У клінічного ізолята *S. aureus* 222 виявлено гени (рис. 5.2 – 5.3), що регулюють синтез білків-адгезинів: пластівцевоутворюючого фактора В (ген *clfB*), фібриногензв'язуючого білка (*fib*), фібронектинзв'язуючого білка В (*finbB*), еластинзв'язуючого білка (*ebpS*) та ламінінзв'язуючого білка (*eno*).

Згідно з отриманими даними (рис. 5.3), у тест-штаму відсутні гени, що відповідають за синтез кісткового сіалопротейнзв'язуючого білка (*bbp*) та колагензв'язуючого білка (*sna*).

Таким чином, досліджуваний штам *S. aureus* 222 відноситься до MRSA, у нього наявні гени, що забезпечують адгезію мікроорганізмів до біотичної поверхні та регулюють формування біоплівки. Використання метицилін-резистентного тест-штаму золотистого стафілококу для оцінки інгібувального ефекту похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу є важливим, оскільки MRSA є стійким до багатьох груп АМП, що знижує ефективність антимікробної хіміотерапії. Для успішної боротьби з патогеном необхідно не лише пошук ефективних АМП, але й з'ясування механізмів, що забезпечують йому антибіотикорезистентність.

Оцінку відносного рівня експресії генів, що відповідають за синтез білків-адгезинів, синтез полісахаридного компонента матрикса біоплівок – PIA (*icaA*, *icaD*), регуляцію синтезу PIA-полісахариду (*icaR*) та плівкоутворення (*sarA*), систему QS (*agrA*), вивільнення еДНК (*cidA*) у метицилін-резистентного *S. aureus* 222 проводили за допомогою ПЛР у реальному часі. Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та KBM-97 на транскрипційну активність генів досліджували у субінгібуючій концентрації (0,5 МІК). Отримані дані представлено на рис. 5.4 та на рис. 5.5.

Результати проведених експериментів показали (рис. 5.4), що сполука АМ-166 знижує відносний рівень експресії гена *icaA*: за її дії транскрипційна активність майже не детектується (використовуючи праймер *ica*) або знижується у 1,9 раза (з праймером *icaA*) порівняно з контролем. Статистично достовірних змін за дії АМ-166 в експресії гена *icaD* не виявлено.

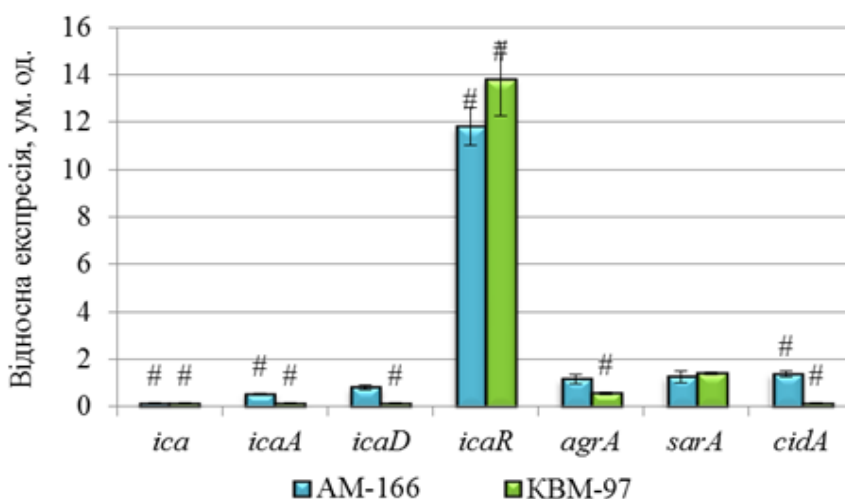


Рис. 5.4 Відносний рівень експресії генів ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), що регулюють плівкоутворення *S. aureus* 222 за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. Контроль прийнято за 1;
2. «#» – відмінності вірогідні порівняно з контролем ($p < 0,05$);
3. Розмір вибірки: $n = 4$.

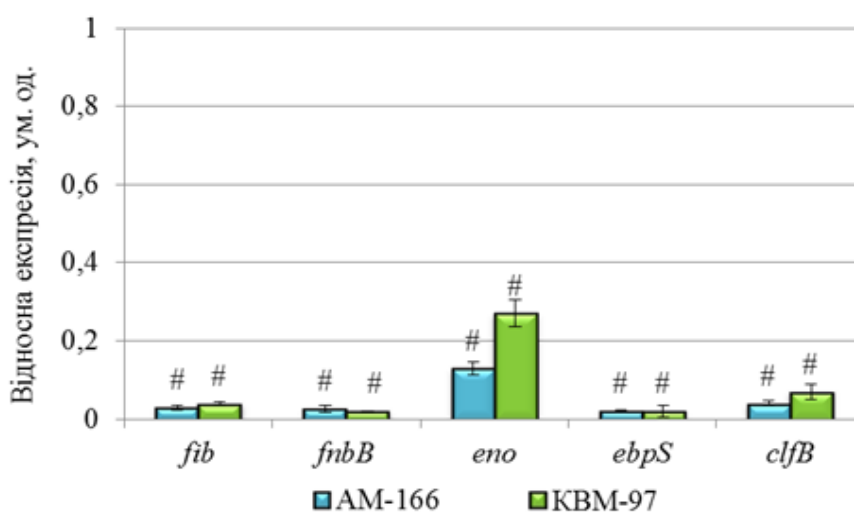


Рис. 5.5 Відносний рівень експресії генів ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), що регулюють адгезію *S. aureus* 222 за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. Контроль прийнято за 1;
2. «#» – відмінності вірогідні порівняно з контролем ($p < 0,05$);
3. Розмір вибірки: $n = 4$.

Встановлено, що за дії сполуки KBM-97 експресія генів *icaA* (незалежно від використаного праймера) та *icaD* практично не виявляється.

Результати експериментів підтверджуються даними щодо впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на транскрипційну активність негативного регулятора *icaADBC*-оперона *icaR*: за дії AM-166 та KBM-97 відмічено значне збільшення експресії гена *icaR* порівняно з контролем – у 11,8 раза та 13,8 раза, відповідно. Збільшення активності регуляторного гена *icaR* призводить до пригнічення експресії *icaADBC*-оперону, порушення синтезу PIA-полісахариду та плівкоутворення.

При дослідженні впливу адамантанвмісних сполук на транскрипційну активність генів регуляторів *agrA* та *sarA* (рис. 5.4) встановлено, що інгібуюча активність реєструється лише за дії KBM-97 щодо *agrA* (зниження експресії у 1,7 раза). Експресія генів *agrA* (за впливу AM-166) та *sarA* (за дії обох сполук) навпаки зростає порівняно з контролем, проте виявлені зміни статистично не достовірні ($p > 0,05$).

Аналіз відносної експресії гена *cidA*, відповідального за лізис клітин та вивільнення еДНК, показав, що сполука AM-166 стимулює його активність (у 1,4 раза), на противагу KBM-97, яка виявляє інгібуючу дію (зменшення експресії *cidA* у 6,9 разів порівняно з контролем).

Результатами дослідження експресії генів *clfB*, *fib*, *finbB*, *ebpS* та *eno* встановлено (рис. 5.5), що за дії AM-166 та KBM-97 транскрипційна активність *clfB*, *fib*, *finbB*, *ebpS* майже не детектується, а експресія гена *eno* зменшується більше, ніж у 3,0 раза порівняно з контролем.

Таким чином, похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу AM-166 та KBM-97 виявляють виразну антибіоплівкову активність щодо штаму MRSA. Їх вплив реалізується пригніченням експресії генів, відповідальних за адгезію та плівкоутворення, що може призводити до порушення синтезу міжклітинного полісахаридного адгезина, поверхневих білків-адгезинів та регуляторних процесів формування біоплівки.

Враховуючи патогенність метицилін-резистентного золотистого стафілококу, а також виявлені зміни в експресії генів цього мікроорганізма за дії адамантанвмісних сполук, ми вважали за доцільне оцінити вплив сполук АМ-166 та KBM-97 на геном MRSA. Дослідження проводили за допомогою ПЛР-аналізу з праймерами до нуклеотидних повторів. Сполуки використовували у субінгібуючій концентрації 0,5 МІК. Отримані результати наведено на рис. 5.6.

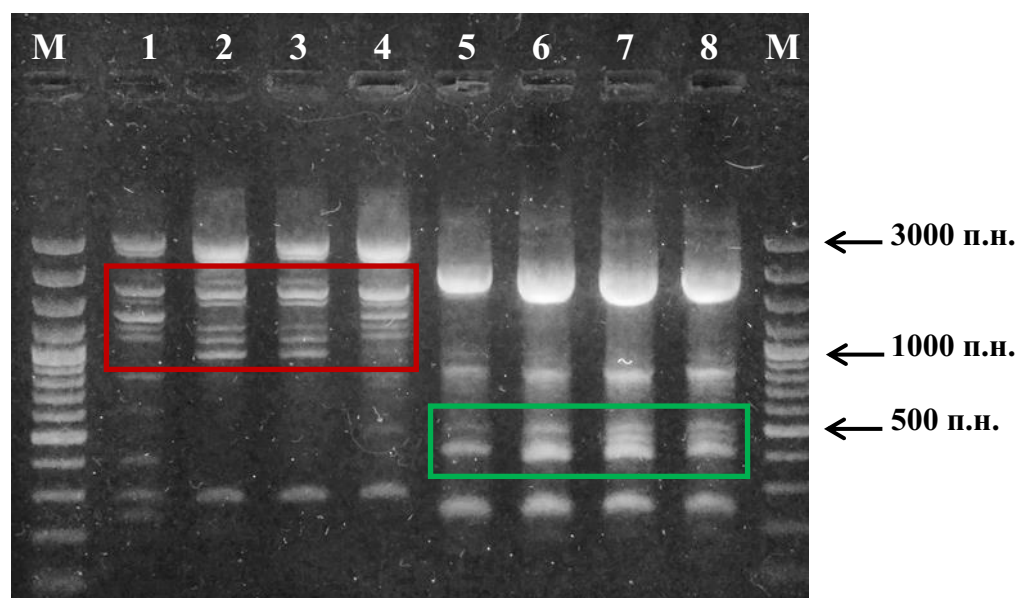


Рис. 5.6 Електрофореграма продуктів ампліфікації *S. aureus* 222 за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. «М» – маркер молекулярної ваги;
2. «1–4» – праймер M13, «5–8» – праймер (GTG)₄;
3. «1, 5» – контроль, «2, 6» – KBM-97, «3, 7» – АМ-166;
4. «червона рамка» – виявлені зміни при використанні праймера M13, «зелена рамка» – виявлені зміни при використанні праймера (GTG)₄.

У результаті ампліфікації ДНК *S. aureus* 222 з праймерами до нуклеотидних повторів встановлено (рис. 5.6), що у контролі загальний спектр ПЛР-фрагментів за використання праймеру M13 нараховує 12 ампліконів розміром від 300 п. н. до 3000 п. н., при використанні (GTG)₄ праймеру до

тринуклеотидного повтору – 7 ампліконів від ≈ 250 п. н. до ≈ 1800 п. н. Порівняльним аналізом патернів ПЛР-продуктів при використанні (GTG)₄ праймеру виявлено відмінності у кількості ампліконів за дії АМ-166, у порівнянні з контролем: відмічено 3 ДНК-фрагмента у діапазоні від 400 п.н до 500 п. н. та 2 фрагмента у контролі. Сполука КВМ-97 не призводила до змін у геномі *S. aureus*. При використанні М13 праймеру за дії обох адамантанвмісних сполук відмічена варіабельність у кількості і розмірах ампліконів у діапазоні від 1000 п. н. до 2000 п. н.: наявний ДНК-фрагмент розміром 1000 п. н. та відсутній амплікон розміром 2000 п. н.

Отримані дані свідчать (рис. 5.6), що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу призводять до змін у розподілі використаних нуклеотидних повторів у геномі метицилін-резистентного *S. aureus* 222, що може бути пов'язано з їх здатністю зв'язуватися з ДНК [150, 270]. Вплив на геном бактерій може призводити до зміни їх профілю антибіотикочутливості, адже пошкодження ДНК індукує бактеріальну SOS-відповідь за участі понад 50 генів, деякі з яких беруть участь у розвитку резистентності до АМП [271, 272].

5.2 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на транскрипційну активність генів *E. coli*

Формування біоплівки тісно взаємопов'язано з фізіологічними процесами у бактерій, що забезпечують їх дихання, живлення та утворення енергії [273]. Адже, продукція пілей, джгутиків, їх обертання, біосинтез позаклітинних полімерних речовин (EPS) є енергозатратними процесами, які залежать від наявності кисню, активності цитохрому bd термінальної оксидази [273, 274]. Перший етап плівкоутворення *E. coli*, адгезія до субстрату, забезпечується джгутиками, пілями 1 типу, Р-фімбріями, які містять у своєму складі адгезини та контролюються експресією відповідних генів (наприклад, *fimA*, *rapC*, *fliC*, *motB*) [56, 62].

Враховуючи здатність адамантанвмісних сполук впливати на специфічні фактори адгезії (рухливість), порушувати енергетичні процеси, впливати на ендогенне та субстратне дихання у грамнегативних бактерій [150, 151], нами були проведені поглиблені молекулярні дослідження впливу сполук АМ-166 та КВМ-97 на експресію генів, що беруть участь у продукції структурних компонентів пілей та джгутиків (*fimA*, *papC*, *fliC*, *motB*), генів *appB* та *appX*, відповідальних за синтез субодиниці цитохрому bd-II оксидази, та транскрипційну активність генів *malP* та *malZ*, які беруть участь в катаболізмі глікогену, що є одним з основних джерел вуглецю та енергії.

На першому етапі за допомогою ПЛР-аналізу проведено експерименти щодо виявлення генів *fimA*, *papC*, *fliC*, *motB*, *afa*, які забезпечують рухливість та адгезію кишкової палички. Отримані результати представлені на рис. 5.7.

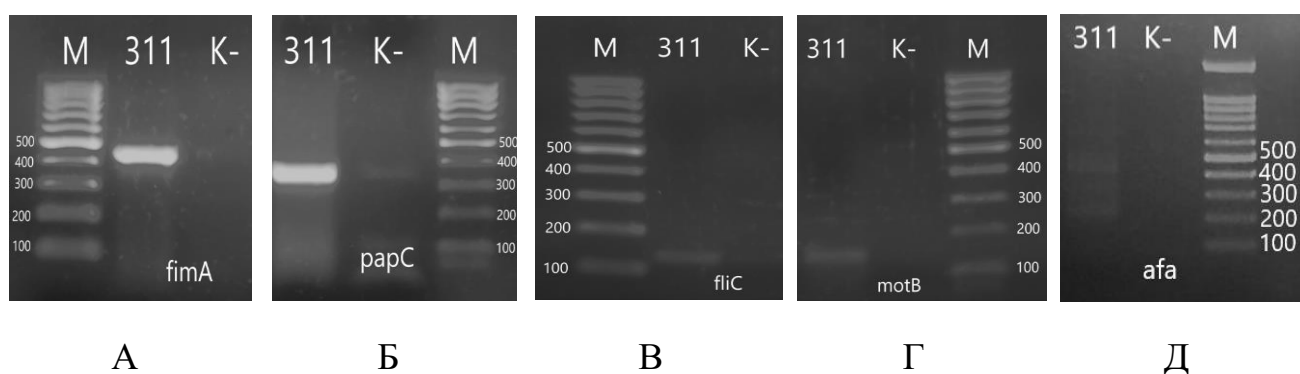


Рис. 5.7 Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації з праймерами до генів адгезії *fimA* (А), *papC* (Б), *fliC* (В), *motB* (Г) та *afa* (Д) у *E. coli* 311

Примітки:

1. «М» – ДНК-маркер молекулярних мас;
2. «311» – досліджуваний тест-штам *E. coli* 311;
3. «К-» – негативний контроль.

Встановлено (рис. 5.7), що у тест-штаму *E. coli* 311 наявний ген *fimA* (447 п. н.), відповідальний за синтез пілей 1 типу, ген *papC* (328 п. н.) – Р-фімбрій, гени *fliC* (131 п. н.) та *motB* (146 п. н.), що регулюють синтез

білкових складових джгутиків. У клінічного ізоляту *E. coli* 311 не виявлено гена *afa*, що бере участь у синтезі афімбріальних адгезинів.

Результати дослідження виявлення генів «домашнього господарства» у *E. coli* 311 наведені на рис. 5.8.

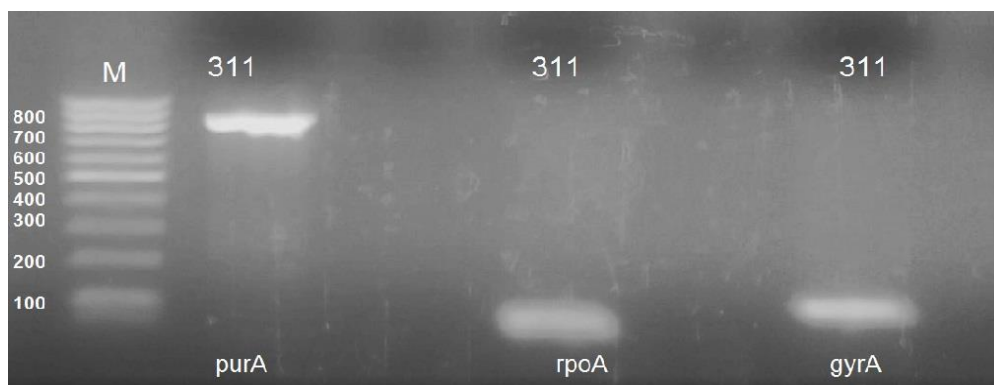


Рис. 5.8 Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації з праймерами до генів *purA*, *rpoA*, *gyrA* у *E. coli* 311

Примітки:

1. «М» – ДНК-маркер молекулярних мас;
2. «311» – досліджуваний тест-штам *E. coli* 311.

Встановлено (рис. 5.8), що у *E. coli* 311 експресуються гени *purA* (816 п. н.), *rpoA* (57 п. н.) та *gyrA* (106 п. н.). Ген *purA* відіграє важливу роль у біосинтезі пуринів, а його білок каталізує перший етап синтезу АМФ. Ген *rpoA* кодує субодиницю ДНК-залежної РНК-полімерази, *gyrA* – субодиницю А ДНК-гірази. Виявлені гени «домашнього господарства» будуть використанні як внутрішні контролю при аналізі експресії генів, що регулюють плівкоутворення та метаболічні процеси у *E. coli* 311, за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу.

Вплив АМ-166 та KBM-97 на транскрипційну активність генів *fliC*, *motB*, *fimA*, *rapC*, *appB*, *appX*, *malP* та *malZ*, відповідальних за рухливість, адгезію та метаболічні процеси у *E. coli*, досліджували у концентрації 0,5 МІК за допомогою ПЛР у реальному часі.

Отримані дані наведено на рис. 5.9 – 5.10.

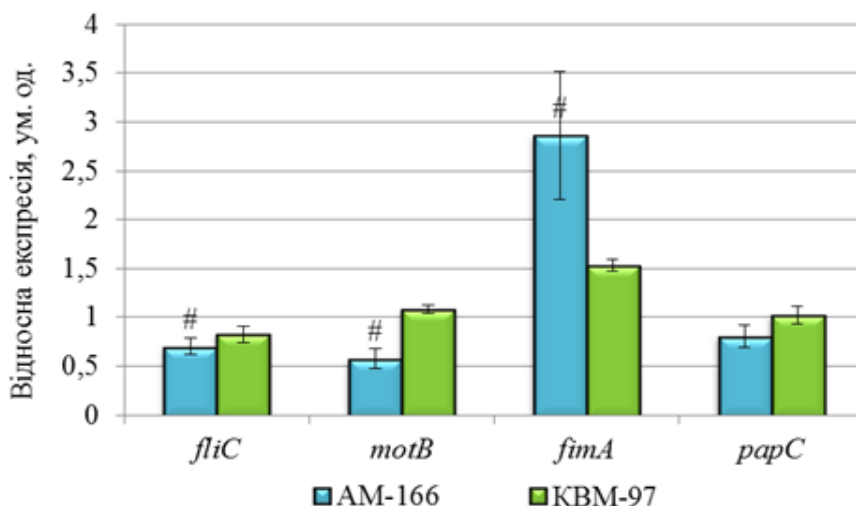


Рис. 5.9 Відносний рівень експресії генів ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), що регулюють адгезію *E. coli* 311, за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. Контроль прийнято за 1;
2. «#» – відмінності вірогідні порівняно з контролем ($p < 0,05$);
3. Розмір вибірки: $n = 4$.

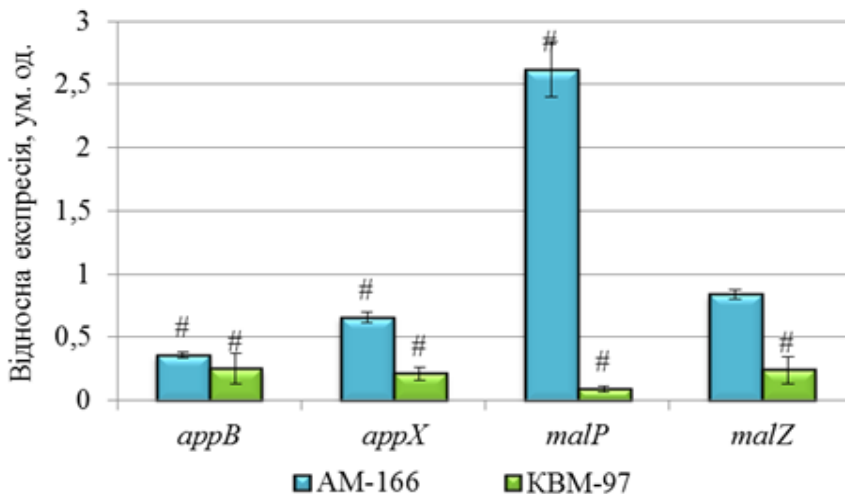


Рис. 5.10 Відносний рівень експресії генів ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), що регулюють енергетичні процеси *E. coli* 311, за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. Контроль прийнято за 1;
2. «#» – відмінності вірогідні порівняно з контролем ($p < 0,05$);
3. Розмір вибірки: $n = 4$.

Встановлено (рис. 5.9), що за дії АМ-166 транскрипційна активність генів *fliC* і *motB* зменшується в 1,4 раза та 1,5 раза, відповідно, експресія гена *fimA* навпаки підвищується у 2,9 раза порівняно з контролем ($p < 0,05$). Виявлені зміни в експресії гена *rapC* за впливу АМ-166 статистично не достовірні ($p > 0,05$). За дії сполуки KBM-97 у концентрації 0,5 МІК статистично значущих змін в експресії досліджуваних генів порівняно з контролем не виявлено.

Отримані дані свідчать (рис. 5.10), що сполуки АМ-166 та KBM-97 пригнічують експресію гена *appB* у 2,8 раза та 4,0 раза, *appX* – у 1,5 раза та 4,8 раза, відповідно. Встановлено, що АМ-166 збільшує експресію гена *malP* в 2,6 раза. Виявлені зміни в транскрипційній активності гена *malZ* статистично не достовірні. Сполука KBM-97 зменшує експресію досліджуваних генів у *E. coli* 311: *malP* – в 11,1 раза, *malZ* – в 4,2 раза ($p < 0,05$).

Таким чином, сполука АМ-166 обумовлює зміни в експресії генів *fliC*, *motB*, *fimA* у *E. coli* 311 та здатна впливати на дихання через пригнічення експресії генів *appB* та *appX*. Антимікробна активність похідного 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу KBM-97 на біоплівки *E. coli* 311 не пов'язана з впливом на гени, що регулюють адгезію кишкової палички. Проте сполука значно пригнічує гени *appB*, *appX*, *malP* та *malZ*, які беруть участь у диханні та енергетичних процесах у кишкової палички.

5.3 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на транскрипційну активність генів *P. aeruginosa*

При формуванні біоплівки клітини *P. aeruginosa* синтезують позаклітинні полімерні речовини – Pel-, Psl-полісахариди та альгінат, які відіграють важливу роль у формуванні та структурі біоплівки, а також у захисті клітин від впливу несприятливих факторів навколишнього середовища [275]. Оскільки експериментально доведено вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на компоненти матриксу синьогнійної палички, на наступному етапі оцінювали їх здатність змінювати експресію генів, залучених у синтез екзополісахаридів.

Отримані результати виявлення генів *pelA*, *pslA*, *algD*, *algL*, *algR*, *algU*, *tmsA* та генів «домашнього господарства» у *P. aeruginosa* 449 наведено на рис. 5.11 – 5.12.

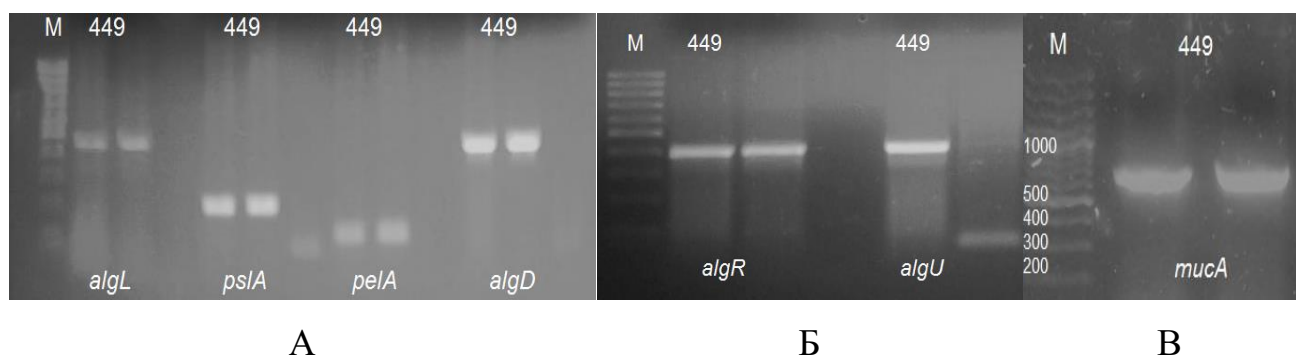


Рис. 5.11. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації генів, що регулюють синтез компонентів матриксу біоплівки *P. aeruginosa* 449: А – *algL*, *pslA*, *pelA*, *algD*; Б – *algR*, *algU*; В – *mucA*

Примітки:

1. «М» – ДНК-маркер молекулярних мас;
2. «449» – досліджуваний тест-штам *P. aeruginosa* 449.

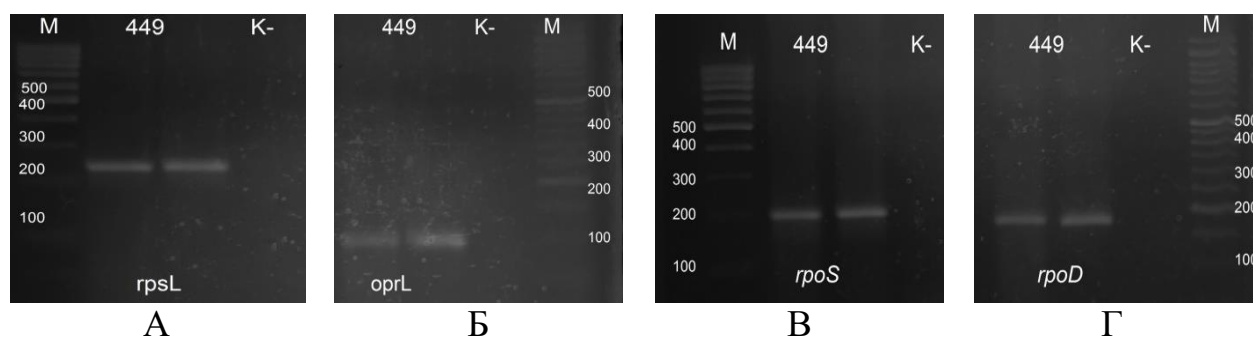


Рис. 5.12 Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації з праймерами до генів *rpsL* (А), *oprL* (Б), *rpoS* (В), *rpoD* (Г) у *P. aeruginosa* 449

Примітки:

1. «М» – ДНК-маркер молекулярних мас;
2. «449» – досліджуваний тест-штам *P. aeruginosa* 449;
3. «К-» – негативний контроль.

Встановлено (рис. 5.11), що у клінічного штаму *P. aeruginosa* 449 наявні гени *pslA* (198 п. н.), *pelA* (118 п. н.), *algL* (432 п. н.), *algD* (400 п. н.), *algR* (400 п. н.), *algU* (410 п. н.), *mucA* (688 п. н.), що регулюють біосинтез основних екзополісахаридів – Pel, Psl та альгінату.

Отримані дані свідчать (рис. 5.12), що у *P. aeruginosa* 449 експресуються гени «домашнього господарства»: *rpsL* (240 п. н.), *oprL* (100 п. н.), *rpoS* (190 п. н.) та *rpoD* (180 п. н.). Продуктом гена *rpsL* є білок S12 30S рибосоми, *oprL* – попередник ліпопротеїну OprL, пов'язаного з пептидогліканом клітинної стінки бактерій, *rpoS* – сігма фактор RpoS, *rpoD* – сігма фактор RpoD. Виявлені гени будуть використані як внутрішні контролю при аналізі експресії генів у *P. aeruginosa* 449 за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу.

За допомогою ПЛР в реальному часі досліджено вплив адамантанвмісних сполук AM-166 та KBM-97 у субінгібуючій концентрації 0,5 МІК на транскрипційну активність виявлених генів, що беруть участь у синтезі Pel, Psl, альгінату. Результати дослідження представлені на рис. 5.13 – 5.14.

Встановлено (рис. 5.13), що AM-166 у субінгібуючій концентрації збільшує (у 16,6 разів) транскрипційну активність гена *pelA*, у 2,5 раза – гена *pslA*. За дії KBM-97 відмічено незначне зменшення експресії *pelA* та збільшення активності *pslA*, проте виявлені зміни статистично недостовірні порівняно з контролем ($p > 0,05$).

При дослідженні впливу AM-166 та KBM-97 на експресію генів, що регулюють біосинтез альгінату, використано препарат порівняння азитроміцин. Вибір макролідного АМП обґрунтовано його здатністю впливати на QS-залежні процеси у біоплівках *P. aeruginosa* [276].

Отримані дані свідчать (рис. 5.14), що AM-166 збільшує транскрипційну активність генів *algD* та *algR* у 6,0 разів та 2,9 раза, відповідно. За дії сполуки у субінгібуючій концентрації практично не детектується експресія гена *tucA* та зменшується (практично у 2,0 раза) активність гена *algU*, які є складовими *algU**tucABCD*-кластера. Виявлені зміни в експресії генів можуть призводити до стимуляції синтезу альгінату синьогнійною паличкою.

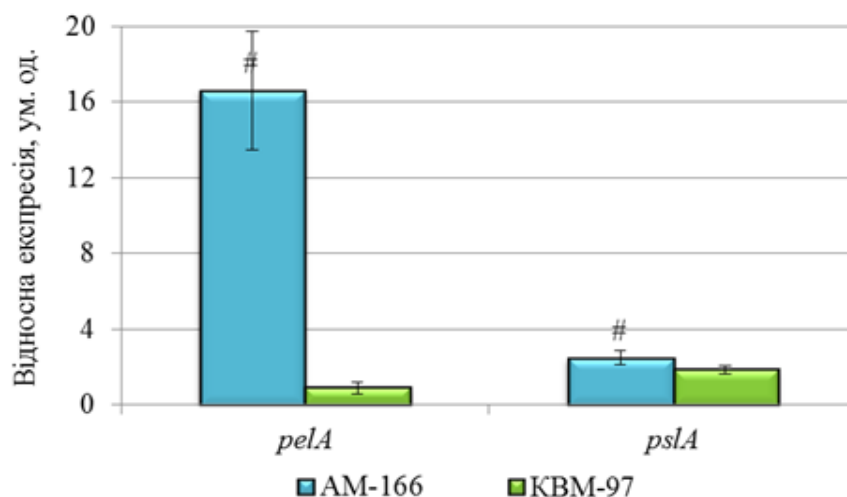


Рис. 5.13 Відносний рівень експресії генів ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) *pelA* та *pslA* у *P. aeruginosa* 449 за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. Контроль прийнято за 1;
2. «#» – відмінності вірогідні порівняно з контролем ($p < 0,05$);
3. Розмір вибірки: $n = 4$.

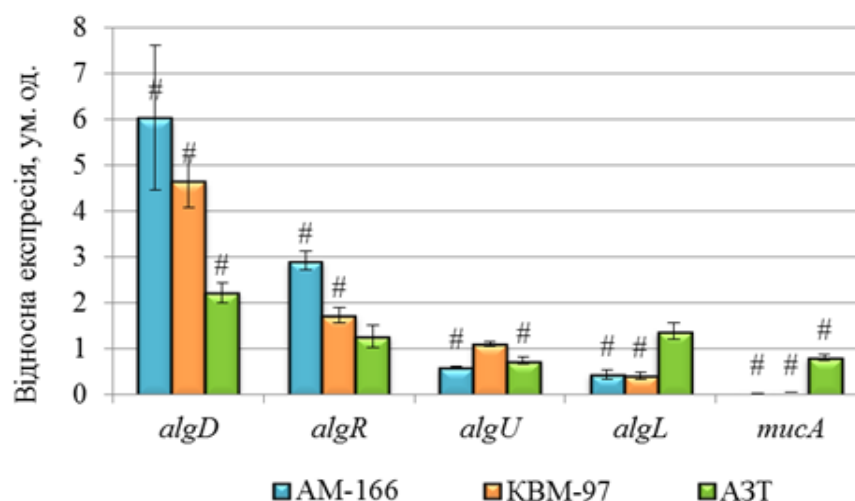


Рис. 5.14 Відносний рівень експресії генів ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), що регулюють синтез альгінату у *P. aeruginosa* 449 за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. Контроль прийнято за 1;
2. «АЗТ» – азитроміцин;
3. «#» – відмінності вірогідні порівняно з контролем ($p < 0,05$);
4. Розмір вибірки: $n = 4$.

Встановлено (рис. 5.14), що сполука KBM-97 у субінгібуючій концентрації також підвищує транскрипційну активність генів *algD* та *algR*, наслідком цього може бути збільшення мукоїдності штаму *P. aeruginosa*. За її дії експресія гена *algU* не змінюється порівняно з контролем, а *tucA* практично не детектується ($p < 0,05$). Зменшення транскрипційної активності регулятора *tucA* може призвести до активації синтезу білка AlgU та альгінату.

Проте виявлене пригнічення активності гена *algL* (практично у 2,0 рази) за дії AM-166 та KBM-97 навпаки обумовлює порушення синтезу альгінату у клітинах *P. aeruginosa* 449, зокрема на стадії модифікації та епімеризації поліманнуранової кислоти у периплазмі.

Згідно з отриманими даними (рис. 5.14), препарат порівняння азитроміцин також як і адамантанвмісні сполуки, пригнічує транскрипційну активність генів *algU* та *tucA* (у 1,4 та 1,2 рази, відповідно), підвищує відносний рівень експресії гена *algD* у 2,3 рази порівняно з контролем ($p < 0,05$). За дії макролідного АМП не виявлено статистично достовірних змін у транскрипційній активності генів *algR* та *algL* (на противагу сполукам AM-166 та KBM-97), відносний рівень експресії генів перевищує такий контролю у 1,2 та 1,3 рази, відповідно ($p > 0,05$).

Відомо, що експресія гена *algU* пов'язана з експресією *tucA*, який є його негативним регулятором. Проте у дослідженнях було виявлено порушення взаємозв'язку між цими генами за дії досліджуваних сполук, що може бути пов'язано з мутаціями в *tucA* [277]. Для їх виявлення за допомогою секвенування була визначена послідовність гена *tucA* у тест-штаму *P. aeruginosa* 449 та здійснено її порівняння зі штамом *P. aeruginosa* PAO1. Отримані результати наведено на рис. 5.15.

В результаті секвенування отримано фрагмент розміром 642 п. н., який було депоновано в GenBank з номером доступу PV911116. Шляхом порівняльного аналізу послідовності *tucA* штаму *P. aeruginosa* 449 зі штамом *P. aeruginosa* PAO1 виявлено мутацію A342G, яка була «мовчазною»: CAA/CAG (Gln).

PAO1 449	1	ATGAGTCGTGAAGCCCTGCAGGAAACTCTGTCCGCTGTGATGGATAACGAAGCGGATG ATGAGTCGTGAAGCCCTGCAGGAAACTCTGTCCGCTGTGATGGATAACGAAGCGGATG
PAO1 449	59	AACTCGAGTTGCGGCGGGTGTCTGCAGCTTGCGGCGAGGATGCCGAGCTGCGTTCCAC AACTCGAGTTGCGGCGGGTGTCTGCAGCTTGCGGCGAGGATGCCGAGCTGCGTTCCAC
PAO1 449	117	CTGGTCGCGTTACCAAGTTGGCGCGGTCCGTTCATGCACCGCGAGCCTACCCTGCCGAAG CTGGTCGCGTTACCAAGTTGGCGCGGTCCGTTCATGCACCGCGAGCCTACCCTGCCGAAG
PAO1 449	175	CTGGATATCGCTGCGGCGGTCTCTGCTGCCCTGGCCGACGAGGCCGCTCCGCCGAAAG CTGGATATCGCTGCGGCGGTCTCTGCTGCCCTGGCCGACGAGGCCGCTCCGCCGAAAG
PAO1 449	233	CGGAGAAGGGACCGTGGCGGATGGTCGGTCGCCTGGCGGTTCGCTGCCTCGGTGACCCT CGGAGAAGGGACCGTGGCGGATGGTCGGTCGCCTGGCGGTTCGCTGCCTCGGTGACCCT
PAO1 449	291	GGCGGTGCTGGCCGGCGTGCCTGTGTACAACCAGAACGACGCCCTGCCGCAAAATGGCG GGCGGTGCTGGCCGGCGTGCCTGTGTACAACCAGAACGACGCCCTGCCGCAAGATGGCG
PAO1 449	349	CAACAGGGGACCAACCCCGCAGATCGCCCTGCCTCAGGTGAAAGGCCCGGCCGTGCTGG CAACAGGGGACCAACCCCGCAGATCGCCCTGCCTCAGGTGAAAGGCCCGGCCGTGCTGG
PAO1 449	407	CCGGCTACAGCGAAGAGCAGGGGGCGCCGACGGTGATCACCAACTCCTCGTCCAGCGA CCGGCTACAGCGAAGAGCAGGGGGCGCCGACGGTGATCACCAACTCCTCGTCCAGCGA
PAO1 449	465	TACCCGCTGGCATGAGCAGCGTCTGCCGATCTACCTGCGTCAGCACGTGCAACAATCC TACCCGCTGGCATGAGCAGCGTCTGCCGATCTACCTGCGTCAGCACGTGCAACAATCC
PAO1 449	523	GCCGTCAGTGGTACAGAGAGCGCGCTGCCCTACGCTCGGGCAGCCAGCCTGGAAAACC GCCGTCAGTGGTACAGAGAGCGCGCTGCCCTACGCTCGGGCAGCCAGCCTGGAAAACC
PAO1 449	581	GCTGA GCTGA

Рис. 5.15 Послідовність гена *mucA* у *P. aeruginosa* PAO1 та *P. aeruginosa* 449

Примітки:

1. Мутація A342G позначена у червоній рамці;
2. «PAO1» – штам *P. aeruginosa* PAO1;
3. «449» – штам *P. aeruginosa* 449.

Таким чином, похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу та азитроміцин впливають на експресію генів, відповідальних за продукцію альгінату, та здатні призводити до активації його синтезу. Проте отриманий відмінний ефект щодо синтезу альгінату за дії AM-166 та KBM-97, враховуючи зменшення транскрипційної активності гена *algL*, що потребує детального вивчення. Для аналізу отриманих результатів необхідно проведення подальших поглиблених молекулярних досліджень, зокрема з використанням мутантних тест-штамів мікроорганізмів.

Висновки до розділу 5

1. Таким чином, похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу змінюють транскрипційну активність генів, що беруть участь у плівкоутворенні та адгезії *S. aureus* 222. За їх дії значно зменшується експресія генів *icaABCD*-оперону, що регулюють плівкоутворення, міжклітинну адгезію, синтез компонентів матрикса, та збільшується експресія регулятора *icaR*. Адамantanвмісні сполуки змінюють транскрипційну активність генів *agrA*, *sarA*, *cidA*, що регулюють функціонування QS, плівкоутворення та вивільнення еДНК. Антиадгезивна активність АМ-166 та KBM-97 реалізується пригніченням експресії генів, відповідальних за синтез білків-адгезинів – пластівцевоутворюючого фактора В (*clfB*), фібриногензв'язуючого білка (*fib*), фібронектинзв'язуючого білка В (*fnbB*), еластинзв'язуючого білка (*ebpS*), ламінінзв'язуючого білка (*eno*) у *S. aureus*. Сполуки впливають на ДНК бактерій, зумовлюючи геномну мінливість у метицилін-резистентного золтистого стафілококу.

2. Адамantanвмісна сполука АМ-166 впливає на експресію генів *fliC*, *motB*, *fimA* та *papC*, що забезпечують адгезію до субстрату клітин *E. coli* 311. За дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та KBM-97 спостерігається зміна експресії генів *appB*, *appX*, *malP*, *malZ*, які беруть участь у диханні та енергетичних процесах кишкової палички, що може опосередковано впливати на початкові етапи плівкоутворення.

3. Похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу змінюють транскрипційну активність генів у *P. aeruginosa* 449, що регулюють синтез полісахаридних компонентів матриксу синьогнійної палички (Pel, Psl, альгінату). За їх дії при 0,5 МІК відмічено як пригнічення, так і стимуляція експресії досліджуваних генів у *P. aeruginosa*.

Матеріали даного розділу представлені у наступних публікаціях:

1. Anti-adhesion properties of 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl) benzole against *Escherichia coli* / Hrynychuk N., Bukhtiarova T., Vrynchanu N., Ishchenko L., Vazhnichay E. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. Т. 15, № 6. С. 380–393. <https://doi.org/10.33250/15.06.380>. (Особистий внесок – брала участь у аналізі літературних джерел, проведенні досліджень, аналізі та обговоренні результатів, підготовці тексту статті до публікації).
2. Antibiofilm activity of 4-(adamantyl-1) -1- (1-aminobutyl) benzol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Hrynychuk N., Zelena L., Bukhtiarova T., Vrynchanu N., Ishchenko L., Vazhnichaya E. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*. 2022. Vol. 84, № 3. С. 39–50. <https://doi.org/10.15407/microbiolj84.03.039> (Scopus, Q4). (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, проведення досліджень, аналіз результатів та підготовка тексту статті до публікації).
3. Гуменюк Н. І., Вринчану Н. О., Іщенко Л. М. Вплив похідного адамантану на експресію генів плівкоутворення *P. aeruginosa*. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2023. Т. 17, № 1. С. 44–52. <https://doi.org/10.33250/17.01.044>. (Особистий внесок – брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів, підготовці тексту статті до публікації).
4. Effect of adamantane derivative on expression of biofilm-associated genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Humeniuk N., Zelena L., Vrynchanu N., Ishchenko L., Bukhtiarova T., Korotkij Y., Vazhnichaya E. *Medicine in Drug Discovery*. 2023. Vol. 18. P. 100155. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2023.100155> (Scopus, Q2). (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, проведення досліджень, аналіз та обговорення результатів, підготовка тексту статті до публікації).

5. Гуменюк Н. Антиадгезивні властивості 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил)бензолу щодо *Staphylococcus aureus*. *Innovative Biosystems and Bioengineering*. 2025. Vol. 9, № 2. P. 21–28. <https://doi.org/10.20535/ibb.2025.9.2.313507> (Scopus, Q4). (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, проведення досліджень, аналіз та обговорення результатів, підготовка тексту статті до публікації).

6. Detection of *mecA*, *ica*, *icaA*, *icaD* genes in clinical strain of *Staphylococcus aureus* using polymerase chain reaction / Hrynychuk N. I., Ishchenko L. M., Zelena L. B., Boiko I. O., Vrynchanu N. O. Міжнародний симпозіум зі зменшення біологічної загрози 2021 р. (IBTRS 2021), Віртуальний, 28 червня – 2 липня 2021 р. С. 18.

7. Influence of adamantane derivative KVM-97 on *cidA* gene expression in *Staphylococcus aureus* / Hrynychuk N., Boiko I., Vrynchanu N., Zelena L., Ishchenko L., Korotkyi Yu. “Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology”: materials of III Scientific and practical Conference of young researchers, Kyiv, November 09–11, 2021. Kyiv, Ukraine. 2021. P. 16.

8. Експресія генів *appB*, *appX* у *Escherichia coli* за дії похідного адамантану / Вринчану Н. О., Зелена Л. Б., Гуменюк Н. І. Бойко І. О., Короткий Ю. В. «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології (Пам’яті професора В.В. Дунаєва)»: збірка тез II науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Запоріжжя, 22 листопада 2022 р. Запоріжжя, 2022. С. 58–59.

РОЗДІЛ 6

АНТИВІРУЛЕНТНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОХІДНИХ 4-(1'-АДАМАНТИЛ)-1R-БЕНЗОЛУ

Процес плівкоутворення у бактерій регулюється взаємодією декількох механізмів за участі систем QS, малих молекул РНК (sRNA) та вторинного месенджера c-di-GMP [75]. Системи QS є перспективною мішенню дії антимікробних препаратів, оскільки вплив на їх функціонування призведе до зниження патогенності збудників, включаючи порушення формування біоплівки та продукції факторів вірулентності.

Вплив на патогенність мікроорганізмів та фактори вірулентності нині розглядається як один з перспективних напрямків для лікування пацієнтів з інфекційними захворюваннями, спричиненими, зокрема, полірезистентними штамами мікроорганізмів, оскільки може підвищити чутливість бактерій до АМП та ефективність антибіотикотерапії при інфекційних процесах.

6.1 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на QS-залежні клітинні процеси у *P. aeruginosa*

Важливу роль на етапах інвазії, запалення та при ухиленні мікроорганізмів від імунного захисту відіграють фактори вірулентності (адгезини, ферменти, токсини), які контролюються QS системами. Широкий їх спектр характерний для бактерій *P. aeruginosa*, які віднесені до пріоритетних патогенів щодо необхідності розробки нових антимікробних препаратів та характеризуються природною стійкістю до протимікробних агентів. Тому, для оцінки впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на функціонування QS, гемолітичну, протеазну активність, продукцію піоціаніну та синтез лактонвмісних аутоіндукторів використано клінічний ізолят *P. aeruginosa* 449.

Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на продукцію піоціаніну *P. aeruginosa*.

Одним із факторів протидії антимікробним агентам та імунному захисту грамнегативних бактерій *P. aeruginosa* є продукція піоціаніну, яка регулюється QS. Піоціанін виявляє токсичний вплив на клітини про- та еукаріотів, пошкоджує епітелій та пригнічує проліферацію лімфоцитів [278].

У дослідженнях впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на синтез піоціаніну використано АМП ципрофлоксацин та азитроміцин. Вибір останнього зумовлено його антибіоплівковою активністю щодо *P. aeruginosa*, впливом на фактори вірулентності та функціонування QS [276]. Сполуки та препарати досліджували у субінгібуючих концентраціях – 0,15 МІК та 0,5 МІК. Отримані результати наведено на рис. 6.1.

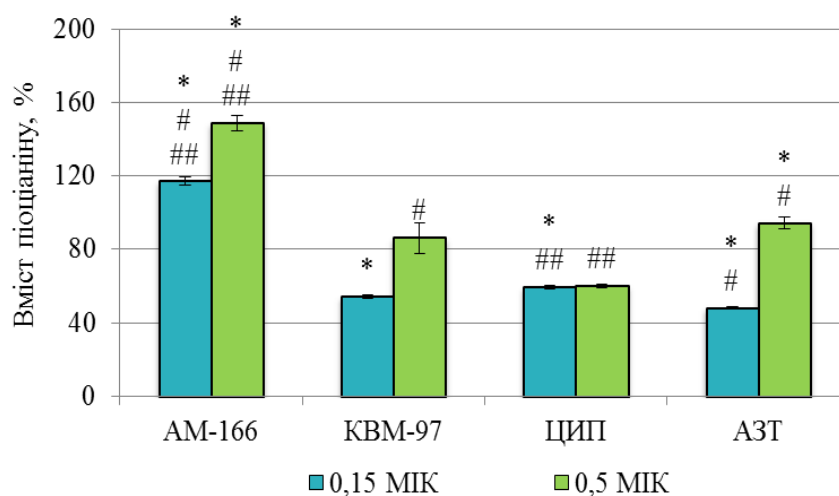


Рис. 6.1 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на синтез піоціаніну *P. aeruginosa* 449 (показники нормалізовано за кількістю клітин, OD_{540}/OD_{630})

Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «ЦІП» – ципрофлоксацин; «АЗТ» – азитроміцин;
3. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
4. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації ципрофлоксацину ($p < 0,05$);
5. «##» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації азитроміцину ($p < 0,05$);
6. Розмір вибірки: $n = 4$.

Встановлено (рис. 6.1), що за дії адамантанвмісної сполуки АМ-166 у субінгібуючих концентраціях спостерігається збільшення кількості піоціаніну у культуральному середовищі *P. aeruginosa* 449 у межах від 17,1 % до 48,6 %, за впливу КВМ-97 – навпаки зменшення у межах від 13,9 % до 45,7 %. Подібну до КВМ-97 інгібувальну активність виявляють ципрофлоксацин та азитроміцин (зменшення кількості піоціаніну у межах від 5,6 % до 51,9 %).

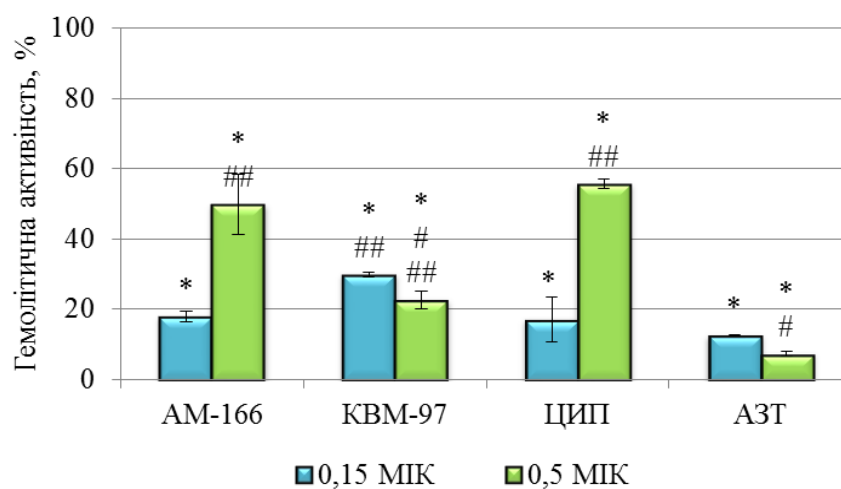
Таким чином, адамантанвмісна сполука АМ-166 підвищує продукцію піоціаніну синьогнійною паличкою, а КВМ-97 за дії у субінгібуючих концентраціях здатна порушувати його синтез. Активність сполуки КВМ-97 у концентрації 0,15 МІК не поступається препаратам порівняння ципрофлоксацину та азитроміцину ($p < 0,05$).

Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на гемолітичну активність P. aeruginosa.

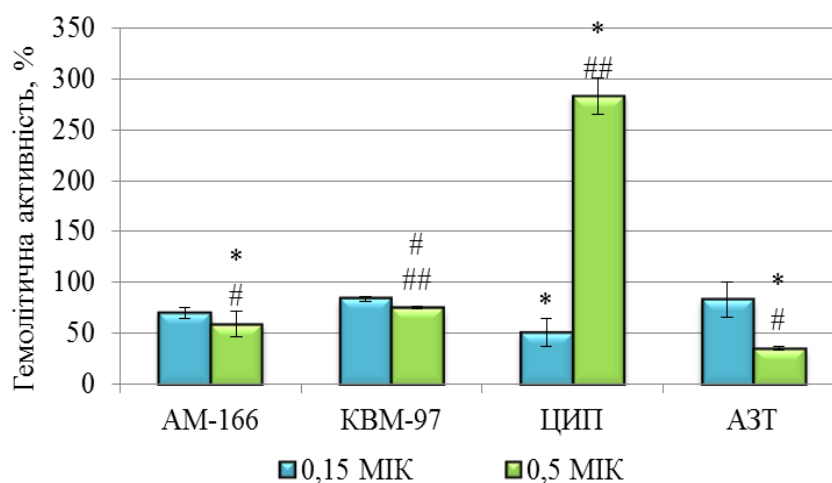
Важливу роль у поширенні інфекції відіграють позаклітинні ферменти з гемолітичною активністю (наприклад, фосфоліпази). Вони характеризуються цитотоксичною дією щодо клітин макроорганізму, гідролізують фосфоліпіди клітинних мембран, сприяють руйнуванню еритроцитів, відіграють роль в внутрішньоклітинній інвазії бактерій *P. aeruginosa* та розвитку інфекційного процесу [85].

Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на позаклітинні та клітинно-асоційовані гемолізینی у тест-штаму *P. aeruginosa* 449 досліджували у субінгібуючих концентраціях – 0,15 МІК та 0,5 МІК. Препаратами порівняння слугували ципрофлоксацин та азитроміцин. Отримані дані наведено на рис. 6.2.

Результати досліджень (рис. 6.2 А) свідчать, що адамантанвмісні сполуки у субінгібуючій концентрації виразно пригнічують гемолітичну активність *P. aeruginosa* 449, пов'язану з позаклітинними ферментами.



А



А

Б

Рис. 6.2 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на гемолітичну активність *P. aeruginosa* 449, обумовлену: А – позаклітинними гемолізинами, Б – клітинно-асоційованими гемолізинами (показники нормалізовано за кількістю клітин, OD_{540}/OD_{630})

Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «ЦИП» – ципрофлоксацин; «АЗТ» – азитроміцин;
3. «*» – відмінності вірогідні по відношенню до контролю ($p < 0,05$);
4. «#» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації ципрофлоксацину ($p < 0,05$);
5. «##» – відмінності вірогідні по відношенню до відповідної концентрації азитроміцину ($p < 0,05$);
6. Розмір вибірки: $n = 4$.

Встановлено (рис. 6.2 А), що за наявності в інкубаційному середовищі сполуки АМ-166 гемолітична активність *P. aeruginosa* 449 знижується у межах від 50,1 % до 82,0 %, за дії KBM-97 – у межах від 70,1 % до 77,3 % ($p < 0,05$, порівняно з контролем). Подібний ефект відмічено і за дії АМП ципрофлоксацину та азитроміцину.

Згідно з отриманими даними (рис. 6.2 Б), гемолітична активність *P. aeruginosa* 449, обумовлена клітинно-асоційованими гемолізінами, за впливу АМ-166 та KBM-97 зменшується у межах від 16,9 % до 41,0 %. Виявлені зміни за дії АМ-166 (0,15 МІК) та KBM-97 статистично недостовірні порівняно з контролем ($p > 0,05$). Ципрофлоксацин при 0,15 МІК та азитроміцин у концентрації 0,5 МІК знижують гемолітичну активність *P. aeruginosa* 449 на 49,4 % та 65,0 %, відповідно ($p < 0,05$).

Таким чином, похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу здатні пригнічувати гемолітичну активність синьогнійної палички, опосередковану позаклітинними гемолізінами, та за своєю дією не поступаються препаратам порівняння у концентрації 0,15 МІК (АМ-166) або переважають таку ципрофлоксацину при 0,5 МІК ($p < 0,05$). Сполуки АМ-166 та KBM-97 не виявляють виразного інгібуючого впливу на активність клітинно-асоційованих гемолізинів *P. aeruginosa* 449, окрім АМ-166 при 0,5 МІК.

Визначення протеазної активності P. aeruginosa за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу.

Патогенність штамів *P. aeruginosa*, окрім інших факторів вірулентності, забезпечують протеолітичні ферменти (лужна протеаза, протеаза LasA, еластаза LasB). Лужна протеаза розщеплює трансфери, білки комплементу (C1q, C2, C3), цитокіни (IFN- γ , IFN- α), компоненти позаклітинного матриксу (лімінін), зменшує активацію Toll-подібного рецептора, забезпечуючи агресивність патогенну. Еластаза LasB руйнує білки позаклітинного матриксу (еластин, колаген, фібрин) та компонентів імунної системи; протеаза LasA посилює еластолітичну активність LasB та розщеплює багаті на гліцин білки організму

господаря. Протеазна активність *P. aeruginosa* відіграє значну роль в пошкодженні клітин та тканин, інвазії збудника та його ухиленні від імунного захисту організму людини [85].

Вплив адамантанвмісних сполук на протеазну активність *P. aeruginosa* 449 досліджували у субінгібуючих концентраціях та оцінювали за діаметрами зон протеолізу. Отримані результати дослідження наведено на рис. 6.3.

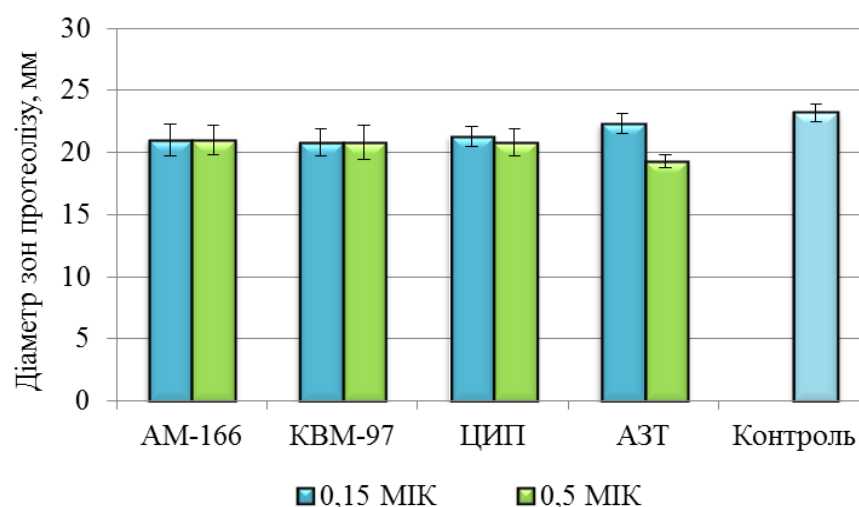


Рис. 6.3 Протеазна активність *P. aeruginosa* 449 за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. «ЦИП» – ципрофлоксацин; «АЗТ» – азитроміцин;
2. Розмір вибірки: $n = 4$.

Отримані результати свідчать (рис. 6.3), що сполуки АМ-166 та КВМ-97 не впливають на протеазну активність *P. aeruginosa* 449. Подібні результати отримано за впливу АМП ципрофлоксацину та азитроміцину.

Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на синтез лактонвмісних сполук у P. aeruginosa.

Важливу роль у патогенності мікроорганізму та розвитку інфекційного процесу відіграє функціонування систем QS, яке забезпечується зв'язуванням сигнальних молекул аутоіндукторів (AI) з відповідними рецепторними білками, що запускає транскрипцію цільових генів. Для багатьох систем QS AI слугують

лактонвмісні сполуки [81, 279]. Порушення їх синтезу є важливим аспектом для ефективної антибіотикотерапії при запальних процесах, спричинених синьогнійною паличкою.

Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та КВМ-97 на продукцію лактонвмісних сполук *P. aeruginosa* досліджували у концентрації 0,5 МІК. Отримані результати наведено на рис. 6.4.

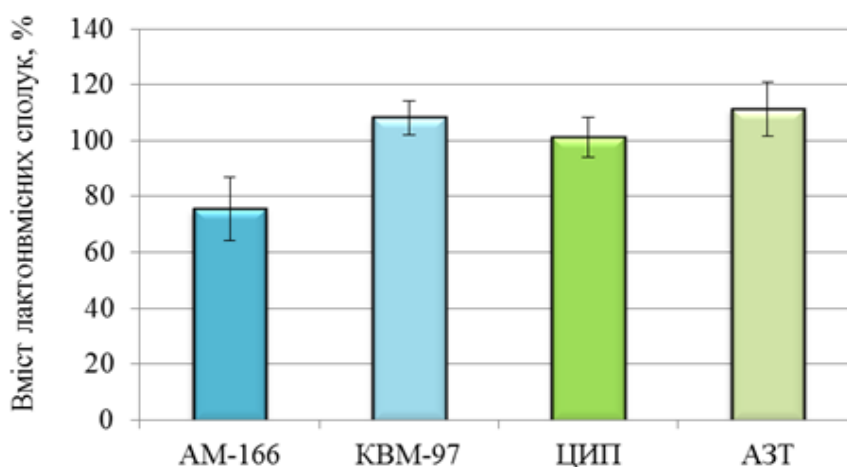


Рис. 6.4 Продукція лактонвмісних сполук (%) у *P. aeruginosa* 449 за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. Контроль прийнято за 100,0 %;
2. «ЦИП» – ципрофлоксацин; «АЗТ» – азитроміцин;
3. Розмір вибірки: $n = 7$.

Результати експериментів (рис. 6.4) свідчать, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу у субінгібуючій концентрації суттєво не впливають на продукцію лактонвмісних сполук *P. aeruginosa* 449. Також і виявлені зміни за дії АМП не є статистично достовірними порівняно з контролем ($p > 0,05$).

Таким чином, похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та КВМ-97 виявляють антивірулентні властивості щодо *P. aeruginosa* 449, їх вплив на фактори вірулентності синьогнійної палички може свідчити про потенційну можливість порушувати регуляторні системи QS, що потребує проведення поглиблених молекулярних досліджень.

6.2 Експресія генів, що регулюють патогенність *P. aeruginosa* за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Важлива роль систем міжклітинних взаємодій QS у *P. aeruginosa* (Las, Rhl, PQS та IQS) в патогенності збудника, плівкоутворенні та розвитку інфекційного процесу робить їх важливою мішенню для дослідження перспективних сполук з антибіоплівковою активністю [81, 279, 280]. В експериментах встановлено вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на формування біоплівки, фактори адгезії та фактори вірулентності *P. aeruginosa* (продукцію піоціаніну та гемолітичну активність), що може свідчити про порушення функціонування регуляторних систем QS. Для встановлення механізму цього ефекту на наступному етапі оцінювали вплив сполук на експресію генів, відповідальних за функціонування систем QS та синтез факторів вірулентності.

Отримані результати виявлення генів QS *lasI*, *lasR*, *rhlR*, *pqsR*, генів, що регулюють синтез факторів вірулентності, зокрема алкалін металопротеїнази (гена *aprA*), екзоферменту S (*exoS*), екзотоксину A (*exoA*, *toxA* – попередник екзотоксину A) у *P. aeruginosa* 449, представлено на рис. 6.5 – 6.6.

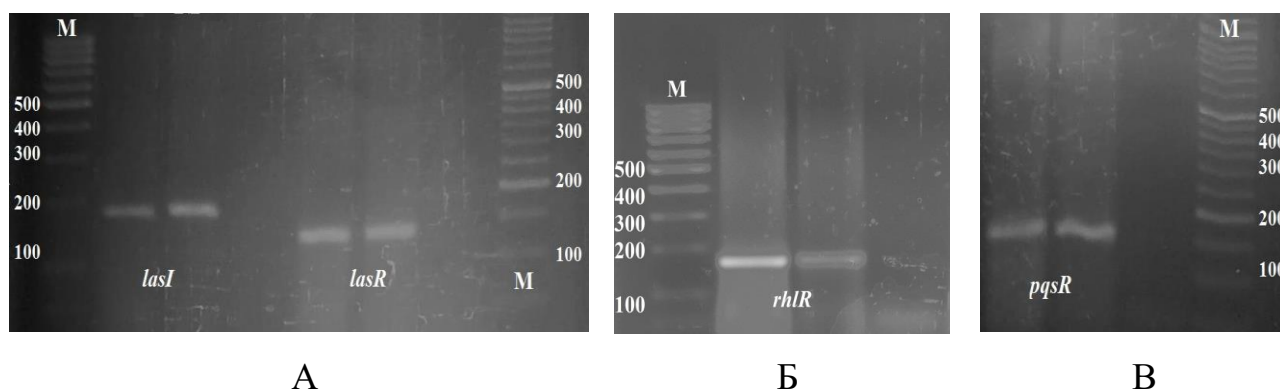


Рис. 6.5 Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації з праймерами до генів *lasI*, *lasR* (А), *rhlR* (Б), *pqsR* (В), що регулюють системи Quorum sensing у *P. aeruginosa* 449

Примітка. «М» – ДНК-маркер молекулярних мас.

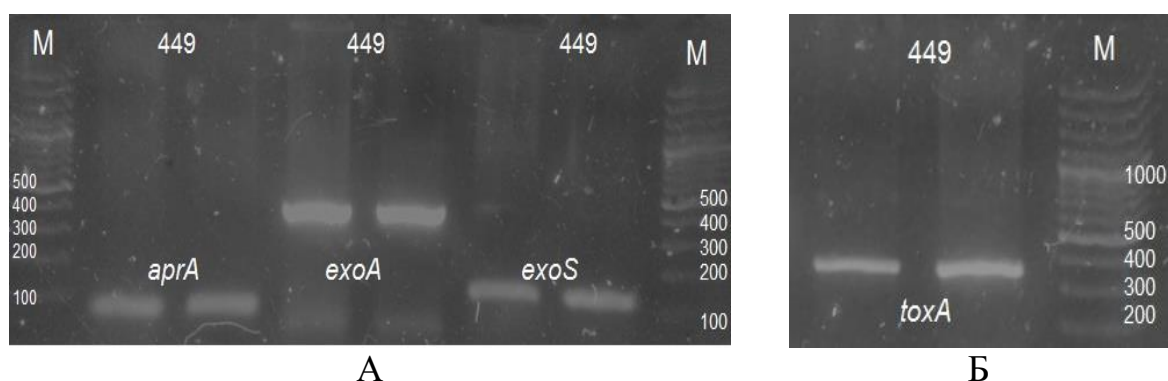


Рис. 6.6 Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації з праймерами до генів *aprA*, *exoS*, *exoA* (А), *toxA* (Б), що регулюють синтез факторів вірулентності у *P. aeruginosa* 449

Примітки:

1. «М» – ДНК-маркер молекулярних мас;
2. «449» – досліджуваний тест-штам *P. aeruginosa* 449.

Встановлено (рис. 6.5 – 6.6), що у клінічного штаму *P. aeruginosa* 449 наявні гени *lasI* (176 п. н.), *lasR* (133 п. н.), що регулюють функціонування Las-системи QS, *rhlR* (160 п. н.) – системи Rhl, *pqsR* (142 п. н.) – PQS-системи, гени *aprA* (78 п. н.), *exoA* (397 п. н.), *exoS* (121 п. н.), *toxA* (352 п. н.), відповідальні за синтез факторів вірулентності.

За допомогою ПЛР в реальному часі оцінено вплив сполук АМ-166 та KBM-97 (0,5 МІК) на транскрипційну активність виявлених генів. Результати дослідження представлені на рис. 6.7 – 6.8.

Встановлено (рис. 6.7), що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та KBM-97 у субінгібуючій концентрації впливають на QS системи.

За дії KBM-97 транскрипційна активність генів *lasI*, *lasR* та *pqsR* майже не виявляється (значення $2^{-\Delta\Delta C_t}$ знаходяться у межах від 0,01 ум. од. до 0,02 ум. од.), за дії АМ-166 – знижується у межах від 3,2 до 5,5 разів. За їх впливу експресія гена *rhlR* збільшується у 3,1 та 2,2 раза, відповідно, порівняно з контролем.

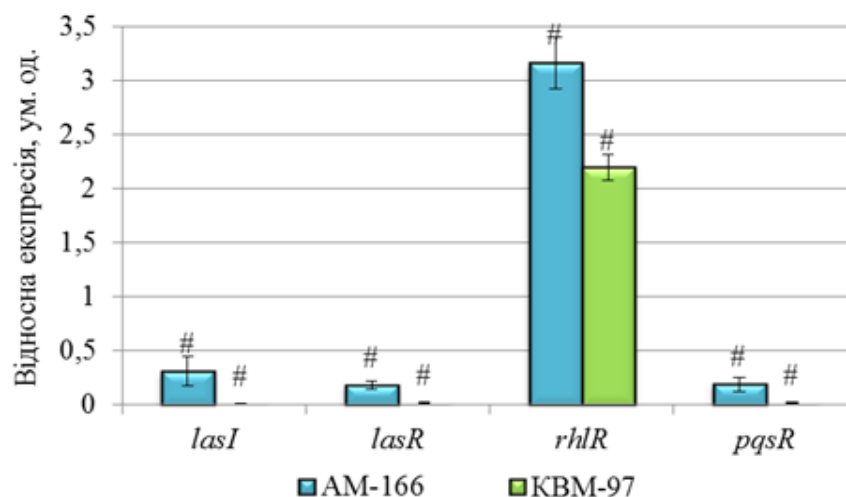


Рис. 6.7 Відносний рівень експресії генів ($2^{-\Delta C_t}$), що регулюють системи Quorum sensing у *P. aeruginosa* 449, за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. Контроль прийнято за 1;
2. «#» – відмінності вірогідні порівняно з контролем ($p < 0,05$);
3. Розмір вибірки: $n = 4$.

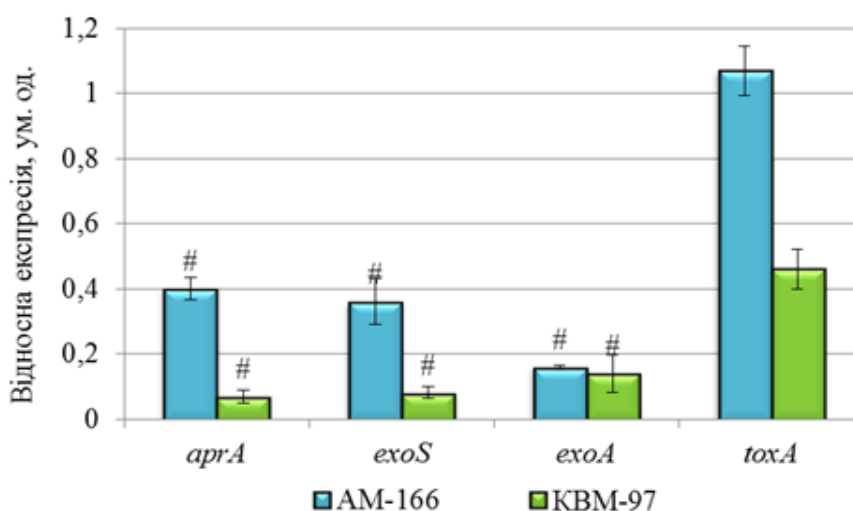


Рис. 6.8 Відносний рівень експресії генів ($2^{-\Delta C_t}$), що регулюють синтез факторів вірулентності у *P. aeruginosa* 449, за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. Контроль прийнято за 1;
2. «#» – відмінності вірогідні порівняно з контролем ($p < 0,05$);
3. Розмір вибірки: $n = 4$.

Отримані дані свідчать (рис. 6.8), що досліджувані сполуки змінюють експресію генів токсиноутворення. Так, за впливу АМ-166 та КВМ-97 відмічено зменшення експресії *aprA*, *exoS* та *exoA* у більше ніж 2 рази порівняно з контролем ($p < 0,05$). Більш виражена інгібуюча активність відмічена за дії КВМ-97. Виявлені зміни у експресії гена *toxA* статистично не достовірні ($p > 0,05$).

Таким чином, антибіоплівкова дія похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу може бути зумовлена впливом на транскрипційну активність генів, що регулюють функціонування Las-, Rhl- та PQS-системи у *P. aeruginosa* 449. Сполуки АМ-166 та КВМ-97 здатні пригнічувати синтез факторів вірулентності алкалін металопротеїнази, екзоферменту S та екзотоксину A, про що свідчить пригнічення експресії відповідних генів *aprA*, *exoS* та *exoA*. Виявлені антивірулентні властивості похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу є важливою характеристикою для оцінки перспективності створення нових лікарських засобів на їх основі для лікування пацієнтів з інфекційними захворюваннями, спричиненими полірезистентними штамми мікроорганізмів.

6.3 Експресія генів, що регулюють функціонування ефлюксних pomp у *P. aeruginosa*

Системи Quorum sensing у мікроорганізмів, окрім синтезу факторів вірулентності, регулюють функціонування ефлюксних pomp, які впливають на транспорт аутоіндукторів та експресію багатьох генів (включаючи, гени, що регулюють плівкоутворення). Так, надмірна експресія MexAB-OprM RND помпи призводить до зниження продукції сигнальних молекул, MexEF-OprN та MexCD-OprJ здатні виводити попередників AI PQS системи, що призводить до дефектної відповіді QS у тих мутантів, які надмірно експресують ці помпи [281–285]. Тобто, RND ефлюксні системи здатні відігравати важливу роль у

модуляції відповіді QS *P. aeruginosa* через зміни у синтезі або екструзії різних аутоіндукторів та/або їх попередників.

У попередніх дослідженнях встановлено, що сполука KBM-97 здатна змінювати активність ефлюксних pomp у штаму *P. aeruginosa* 449 [151]. Для з'ясування механізму цього ефекту за допомогою ПЛР-аналізу оцінено вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на експресію генів *mexB*, *mexY*, *mexR*, що кодують синтез білкових компонентів ефлюксних pomp, з використанням двох клінічних ізолятів *P. aeruginosa* 449 та *P. aeruginosa* 1366 (полірезистентний штам). Отримані результати виявлення генів наведено на рис. 6.9.

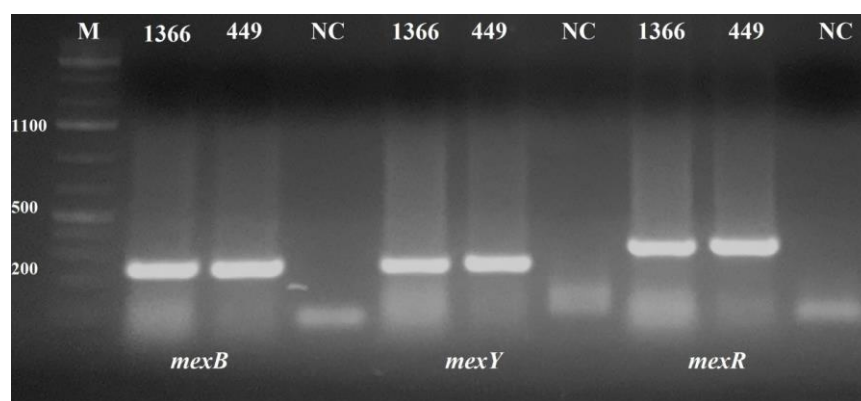


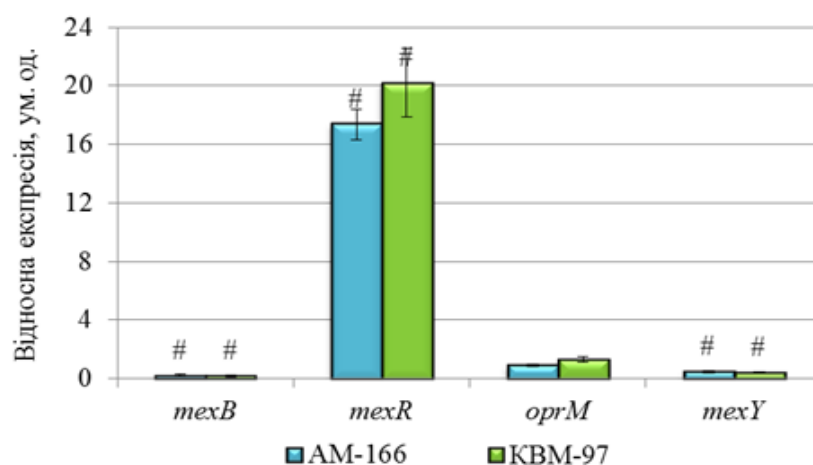
Рис. 6.9 Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації з праймерами до генів *mexB*, *mexY*, *mexR*, що регулюють ефлюксні помпи у *P. aeruginosa*

Примітки:

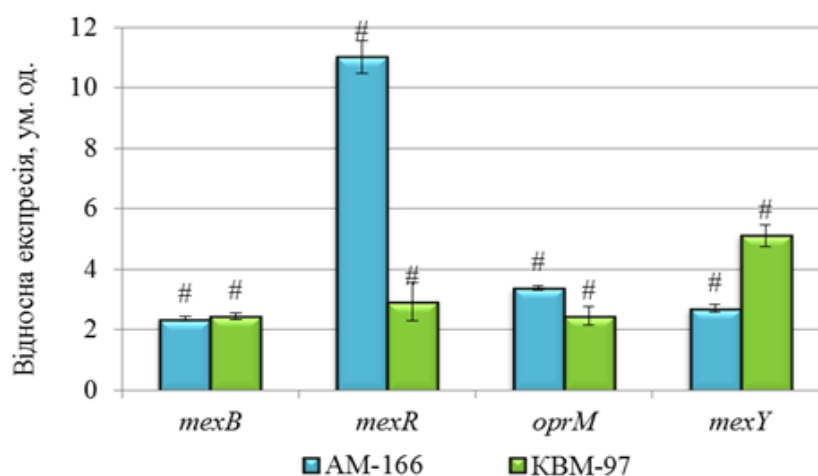
1. «М» – ДНК-маркер молекулярних мас;
2. «1366» – досліджуваний тест-штам *P. aeruginosa* 1366;
3. «449» – досліджуваний тест-штам *P. aeruginosa* 449;
4. «NC» – негативний контроль.

Встановлено (рис. 6.9), що у тест-штамів *P. aeruginosa* 449 та *P. aeruginosa* 1366 наявні гени *mexB* (244 п. н.), *mexY* (250 п. н.), *mexR* (239 п. н.), які відповідають за функціонування ефлюксних pomp родини RND. Ген *mexB* є внутрішньомембранним білком ефлюксного комплексу MexAB-OprM, *mexY* – MexXY-OprM. MexR – транскрипційний репресор оперону *mexAB-oprM*.

Дослідження впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на активність транспортних систем є однією зі стратегій подолання резистентності *P. aeruginosa* до АМП та підвищення ефективності антибіотикотерапії. За допомогою ПЛР в реальному часі оцінено вплив АМ-166 та КВМ-97 (0,5 МІК) на транскрипційну активність генів *mexB*, *mexY*, *mexR* та *oprM* у *P. aeruginosa* з різною чутливістю до АМП. Результати дослідження представлені на рис. 6.10.



А



Б

Рис. 6.10 Відносний рівень експресії генів ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), що регулюють функціонування ефлюксних pomp у *P. aeruginosa* 449 (А) та *P. aeruginosa* 1366 (Б), за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. Контроль прийнято за 1;
2. «#» – відмінності вірогідні порівняно з контролем ($p < 0,05$);
3. Розмір вибірки: $n = 4$.

Встановлено (рис. 6.10 А), що сполуки АМ-166 та КВМ-97 у субінгібуючій концентрації впливають на активність MexAB-OprM помпи у штаму *P. aeruginosa* 449. За їх дії відмічено зниження транскрипційної активності гена *mexB* у 4,3 та 5,6 раза та активацію репресора помпи *mexR* у 17,4 та 20,2 раза, відповідно. Сполуки пригнічують у 2,2 раза експресію гена *mexY* ($p < 0,05$), структурного компонента оперону *mexXY-oprM*. За дії адамантанвмісних сполук експресія гена *oprM* статистично достовірно не змінюється, порівняно з контролем ($p > 0,05$).

Отримані результати свідчать (рис. 6.10 Б), що дія досліджуваних сполук відрізняється залежно від штаму мікроорганізму та його профілю чутливості. Сполуки АМ-166 та КВМ-97 збільшують транскрипційну активність генів, що регулюють синтез структурних компонентів MexAB-OprM та MexXY-OprM pomp у резистентного до АМП штаму *P. aeruginosa* 1366, а експресія досліджуваних генів збільшується більше ніж у 2,4 раза ($p < 0,05$).

Таким чином, похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу здатні порушувати функціонування ефлюксних pomp у бактерій, пригнічуючи експресію ключових генів. Проте, варто відмітити, що активність досліджуваних сполук залежить від штаму та його антибіотикочутливості, що може бути пов'язано з активацією різних регуляторних механізмів, що забезпечують стійкість мікроорганізмів до АМП.

Висновки до розділу 6

1. Встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 та КВМ-97 виявляють антивірулентні властивості щодо *P. aeruginosa*, зумовлюючи зміни у продукції піоціаніну та гемолізинів.

2. Сполуки АМ-166 та КВМ-97 змінюють транскрипційну активність генів у *P. aeruginosa*, що регулюють синтез факторів вірулентності (продукція алкалін металопротеїнази, екзотоксину А, екзоферменту S), функціонування систем QS (Las, Rhl, Pqs) та ефлюксних pomp родини RND. Активність

досліджуваних сполук на експресію генів ефлюксних pomp залежить від штаму та його антибіотикочутливості.

3. Отримані дані щодо впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на QS-системи та вірулентність синьогнійної палички свідчать про перспективність проведення подальших поглиблених досліджень фармакодинамічних особливостей *in vivo* на моделях різних інфекційних захворювань, пов'язаних з біоплівкою, фармакокінетичних властивостей для оцінки доцільності створення ефективних та безпечних антимікробних препаратів на їх основі.

Матеріали даного розділу представлені у наступних публікаціях:

1. Біоплівки. Сучасний стан та перспективи антимікробної терапії / Вринчану Н. О., Дудікова Д. М., Гринчук Н. І., Недашківська В. В. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2019. № 5. С. 311–321. <https://doi.org/10.33250.13.05.311>. (Особистий внесок – аналіз літературних джерел та підготовка тексту статті до публікації).

2. Антивірулентні властивості похідного адамантану 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил) бензолу щодо *Pseudomonas aeruginosa* / Гуменюк Н. І., Вринчану Н. О., Зелена Л. Б., Іщенко Л. М., Бухтіарова Т. А., Бойко І. О. *Innovative Biosystems and Bioengineering*. 2023. Vol. 7, № 3. Р. 44–54. <https://doi.org/10.20535/ibb.2023.7.3.282006>. (Scopus, Q4). (Особистий внесок – брала участь у аналізі літературних джерел, проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, підготовці тексту статті до публікації).

3. Вплив адамантанвмісної сполуки на патогенність *Pseudomonas aeruginosa* / Гринчук Н. І., Вринчану Н. О., Дудікова Д. М., Недашківська В. В. Матеріали IV Міжнар. наук. практ. конф. «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» у 2-х т., м. Харків, 12–13 березня 2020 р. Харків, НФаУ, 2020. – Т. 2. С. 199–201.

4. Гринчук Н. І., Вринчану Н. О., Короткий Ю. В. Вплив адамантанвмісної сполуки на гемолітичну активність *Pseudomonas aeruginosa*. Науково-

практична конференція «Другий національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 175-річчю з дня народження І. І. Мечникова», м. Харків, 16–17 вересня 2020 р. Харків, 2020. С. 35–37.

5. Експресія ефлюкс-асоційованого гена *oprM Pseudomonas aeruginosa* за дії похідного адамантану / Гуменюк Н. І., Вринчану Н. О., Іщенко Л. М., Недашківська В. В., Короткий Ю. В. Матеріали III науково-практичної міжнародної дистанційної конференції «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині», м. Харків, 24 березня 2023 р. Харків, 2023. С. 77–78.

6. Вплив похідного адамантану на експресію генів токсиноутворення *P. aeruginosa* / Гуменюк Н. І., Зелена Л. Б., Вринчану Н. О., Недашківська В. В., Бойко І. О. Міжнародна науково-практична конференція «Продовольча та екологічна безпека в умовах війни та повоєнної відбудови: виклики для України і світу», м. Київ, 25 травня 2023 р. Київ. 2023. С. 58–60.

7. Вплив похідних амінопропанолу на експресію генів токсиноутворення *Pseudomonas aeruginosa* / Вринчану Н. О., Зелена Л. Б., Гуменюк Н. І., Короткий Ю. В. Міжнародна науково-практична конференція «Експериментальна та клінічна фармакологія», присвячена 100-річчю кафедри фармакології НФаУ, м. Харків, 23–24 жовтня 2024 р. Харків. 2024. С. 91–92.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Бактеріальні біоплівки на сьогодні залишаються актуальною проблемою, оскільки часто є причиною неефективності антимікробної хіміотерапії при лікуванні пацієнтів з хронічними, рецидивуючими інфекціями, збільшення матеріальних затрат на лікування, летальності пацієнтів. За останні роки зросла кількість інфекцій, спричинених біоплівками; їх частка сягає 80 % [19, 286–288]. Особливо небезпечними є мікробні спільноти, сформовані стійкими до дії різних груп АМП бактеріями, серед яких патогени групи ESKAPE – *S. aureus*, *E. coli* та *P. aeruginosa* [42].

Процес формування біоплівок різними видами мікроорганізмів, зокрема грампозитивними та грамнегативними, має свої особливості у механізмах регуляції, факторах адгезії, структурних компонентах матрикса тощо. Наприклад, регуляція плівкоутворення за участі вторинного месенджера c-di-GMP є більш характерна для грамнегативних бактерій, функціонування систем QS є спільним регуляторним механізмом для різних видів бактерій [61]. Розуміння особливостей формування біоплівок як одновидових, так і полімікробних, їх ролі в інфекційних процесах дасть можливість розробити шляхи та стратегії підвищення ефективності антимікробної хіміотерапії, особливо у пацієнтів з хронічними, рецидивуючими захворюваннями мікробного генезу. Перспективними для розробки нових ефективних АМП є адамантанвісні сполуки, оскільки вони виявляють широкий спектр біологічної активності, зокрема антимікробну дію щодо планктонних мікроорганізмів та біоплівок [10–12, 119].

Дизайн досліджень окремих аспектів механізму антибіоплівкової активності похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу щодо бактеріальних біоплівок *S. aureus*, *E. coli* та *P. aeruginosa* включав вивчення впливу сполук на різні етапи плівкоутворення, життєздатність бактерій у складі біоплівки, формування клітин-персистерів, гідрофобність бактеріальної поверхні, різні типи міграції (для грамнегативних мікроорганізмів), вміст білкових та полісахаридних

компонентів матриксу біоплівки, проникність адамантанвмісних сполук через матрикс біоплівки та оцінку змін експресії ключових генів, які беруть участь у плівкоутворенні.

Життєвий цикл біоплівки включає декілька етапів, початковим з яких є прикріплення планктонних клітин до поверхні. Адгезія до субстрату здійснюється за участі різних типів адгезинів, які здатні розпізнавати великі глікопротеїни, що знаходяться в плазмі хазяїна та позаклітинному матриксі. Цей процес у золотистого стафілокока опосередковується експресією генів *sna*, *ebpS*, *eno*, *fib*, *fnbA*, *fnbB*, що регулюють синтез поверхневих білків MSCRAMMs та активацією оперона *icaADBC*, з експресією якого пов'язана продукція PIA – основного фактора міжклітинної адгезії бактеріальних клітин на початкових етапах формування біоплівки [4, 60, 63]. Так, фібриногензв'язуючий білок Fib, що кодується геном *fib*, сприяє колонізації ранової поверхні, імплантів, спричиняючи пристрій-асоційовані інфекції.

Враховуючи важливість етапу адгезії клітин до поверхні, порушення плівкоутворення на початкових етапах є однією із перспективних стратегій у боротьбі з хронічними інфекціями. Розробка нових ефективних препаратів можлива як за розуміння механізмів утворення біоплівки, так і змін, що спостерігаються у мікробних угрупованнях за їх дії.

При дослідженні антибактеріальної активності AM-166 та KBM-97 щодо біоплівок MRSA (штам *S. aureus* 222 з виявленим геном *mecA*, який кодує синтез додаткового пеніцилінзв'язуючого білка ПЗБ2а та забезпечує стійкість до метициліну [208, 267]) було встановлено, що сполуки запобігають їх утворенню у концентраціях 0,5 МІК та 5,0 МІК.

Згідно з отриманими результатами молекулярних досліджень (рис. 1) антибіоплівова дія похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу пов'язана з пригніченням експресії генів, відповідальних за плівкоутворення, міжклітинну адгезію бактерій (*icaA*, *icaD*), колонізацію мікроорганізмів (*ebpS*, *eno*), адгезію до біотичної поверхні (*clfB*, *fib*) та інвазію (*fnbB*) [4], збільшенням експресії гена *icaR* – негативного регулятора оперону *icaADBC*.

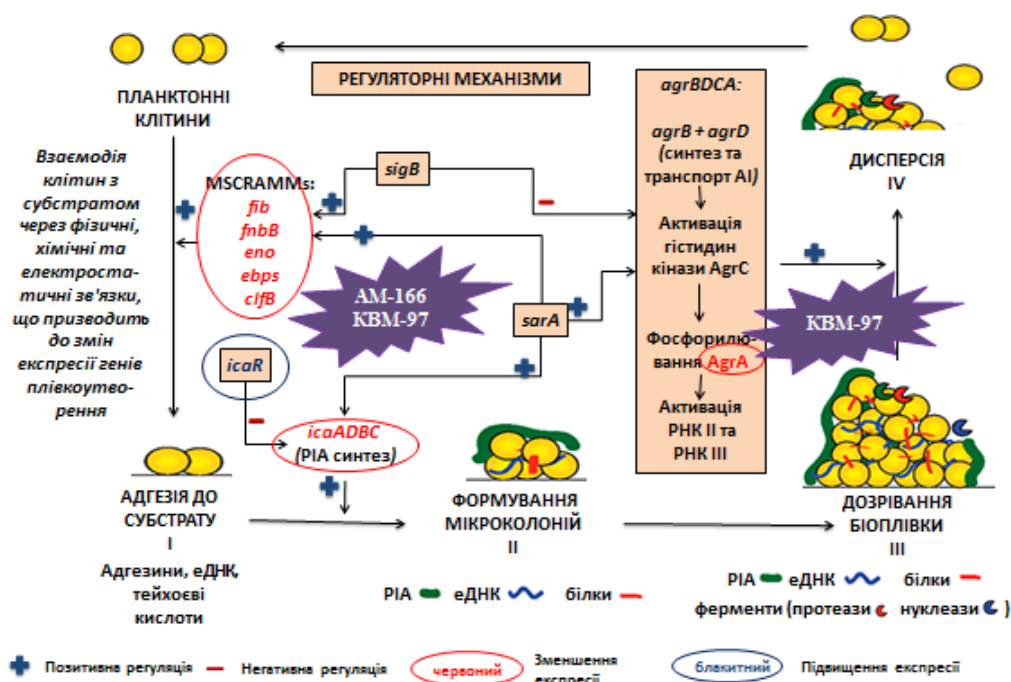


Рис. 1 Фармакодинамічні особливості антибіоплівкової дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу щодо *S. aureus* (схема побудована згідно з [66, 289])

Досліджувані гени *icaA* та *icaD* є ключовими у синтезі PIA – основного міжклітинного адгезина та полісахаридного компонента матриксу біоплівки *S. aureus*, який відіграє важливу роль у формуванні біоплівки, зокрема у міжклітинній адгезії клітин та накопиченні біомаси біоплівки. Експресія гена *icaA* забезпечує синтез фермента N-ацетилглюкозамінтрансферази, за участі якого UDP-N-ацетилглюкозамін перетворюється на поліацетилглюкозамін – попередника PIA [65]. Продуктом гена *icaD* є шаперонний білок, який значно посилює ферментативну активність N-ацетилглюкозамінтрансферази та утворення поліацетилглюкозаміну [66]. Зниження експресії генів *icaA* та *icaD* може призвести до порушення продукції PIA та, як наслідок, пригнічення формування біоплівки [290]. Згідно з даними літератури [291], подібно до дії AM-166 та KBM-97, пригнічення експресії генів *icaA* та *icaD* у MRSA виявлено у транс-циннамальдегіду за дії субінгібуючих концентрацій.

Регуляторним геном *icaADBC*-оперону є *icaR*, який пригнічує його експресію. Мутації у негативному регуляторі *icaR* призводять до гіперпродукції PIA та посиленого формування біоплівок клітинами *S. aureus* [292], а

збільшення його експресії (як спостерігається за дії AM-166 та KBM-97) може забезпечувати пригнічення генів *ica*, а також антибіоплівковий ефект сполук щодо MRSA. Подібний механізм активності щодо біоплівок *S. aureus* було виявлено у неантимікробного препарату цинакальцету, за дії якого відмічено зміни у експресії *icaR* [293]. Іншими дослідниками було зареєстровано пригнічення плівкоутворення *S. aureus* через вплив на експресію генів *icaADBC*-оперона за дії куркуміну та АМП лінезоліду [294, 295]. Варто відмітити, що на противагу похідним 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу AM-166 та KBM-97, куркумін знижував транскрипційну активність генів *icaA*, *icaB*, *icaD*, не змінюючи експресії регулятора *icaR*.

Окрім *icaR*, важливими регуляторними генами формування біоплівки *S. aureus* є *sarA* та оперон *agrBDCA* системи QS. SarA – це ДНК-зв'язуючий білок, необхідний для транскрипції оперону *ica* та синтезу PIA/PNAG під час формування біоплівки *S. aureus* [66, 289]. За дії AM-166 та KBM-97 спостерігається незначне збільшення відносного рівня експресії *sarA*, проте, отримані результати щодо зниження транскрипційної активності генів *ica* вказують на те, що антибіоплівковий ефект сполук не пов'язаний з дією на транскрипційний регулятор SarA [63, 66, 289].

Система QS Agr у золотистого стафілокока кодується опероном *agrBDCA* (гени *agrB*, *agrD*, *agrC*, *agrA*) та відіграє роль у дисемінації клітин з біоплівки. Гени *agrB* та *agrD* регулюють синтез пептидних аутоіндукторів (AIP). Коли досягається відповідна їх щільність, активується гістидинкіназа AgrC, яка фосфорилує білок AgrA. Останній зв'язується з промоторами P2 та P3, які впливаючи на РНК II та РНК III, беруть участь у синтезі AIP та факторів вірулентності, зокрема протеаз та нуклеаз, що призводять до деградації матриксу та вивільнення бактеріальних клітин [66, 289]. Результати дослідження показали, що лише сполука KBM-97 знижує транскрипційну активність гена *agrA*, що може призводити до порушення плівкоутворення, синтезу факторів вірулентності та токсинів, що викликають запальний процес [296]. У літературі дані щодо впливу АМП на рівень експресії *agrA*

суперечливі, що вказує на деякі досі невідомі регуляторні механізми формування біоплівки [297]. Було показано [298], що мупіроцин у субінгібуючих концентраціях підвищує експресію генів *agrA* та *cidA* (регулює вивільнення еДНК) у MRSA та стимулює формування біоплівок. Це дозволяє припустити, що виявлені зміни в експресії гена *agrA* та пригнічення транскрипційної активності гена *cidA* за дії KBM-97 можуть бути пов'язані з антибіоплівковим ефектом щодо *S. aureus*. Слід відмітити, що система Agr позитивно регулює транскрипційну активність гена *cidA*, відповідального за лізис клітин та вивільнення еДНК – ключового структурного компонента біоплівок, що еДНК захищає бактерії від імунної системи макроорганізму та дії АМП, а адсорбуючись на поверхні клітини, сприяє адгезії бактерій до абіотичних поверхонь [66].

У проведених дослідженнях вперше було встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу обумовлюють геномну мінливість у *S. aureus* (виявлено 3 ДНК-фрагмента у діапазоні 400–500 п. н. та варіабельність у діапазоні 1000–2000 п. н.). Ці дані свідчать про можливий селективний тиск адамантанвмісних сполук, що може сприяти появі штамів стафілокока з новими генетичними ознаками [299, 300].

Ключову роль в адгезії золотистого стафілокока до біотичної поверхні (білки крові людини, сполучна тканина, епітеліальні клітини) відіграють поверхнево-асоційовані білки MSCRAMMs (пластівцевоутворюючі фактори А, В (кодуються генами *clfA*, *clfB*), фібрoneктинзв'язуючі білки А, В (*fnbA*, *fnbB*), фібриногензв'язуючий білок (*fib*), лімінінзв'язуючий білок (*eno*), колагензв'язуючий білок (*sna*), еластинзв'язуючий білок (*ebps*) [4, 60, 63, 64] та білок А [301, 302]. Згідно з результатами дослідження, похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу AM-166 та KBM-97 значно знижують рівень відносної експресії генів адгезії *clfB*, *fib*, *fnbB*, *ebpS* та *eno* у MRSA. Це може призвести до порушення першого етапу плівкоутворення та колонізації тканин організму людини клітинами *S. aureus*. Пригнічення експресії генів, відповідальних за синтез поверхневих білків-адгезинів у золотистого стафілокока було відмічено і

за дії природних речовин [303]. Показано [110, 304, 305], що впливом на транскрипційну активність генів адгезії реалізується антибіоплівков активність даптоміцину, тигецикліну, протималярійного препарату артезунату та органічного барвника алізарину щодо золотистого стафілокока.

Похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу виявляють антибіоплівкову активність щодо представників грамнегативних бактерій *E. coli* та *P. aeruginosa*, проте механізм їх дії, порівняно з грампозитивними бактеріями, може відрізнятися. Відмінності пов'язані з регуляторними механізмами плівкоутворення та структурою матриксу біоплівки [61, 306, 307].

Встановлено, що сполука АМ-166 в усіх досліджуваних концентраціях пригнічує перші етапи плівкоутворення *E. coli*, зменшуючи біомасу біоплівки (за дії у межах від 0,15 МІК до 5,0 МІК) та кількість метаболічно активних клітин (при 0,5 – 5,0 МІК). Сполука КВМ-97 також виявляє інгібуючий ефект щодо біоплівки *E. coli* 311, проте у концентраціях, вищих за 1,0 МІК. Сполука АМ-166 за антибіоплівковою активністю наближається або переважає таку АМП ципрофлоксацину та меропенему. Варто відмітити, що КВМ-97 за дії 0,15 МІК та 0,25 МІК стимулює формування біоплівки *E. coli* 311.

Досліджувані сполуки АМ-166 та КВМ-97 також виявляють антисиньогнійну активність щодо біоплівки бактерій, за їх впливу відмічено зниження їх біомаси та життєздатності клітин *P. aeruginosa* 449 (окрім КВМ-97 при 0,15 МІК). Сполуки при 0,25 МІК та 0,5 МІК за антибіоплівковою дією переважають ципрофлоксацин і меропенем, за дії у концентраціях, що перевищують 1,0 МІК, їх активність подібна досліджуваним АМП.

Отже, показано, що дослідження антибіоплівкової активності сполук у субінгібуючих концентраціях має важливе значення, оскільки така дія може мати як інгібувальний, так і стимулюючий ефект. Так, згідно з даними літератури збільшення плівкоутворення бактерій спостерігається за дії субінгібуючих концентрацій АМП різних груп (β -лактами, карбапенемами, фторхінолони) [219, 226, 227, 247] щодо біоплівки грампозитивних та грамнегативних бактерій. Посилення плівкоутворення мікроорганізмами може

бути обумовлене захисною реакцією клітин на дію АМП та пов'язане зі зміною рівнів вторинного месенджера c-di-GMP, експресії генів, відповідальних за функціонування QS чи синтез компонентів матриксу біоплівки. Ще одним механізмом стимуляції формування біоплівок бактеріями може бути збільшення лізису клітин та вивільнення еДНК – важливого структурного компонента мікробних спільнот [247]. З іншого боку [228], пригнічення плівкоутворення *P. aeruginosa* PAO1 за дії субінгібуючих концентрацій аміноглікозидних АМП (амікацину, гентаміцину, канаміцину, неоміцину) обумовлене впливом на функціонування регуляторних систем QS, зокрема білок LasR та рухливість бактерій.

Експериментально встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу впливають на різні типи рухливості грамнегативних бактерій (*swimming*-, *swarming*-, *twitching*-міграцію), обумовленої джгутиками та пілями. Рухливість мікроорганізмів відіграє важливу роль у поширенні збудника по організму, прикріпленні бактерій до субстрату, формуванні біоплівок, розвитку інфекційних захворювань (зокрема муковісцидозу) [82, 83], а також пов'язана з патогенністю і стійкістю до антибіотиків [308]. Встановлено, що сполука АМ-166 у концентрації 0,5 МІК та 2,0 МІК пригнічує усі три типи рухливості *P. aeruginosa* (*swimming*-, *swarming*-, *twitching*-міграцію), KBM-97 (2,0 МІК) повністю пригнічує *swimming*- та *twitching*-рухливість *P. aeruginosa*. У субінгібуючій концентрації KBM-97 стимулює рух мікроорганізмів за типом «*swimming*» та «*swarming*», не впливаючи на *twitching*-міграцію. Адамantanвмісні сполуки пригнічують рухливість *E. coli*, що забезпечується пілями IV типу (на відмінну від рухливостей, що обумовлені джгутиками).

Отримані дані щодо здатності похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу пригнічувати міграцію грамнегативних бактерій мають важливе клінічне значення, оскільки може знизити частоту розвитку інфекцій. Механізм інгібуючого ефекту сполук може бути пов'язаний безпосередньо з впливом на пілі, джгутики або експресію відповідних генів, що регулюють синтез їх структурних компонентів.

Бактерії *E. coli* містять на своїй поверхні від 5 до 10 джгутиків. Кожен з них утворений з базального тіла (мотору), «гачка» та філаменту, що складається з білка флагеліну FliC, який кодується геном *fliC* [309]. Обертання джгутика здійснюється завдяки взаємодії між ротором і статором. Ротор, розташований під базальним тілом, складається з білків FliG, FliM та FliN. Джгутиковий мотор у *E. coli* складається з білків MotA та MotB, які пов'язані з цитоплазматичною мембраною. Синтез білка MotB регулює ген *motB* [310].

Встановлено, що досліджувані сполуки AM-166 та KBM-97 не впливають на *swimming*-рухливість *E. coli*, що здійснюється за допомогою джгутиків. Згідно з результатами молекулярних досліджень за дії KBM-97 не змінюється транскрипційна активність генів *fliC* та *motB*, проте сполука AM-166 пригнічує їх експресію. Можливо цей ефект залежить від впливу сполуки на регуляторні механізми. Зокрема, регулятор CsrA – РНК-зв'язуючий білок, який контролює експресію численних генів, що беруть участь у метаболічних процесах, формуванні біоплівки, рухливості, QS, інвазії бактерій та продукції факторів вірулентності, та GadE – білок, який може впливати на транскрипційну активність гена *fliC* [311, 312].

Пригнічення рухливості бактерій пов'язане з адгезією та колонізацією клітин слизової оболонки господаря, що у *E. coli* забезпечується фімбріальними адгезинами – Р-фімбріями (кодуються опероном *rap*) і пілями 1 типу (опероном *fim*) [313, 314]. Проте виявлена зворотна залежність між рухливістю бактерій та експресією адгезинів, у випадку підвищеної експресії *fim* спостерігається зниження рухливості [313].

Отримані в експериментах дані щодо підвищення експресії гена *fimA* за впливу обох сполук AM-166 та KBM-97 можливо пов'язане саме зі зниженням рухливості (спостерігається зниження експресії гена *fliC*) у зв'язку з наступним етапом формування біоплівки – адгезією до субстрату. Відсутність змін в експресії гена *rapC* можна пояснити відсутністю в умовах *in vitro* специфічного субстрату для зв'язування з рецептором біотичного середовища. Для з'ясування впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на експресію генів *rap*-оперону,

необхідні подальші дослідження з використанням моделей, наближених до умов сечовивідних шляхів чи кишківника.

Окрім специфічних факторів адгезії, важливим чинником, який визначає прикріплення бактерій до тканин, імплантів чи медичних пристроїв є гідрофобність мікроорганізмів, що, разом з іншими фізико-хімічними характеристиками, забезпечує початкову стадію колонізації біотичної чи абіотичної поверхні. Гідрофобність поверхні бактеріальних клітин визначається складом їх клітинних стінок (присутністю поверхнево-асоційованих білків), що відображає фізіологічний стан та життєздатність мікроорганізмів. Антимікробні речовини здатні змінювати рівень гідрофобності клітин, впливаючи на їх адгезію, колонізацію та розвиток інфекційного процесу [315–317].

Результати проведених експериментів показали, що за дії AM-166, KBM-97 та азитроміцину гідрофобність клітин *S. aureus* знижується (в межах від 13,5 % до 30,0 %). Зменшення гідрофобності бактеріальної поверхні *S. aureus* відмічено за дії наночастинок ZnO [318], за дії яких пригнічується також плівковутворення та експресія генів *icaA*, *sigB*, *sarA*, відповідальних за формування біоплівки та регуляцію цього процесу. Також триптофан та вітексин змінюють гідрофобність клітин золотистого стафілокока через інгібування експресії генів *dltA* та *icaAB* (лише вітексин), пов'язаних з поверхневими білками IcaA, DltA, SasG [315, 319]. Відмічено [315, 320], що разом зі зміною гідрофобності за впливу вітексину та кверцетину пригнічується плівкоутворення, транскрипційна активність генів *ica*-оперону, продукція компонентів матриксу біоплівки *S. aureus* та *S. epidermidis*.

Встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу, меропенем та ципрофлоксацин, практично не змінюють гідрофобність бактеріальної поверхні грамнегативних бактерій (окрім KBM-97 щодо *P. aeruginosa*). Подібний ефект щодо бактерій *E. coli* спостерігається за впливу транс-циннамальдегіду та 4-нітро-циннамальдегіду [224] – відсутній вплив на гідрофобні властивості, проте за їх дії відмічено як збільшення, так і зменшення рухливості бактеріальних клітин, порушення формування фібріл у кишкової палички, зниження

експресії генів *fimA*, *fimH*, *sfaA*, *sfaS*, *papG* (транс-циннамальдегід), відповідальних за адгезію та інвазію *E. coli* в тканини організму господаря. Природний алкалоїд піперин [321] та флавоноїди [322] (подібно KBM-97) знижують гідрофобність клітин та рухливість *P. aeruginosa*. Окрім дії на неспецифічні та специфічні фактори адгезії антибіоплівкову активність піперину пов'язують зі збільшенням утворення АФК та впливом на системи QS, зокрема зниження експресії гена *lasI*.

Порушення адгезії мікроорганізмів за дії адамантанвмісних сполук доведено експериментами *in vivo* на моделі шкірних ран у щурів, інфікованих мікст-збудниками (*S. aureus* + *P. aeruginosa* + *C. albicans*) та на засобах медичного призначення (медичні сітки для відновлювальної хірургії).

Таким чином, отримані результати свідчать, що антибіоплівкова дія похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на ранніх етапах щодо грампозитивних бактерій може бути пов'язана з пригніченням гідрофобних властивостей бактеріальних клітин *S. aureus* та зміною експресії генів плівкоутворення, щодо біоплівок грамнегативних мікроорганізмів – з впливом на гідрофобність (*P. aeruginosa*) та рухливість.

Після прикріплення клітин мікроорганізмів до поверхні починається синтез компонентів позаклітинного матриксу [323–326], який захищає бактерії від негативного впливу зовнішнього середовища, дії антимікробних засобів та імунної системи макроорганізму. Основними структурними компонентами позаклітинного матриксу є полісахариди, білки, еДНК, проте його склад відрізняється залежно від виду бактерій. Наприклад, матрикс біоплівок *E. coli* складається з полі- β -1,6-N-ацетил-глюкозаміну (β -1,6-GlcNAc), целюлози, коланової кислоти, транспортних білків (Ag43, AidA, TibA) [56, 260], *P. aeruginosa* – альгінату, Psl-, Pel-полісахаридів, лектинів (LecA, LecB), Psl-зв'язуючого білка CdrA [261, 262], *S. aureus* – з полісахаридного адгезина PIA, білків Aap, Spa, Embp, SasG, амілоїдних фібрил [4, 259]. Матрикс біоплівки є обмежено проникним для АМП через можливість зв'язування антимікробних агентів з його компонентами (наприклад, еДНК) або мембранами

мікроорганізмів, чи інактивацію АМП ферментами матриксу, зокрема, β -лактамних антимікробних препаратів β -лактамазами бактерій. Тому сформовані біоплівки є менш чутливими до дії АМП [327–329], а порушення утворення компонентів матриксу шляхом прямої дії або опосередковано (через вплив на системи QS) є перспективною мішенню та може підвищити чутливість бактерій до дії АМП.

Експериментально встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу АМ-166 (5,0 МІК) та KBM-97 (0,5 МІК та 5,0 МІК) зменшують біомасу біоплівки, сформованої MRSA, і кількість життєздатних клітин, що підтверджено результатами флуоресцентної мікроскопії. Отриманий ефект також спостерігається за дії природного алкалоїду піперину [251], що виявляє здатність руйнувати сформовані біоплівки MRSA шляхом пригнічення міжклітинної агрегації за рахунок змін гідрофобності бактеріальної поверхні, посилення формування АФК та зв'язування з еДНК, що призводить до порушення структури біоплівки. Також за його дії відмічено зменшення продукції компонентів позаклітинного матриксу. Нашими дослідженнями показано, що АМ-166 та KBM-97 суттєво не впливають на вміст компонентів матрикса, що свідчить про те, що їх антибіоплівова дія не пов'язана з цим механізмом, а виявлені зміни можуть бути захисною реакцією бактерій на стресові умови (дію суб-МІК досліджуваних сполук [247]).

Встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу (0,5 МІК та 5,0 МІК) обумовлюють деструкцію сформованих 5-добових біоплівок *E. coli* (їх біомаса зменшується у межах від 25,9 % до 56,8 %). Їх дія при 5,0 МІК не поступається (АМ-166) або переважає (KBM-97) АМП меропенем. Механізм впливу сполук на сформовані біоплівки *E. coli* може бути пов'язаний зі здатністю порушувати продукцію компонентів матриксу. За дії суб-МІК сполук спостерігається зменшення вмісту полісахаридів та білка (АМ-166), а АМП меропенем та ципрофлоксацин пригнічують синтез полісахаридів, целюлози та збільшують кількість білка (також відмічено за дії KBM-97).

Отримані дані щодо біоплівки *P. aeruginosa* свідчать, що АМ-166 (у межах концентрацій від 0,15 МІК до 2,0 МІК) та КВМ-97 (0,5 МІК та 5,0 МІК) зменшують біомасу 5-добових біоплівки (інгібіція складає до 80,1 %). За своєю дією АМ-166 при 0,5 МІК наближається до активності препаратів порівняння ципрофлоксацину та меропенему, КВМ-97 (5,0 МІК) – не поступається дії меропенему. Отриманими результатами показано, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу та АМП зумовлюють зменшення кількості життєздатних клітин у складі біоплівки. Встановлено, що адамантанвміснв сполуки КВМ-97 пригнічує синтез білків та полісахаридів (лише КВМ-97) синьогнійною паличкою (зменшення у межах від 27,3 % до 41,6 %).

Молекулярними дослідженнями було встановлено вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на експресію генів, відповідальних за синтез екзополісахаридів Pel, Psl та альгінату, що визначають структуру матриксу біоплівки синьогнійної палички. Отримані результати представлені на рис. 2.

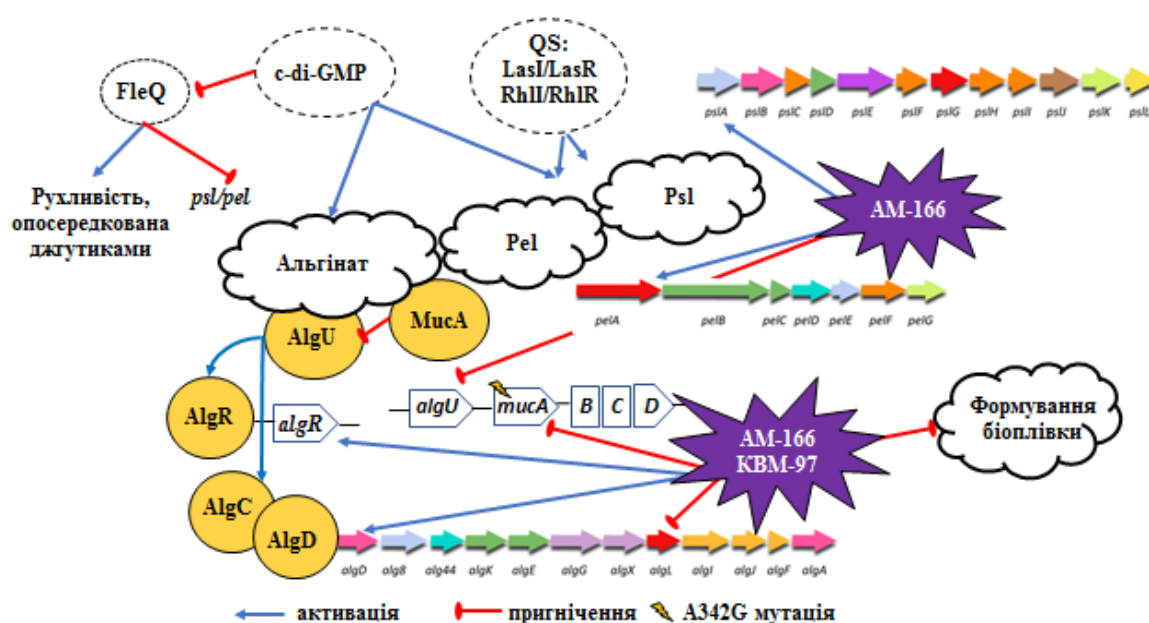


Рис. 2 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на генетичну регуляцію біосинтезу екзополісахаридів у *P. aeruginosa* (схема побудована згідно з [330, 331])

Показано (рис. 2), що основними структурними компонентами матриксу біоплівки у штамів синьогнійної палички є Pel-, Psl-полісахариди та альгінат, синтез яких має складну мережу регуляторних шляхів та забезпечується активацією багатьох генів [330, 331]. Pel-полісахарид – лінійний гомополімер, у біосинтезі якого беруть участь 7 білків, кодованих в опероні *pelABCD*FG. Psl-полісахарид – повторюваний пентамер, що складається з D-маннози, L-рамнози та D-глюкози, синтезується і секретується білками, кодованими опероном *pslABCD*IEFGHIJKL, що включає 12 генів [331].

Отримані результати щодо експресії генів у *P. aeruginosa*, які регулюють синтез полісахаридів свідчать, що AM-166 у субінгібуючій концентрації підвищує експресію генів *pelA* і *pslA* у 16,6 і 2,5 рази відповідно, сполука KBM-97 не призводить до статистично значущих змін у транскрипційній активності досліджуваних генів. Підвищення рівня експресії генів *pelA*, *pslA* за впливу похідного 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу може бути пов'язане зі стимуляцією захисних механізмів *P. aeruginosa*. Низка досліджень показала, що полісахарид Psl здатний впливати на дигуанілат-циклази SiaD і SadC, які, у свою чергу, продукують внутрішньоклітинний вторинний месенджер c-di-GMP. Підвищення концентрації c-di-GMP призводить до збільшення продукції Psl і свідчить про наявність унікального регуляторного ланцюга з позитивним зворотним зв'язком, і експресія позаклітинного полісахариду є адаптацією бактерій до дії стресових факторів [326]. Ген *pelA* генерує секретовану форму полісахариду Pel, продукція якого збільшується в штамів з порушеннями синтезу клітинно-асоційованого Pel-полісахариду. Збільшення експресії гена *pelA* за дії AM-166 можливо пов'язане зі здатністю адамантанвмісної сполуки порушувати синтез клітинно-асоційованого полісахариду [332].

Активация продукції Psl-полісахариду може свідчити про перехід *P. aeruginosa* в мукоїдну форму [333] зі збільшенням утворення клітинами синьогнійної палички альгінату. Альгінат – лінійний полісахарид, що складається з (1,4)- β -D-маннуронової і α -L-гулууронової кислот. Його синтез є багатостадійним процесом і регулюється опероном, що включає 12 генів: *algD*,

alg8, *alg44*, *algK*, *algE*, *algG*, *algX*, *algL*, *algI*, *algJ*, *algF* та *algA* [334]. Регуляторами біосинтезу альгінату слугують AlgR (AlgZ/FimS), який зв'язується з 3 ділянками ферменту AlgD, та білок AlgU, що негативно контролюється транскрипційною активністю *algUmucABCD*-кластера, що пригнічує його ферментативну активність [334, 335]. Важливу роль відіграє фермент AlgL – альгінатліаза, кодується геном *algL*, руйнує альгінат та контролює молекулярну масу вихідного продукту. Пригнічення експресії гена *algL* призводить до порушення синтезу альгінату та втрати мукоїдності [335].

Встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу призводять до змін синтезу альгінату: за впливу AM-166 відмічено зниження рівня експресії регуляторів синтезу альгінату генів *algU*, *mucA*, за дії KBM-97 – лише гена *mucA*. Ці дані є важливими, оскільки ген *algU* і негативні регулятори *mucA* і *mucB* складають кластер генів, що контролює конверсію немуконісних штамів *P. aeruginosa* в штами, здатні гіперпродукувати альгінат [336, 337]. Транскрипція гена *algD* залежить від *algR* у мукоїдних штамів *P. aeruginosa* [338], підвищення їх експресії генів і значне пригнічення експресії гена *mucA* за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу може свідчити про здатність сполук стимулювати утворення альгінату. Такий ефект спостерігається й за дії іміпенему [339]. Адамantanвмісні сполуки здатні підвищувати проникність ЦПМ, змінювати якісний і кількісний склад клітинної стінки грамнегативних бактерій [150, 151], що можливо призводить до збільшення продукції альгінату.

Проте за дії AM-166 та KBM-97 відмічено зменшення транскрипційної активності гена *algL* майже в 2,0 раза, що може призводити до навпаки пригнічення синтезу альгінату *P. aeruginosa*. Але, враховуючи значне пригнічення *mucA*, порушення його регуляторного впливу на експресію гена *algU*, підвищення експресії гена *algD* та *pslA*, можна припустити, що досліджувані сполуки можливо призводять до мутацій в гені *mucA*, які сприяють переходу немуконісного фенотипу *P. aeruginosa* в мукоїдний. Для детального аналізу отриманих результатів необхідно проведення поглиблених

молекулярних досліджень, зокрема з використанням мутантних тест-штамів мікроорганізмів.

Разом з впливом на продукцію компонентів матриксу біоплівки бактерій, важливим є дослідження здатності сполук проникати всередину мікробних угруповань. Адже відомо, що позаклітинний матрикс слугує фізичним бар'єром, який обмежує доступ АМП до мікроорганізмів. Експериментально встановлено, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу (200 мкг) проникають всередину стафілококових біоплівок, але не виявлено їх здатності проникати через матрикс біоплівок, сформованих *P. aeruginosa* та *E. coli*. Високу проникність відмічено у препаратів порівняння азитроміцину (через біоплівки, сформовані *S. aureus*) та ципрофлоксацину (*P. aeruginosa* та *E. coli*). Згідно з [340, 341], що деякі АМП здатні легко та швидко проникати всередину біоплівки, інші – повільніше або затримуватися у її верхніх шарах. Наприклад, проникнення оксациліну, цефотаксиму (β-лактамів), ванкоміцину, тейкопланіну (глікопептидів) через біоплівки *S. aureus* є знижене, а амікацин (аміноглікозид), рифампіцин та ципрофлоксацин (фторхінолони) здатні добре проникати всередину мікробних спільнот [341]. Різна проникність АМП через біоплівки бактерій пов'язана з великою кількістю факторів, які впливають на її ступінь та тривалість. Зокрема, товщина, вік мікробних спільнот, щільність клітин та їх чутливість до АМП, концентрації препаратів, фізико-хімічні характеристики компонентів матриксу та антимікробних засобів [340–342].

Враховуючи великий розмір похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу, цей параметр може бути обмежуючим для проникнення досліджуваних сполук. Проте показано [340, 342], що розмір молекули не має значного впливу на здатність проникати всередину мікробних спільнот та тривалість проникнення. Так, великі молекули можуть швидко проникати всередину біоплівки: ванкоміцин (0,5 хв), даптоміцин (1,5 хв), нізін (від 4 до 10 хв) [340].

Відмінність у результатах проникнення похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу через біоплівки, сформовані грампозитивними та грамнегативними мікроорганізмами, може бути пов'язана з їх концентрацією. Адже чутливість

досліджуваних тест-штамів до дії адамантанвмісних сполук відрізняється (МІК щодо *P. aeruginosa* 449 та *E. coli* 311 в межах від 25,0 мкг/мл до 100 мкг/мл, щодо *S. aureus* 222 – від 2,0 мкг/мл до 2,5 мкг/мл). Згідно з даними літератури [342], бактеріальні клітини у мікробних кластерах у біоплівці щільно розташовані і простір між бактеріями обмежує проникнення антимікробної речовини та перешкоджає досягненню оптимальної дози.

Згідно з [340, 342], найбільш важливим фактором, що впливає на тривалість проникнення та антимікробну ефективність є взаємодія АМП з компонентами матриксу мікробних угруповань, яка може реалізовуватися фізико-хімічними зв'язками, інактивацією АМП шляхом ферментативного розщеплення або їх модифікації. Було досліджено [150, 151], що адамантанвмісні сполуки характеризуються здатністю взаємодіяти з фосфоліпідами, ДНК та білками через гідрофобні та електростатичні зв'язки, що може впливати на їх проникнення через матрикс біоплівок. Так [342], уповільнена дифузія речовин може бути результатом електростатичної взаємодії між молекулами та структурними компонентами матриксу з протилежним поверхневим зарядом. Наприклад, аміноглікозиди тобраміцин та гентаміцин проникають в біоплівки мукоїдного штаму *P. aeruginosa* повільніше, ніж β -лактамі антибіотики, що обумовлено здатністю позитивно заряджених аміноглікозидів зв'язуватися з альгінатом або еДНК, що мають негативний заряд [263, 342]. Показано [342], що проникність тобраміцину може бути збільшена шляхом підвищення його концентрації або додавання катіонів металів. Окрім альгінату, Psl-полісахарид може перешкоджати проникненню тобраміцину через електростатичні взаємодії.

Отже, відмінність у проникненні похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу через біоплівки грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів може бути обумовлена недостатньою концентрацією сполук (по відношенню до МІК) та здатністю зв'язуватися з біомолекулами шляхом гідрофобних та електростатичних взаємодій.

Ще однією причиною неефективності АМП щодо біоплівок бактерій є наявність метаболічно інертних клітин персистерів. Персистері є невеликою часткою клітин стаціонарної фази росту мікроорганізмів, але є значною у складі біоплівок (до 1 %). Вони можуть бути основною причиною хронічних інфекцій, оскільки АМП інгібують чутливі клітини верхніх шарів біоплівки і не впливають на персистері, які залишаються життєздатними і відновлюють біоплівку метаболічно активними клітинами, коли рівень АМП у біоплівці знижується. Персистентні клітини складають субпопуляцію високотолерантних до АМП бактерій, їх кількість залежить від стадії росту. Проведені експерименти показали, що адамантанвмісні сполуки не запобігають утворенню клітин-персистерів у бактерій *S. aureus* та *P. aeruginosa*, але їх частка не перевищує таку за дії АМП ($\leq 1,0\%$) [236, 237]. Похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу здатні значно зменшувати формування субпопуляції персистуючих клітин *E. coli*, порівняно з дією ципрофлоксацину. Встановлено, що сполуки виявляють специфічну антимікробну активність щодо клітин-персистерів *P. aeruginosa*, що може бути пов'язано з їх тривалим антибіотичним ефектом, прямою дією на метаболічно неактивні клітини або відновленням метаболічно активного стану бактерій і дією на безпосередню мішень. Згідно з даними літератури [341], β -лактамі АМП активні лише щодо метаболічно активних бактеріальних клітин, тоді як фторхінолони здатні виявляти антимікробну активність щодо клітин з різною метаболічною активністю і є більш ефективними щодо біоплівок.

Зниження метаболічної активності бактеріальних клітин може бути пов'язано з впливом на енергетичні процеси, що підтверджується здатністю адамантанвмісних сполук порушувати ендогенне та субстратне дихання у клітинах бактерій [151], впливати на експресію генів *appB* та *appX* у *E. coli* 311, які беруть участь у синтезі субодиниці цитохрому bd-II оксидази, генів *malP* та *malZ*, які забезпечують розщеплення проміжних продуктів мальтодекстринів та мальтози до глюкози. Цитохром bd відіграє роль у розвитку біоплівки кишкової палички та синтезі позаклітинного матриксу. Порушення його синтезу

призводить до підвищення проникності зовнішньої мембрани бактерій, пригнічення ефлюксних pomp, підвищення чутливості клітин до АМП [343].

Головним регуляторним механізмом основних процесів існування мікроорганізмів, включаючи синтез факторів патогенності та формування біоплівки, є системи QS [75, 77, 78], які найбільш вивченими є у штамів *P. aeruginosa*. У синьогнійної палички описано чотири системи QS – Las, Pqs, Rhl та Iqs, функції яких взаємопов'язані [79, 344]. Результати дослідження впливу похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на QS та QS-залежні процеси представлені на рис. 3.

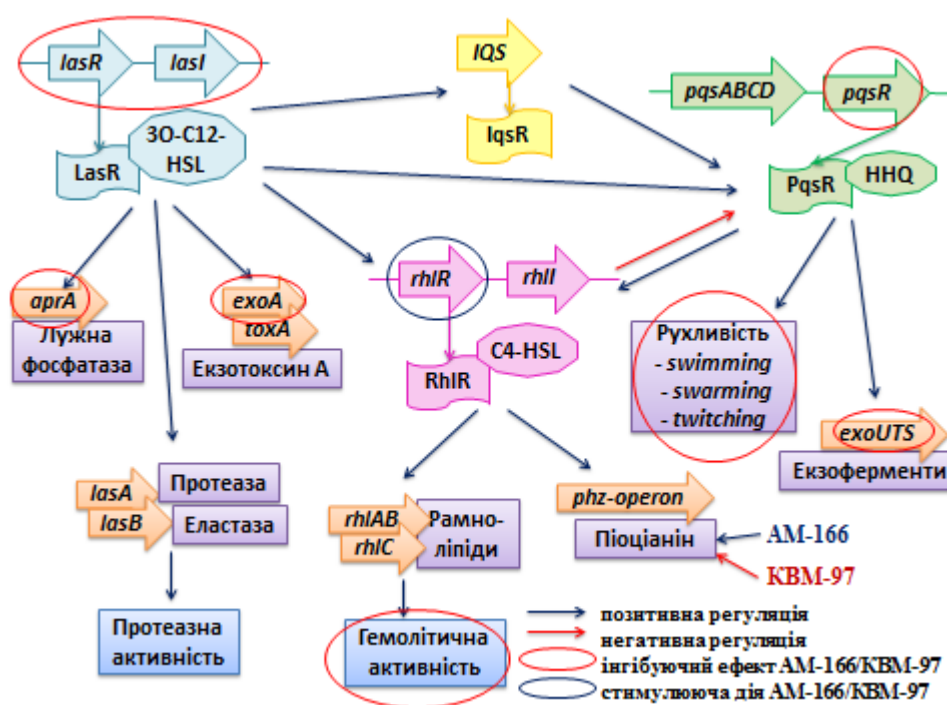


Рис. 3 Вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на QS та QS-залежні процеси у *P. aeruginosa* (схема побудована згідно з [85, 344])

Встановлено, що за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу AM-166 та KBM-97 (0,5 МІК) транскрипційна активність генів *lasI* та *lasR* знижується, що свідчить про вплив сполук на Las-систему QS. Зміна експресії генів *LasI/LasR*-системи може реалізовуватись пригніченням синтезу низки факторів вірулентності, зокрема лужної металопротеїнази й екзотоксину А. Підтвердженням слугують дані щодо зниження за дії AM-166 та KBM-97

транскрипційної активності генів *aprA* і *exoA*. Отримані результати щодо експресії гена *exoA* є важливими, оскільки екзотоксин А – найбільш токсичний фактор вірулентності, виявляє цитотоксичну дію та індукуює імуносупресію [345]. Екзотоксин А найбільш активно вражає легеневу тканину, паренхіму печінки, нирок, призводячи до некрозів, крововиливів і формування гострої чи хронічної дисфункції уражених органів тощо.

В експериментах виявлено збільшення за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу експресії гена *rhlR* системи RhlI/RhlR, що може реалізовуватись активацією синтезу рамноліпідів, необхідного для диференціювання клітин біоплівки, формування каналів й архітектури біоплівки, активацією T2SS системи екскреції ендотоксинів. Оскільки за дії AM-166 та KBM-97 спостерігається пригнічення синтезу позаклітинних і клітинно-асоційованих гемолізинів, регуляція яких здійснюється Rhl-системою, то механізм антисиньогнійної активності сполуки може бути пов'язаний із впливом на всі три системи QS: Las, Rhl і PQS. З урахуванням того, що Las-система впливає на IQS, IQS – на PQS-систему, а PQS – на Rhl, то не виключений прямий чи опосередкований вплив адамантанвмісних сполук і на четверту систему QS *P. aeruginosa* – IQS, що потребує подальших досліджень.

Про можливий вплив AM-166 та KBM-97 на різні ланки QS свідчать зміни у продукції піоціаніну *P. aeruginosa* за їх впливу. Згідно з [346], накопичення піоціаніну в штамів *P. aeruginosa* спостерігалось за дії суб-МІК антибіотиків різних груп (канаміцину, хлорамфеніколу, норфлуксацину, карбеніциліну та поліміксину В). Ефект препаратів пов'язують із відповіддю мікроорганізмів на стресовий чинник або з впливом на систему QS. Згідно з [347], зменшення вмісту піоціаніну за дії екзогенного 3-оксо- C_{12} -АГЛ спричинено саме негативним впливом на Rhl-ланку QS, що регулює утворення пігменту.

У дослідженні виявлено вплив сполук AM-166 та KBM-97 на PQS-систему, яка регулює експресію генів *lecA* (синтез лектинів), *exoUTS* (синтез екзоферментів) та впливає на ген *rhlAB* (синтез рамноліпідів), як і система LasI/LasR. За дії сполук спостерігається зниження експресії генів *pqsR* та *exoS*.

Отримані результати є дуже важливими, оскільки похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу здатні пригнічувати синтез токсичних продуктів синьогнійної палички, зокрема екзоферменту S, який є “контактним” екзотоксином, через вплив на актин в цитоскелеті клітини господаря призводить до її загибелі. Механізм контактної інтоксикації дає синьогнійній паличці змогу протидіяти впливу імунної системи, оскільки токсини не надходять у позаклітинне середовище й не можуть бути нейтралізовані антитілами [348].

Системи QS, окрім синтезу компонентів матрикса та екзотоксинів, регулюють багаточисленні процеси в клітинах, зокрема, функціонування транспортних систем, серед яких – ефлюксні помпи. У синьогнійної палички наявно 12 ефлюксних систем родини RND, найбільш активними щодо викиду АМП є MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM та MexAB-OprM, які утворюють трикомпонентні комплекси, що проходять через внутрішню та зовнішню мембрани і експортують широкий спектр АМП (β -лактами, фторхінолони, макроліди, сульфаміди, аміноглікозиди, хлорамфеніколи, тетрацикліни), дезінфікуючих засобів та гомосеринлактони (ключові аутоіндуктори QS) [349]. За функціонування помп MexXY-OprM та MexAB-OprM відповідають оперони *mexXY-oprM*, *mexAB-oprM*, гени *mexB*, *mexY*, *oprM* регулюють синтез структурних компонентів, *mexR* є транскрипційним репресором оперону *mexAB-oprM*. Порушення функції ефлюксних помп є один із шляхів підвищення ефективності антимікробної терапії. Згідно з даними проведених експериментів, похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу AM-166 та KBM-97 знижують транскрипційну активність генів *mexB*, *mexY*, значно активують репресор помпи MexAB-OprM *mexR* у чутливого до АМП штаму *P. aeruginosa* 449. При порівнянні експресії генів, що регулюють функцію RND помп у полірезистентного тест-штаму *P. aeruginosa* 1366, показано за дії сполук їх транскрипційна активність збільшується порівняно з контролем.

Показано, що похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу AM-166 та KBM-97 не змінюють транскрипційну активність гена *oprM* у *P. aeruginosa* 449, проте призводять до збільшення його експресії у полірезистентного штаму

P. aeruginosa 1366. Підвищення експресії гена *oprM* може бути обумовлено мутаціями у локальних генах-репресорах, що призводить до підвищення експресії ефлюкських систем та формування стійкості до різних антимікробних агентів [350, 351].

Отже, встановлено, що вплив похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу на транспортні системи у бактерій залежить від тест-штаму мікроорганізму та його чутливості до АМП, про що свідчить різна транскрипційна активність генів за дії сполук. Оскільки функціонування ефлюкських pomp у бактерій забезпечує їх стійкість до АМП, отримані дані можуть свідчити про ймовірний вплив адамантавмісних сполук на профіль антибіотикочутливості штамів, що відмічено за дії похідного адамантану CD437 [12, 145].

Таким чином, похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу виявляють інгібуючу активність щодо біоплівки MRSA, *E. coli* та *P. aeruginosa*. Їх антибіоплівковий ефект реалізується зменшенням біомаси та життєздатності клітин у мікробних угрупованнях на різних етапах їх формування, впливом на специфічні та неспецифічні фактори адгезії, продукцію компонентів матриксу, пригніченням експресії генів, які відіграють ключову роль у плівкоутворенні бактерій. Похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу виявляють інгібуючу дію щодо патогенності *P. aeruginosa*, порушуючи експресію генів систем QS: Las-, Rhl- та PQS-систем, що реалізується впливом на синтез факторів вірулентності та функціонування ефлюкських pomp. Досліджувані адамантавмісні сполуки є перспективними речовинами для створення ефективних та безпечних лікарських засобів, а також засобів медичного призначення, для запобігання інфікування та розвитку хронічних, рецидивуючих інфекцій.

ВИСНОВКИ

Антибіотикорезистентні штами мікроорганізмів, поява інфекцій, спричинених біоплівками, є основною причиною недостатньої ефективності антимікробної хіміотерапії, глобальною проблемою та серйозною загрозою здоров'ю людей в усьому світі. Посилення глобальної кризи охорони здоров'я, пов'язаної зі стійкістю до антибіотиків, вимагає термінових заходів, серед яких розробка нових препаратів та стратегій для підвищення ефективності антимікробної терапії при гострих та хронічних захворюваннях, спричинених біоплівками.

У дисертаційній роботі комплексно оцінено фармакодинамічні особливості похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу щодо біоплівок грампозитивних та грамнегативних бактерій, з урахуванням етапів їх утворення, теоретично обґрунтовано та експериментально доведено перспективність створення нових антимікробних препаратів на їх основі.

1. Похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу здатні запобігати формуванню біоплівок грампозитивними (*S. aureus*) та грамнегативними мікроорганізмами (*E. coli*, *P. aeruginosa*), зменшуючи їх біомасу у межах від 22,5 % до 92,3 %. Досліджувані сполуки у концентрації, що перевищує МІК, виявляють антибіоплівковий ефект як і антимікробні препарати азитроміцин, ципрофлоксацин, меропенем, при суб-МІК їх ефект може відрізнятися. Порушення плівкоутворення реалізується зміною гідрофобності поверхні клітин метицилін-резистентного *S. aureus* (AM-166) і клінічного ізоляту *P. aeruginosa* (KBM-97), пригніченням рухливості грамнегативних бактерій, у більшій мірі обумовлену пілями IV типу (*twitching*-міграція).

2. Порушення формування біоплівок на ранніх етапах за дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу підтверджено зменшенням кількості метаболічно активних клітин *S. aureus* (при 2,0 МІК та 5,0 МІК), *E. coli* (AM-166 за дії у межах концентрацій 0,5 МІК – 5,0 МІК, KBM-97 – 2,0 МІК та 5,0 МІК),

P. aeruginosa (у межах концентрацій 0,5 МІК – 5,0 МІК). Встановлено, що досліджувані адамантавмісні сполуки здатні значно зменшувати кількість клітин-персистерів *E. coli* та не запобігають їх утворенню *S. aureus* та *P. aeruginosa*.

3. Антиадгезивна активність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу підтверджена дослідженнями *in vivo* на моделі хірургічної шкірної площинної рани, інфікованої *S. aureus* + *P. aeruginosa* + *C. albicans*. При застосуванні у лікувально-профілактичному та лікувальному режимах KBM-97 (0,05 % розчин) сприяє зниженню мікробної контамінації на поверхні та у глибині рани. Антимікробна активність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу при нанесенні на засіб медичного призначення поліпропіленову хірургічну сітку зберігається протягом 2-3 днів, за тривалістю ефекту сполуки AM-166 та KBM-97 переважають ципрофлоксацин.

4. Похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу виявляють інгібувальну дію щодо 2-добових біоплівки MRSA, за їх дії відмічається зменшення біомаси біоплівки (на 30,9 – 34,5 % проти контролю). Антибіоплівкова активність сполук при 5,0 МІК подібна до такої азитроміцину, а при 0,5 МІК KBM-97 переважає дію макролідного АМП. Встановлено, що сполуки AM-166 та KBM-97 здатні проникати через матрикс біоплівки *S. aureus*. За їх впливу (0,5 МІК) не спостерігається виразних змін вмісту полісахаридів, загального білка та Вар-білка у матриксі метицилін-резистентного золотистого стафілокока.

5. Антибіоплівкова дія похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу щодо сформованих 5-добових біоплівки *E. coli* підтверджена зменшенням біомаси (при 0,5 МІК та 5,0 МІК до 56,8 %), кількості життєздатних клітин (AM-166 при 5,0 МІК на 28,2 %), вмісту полісахаридів в матриксі (при 0,5 МІК до 66,0 %) та загальної кількості білка (AM-166 – зменшення на 59,3 %). За впливом на біомасу біоплівки сполука AM-166 подібна до дії меропенему, KBM-97 при 5,0 МІК наближається до активності ципрофлоксацину та переважає таку представника карбапенемів. Встановлено, що KBM-97 (0,5 МІК) збільшує продукцію білка та целюлози.

6. Адамантанвмісні сполуки спричиняють деструкцію 5-добової біоплівки *P. aeruginosa*, зменшуючи її біомасу та кількість життєздатних клітин (AM-166 у межах концентрацій від 0,15 МІК до 2,0 МІК, KBM-97 – від 0,5 МІК до 5,0 МІК). За дії KBM-97 при 0,15 МІК спостерігається невелике збільшення (на 21,5 %) біомаси біоплівок синьогнійної палички. Похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу AM-166 та KBM-97 (0,5 МІК) впливають на продукцію компонентів позаклітинного матриксу біоплівок: зменшується загальний вміст білка, полісахаридів (KBM-97) та Pel-полісахариду (KBM-97).

7. За результатами молекулярних досліджень доведено, що антибіоплівкова активність похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу обумовлена зміною експресії генів плівкоутворення. Адамантанвмісні сполуки (0,5 МІК) за впливу на MRSA призводять до зменшення експресії генів, що регулюють синтез поверхневих білків-адгезинів (*clfB*, *fib*, *finbB*, *ebpS*, *eno*), генів *icaADBC*-оперону, збільшення активності регуляторного гена *icaR*, пригнічення експресії гена *agrA* системи QS (KBM-97) та гена *cidA*, відповідального за вивільнення еДНК (KBM-97). Похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу зумовлюють геномну мінливість у *S. aureus*. Встановлено, що AM-166 зменшує експресію генів *fliC*, *motB*, що забезпечують рухливість *E. coli* та адгезію клітин до субстрату. Адамантанвмісні сполуки AM-166 та KBM-97 пригнічують транскрипційну активність генів *appB*, *appX*, *malP*, *malZ*, що регулюють енергетичні процеси у *E. coli*, окрім AM-166 щодо *malP* та *malZ*. За дії похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу відмічено як пригнічення, так і стимуляція експресії генів у *P. aeruginosa*, що регулюють синтез полісахаридних компонентів матрикса Pel, Psl, альгінату (*pelA*, *pslA*, *algD*, *algL*, *algR*, *algU*, *mucA*).

8. Похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу здатні порушувати функціонування QS та QS-залежні процеси у *P. aeruginosa*. За їх впливу (0,5 МІК) спостерігається зменшення експресії генів, що регулюють функціонування систем Las, Pqs, синтез факторів вірулентності (алкалін металопротеїнази, екзотоксину А, екзоферменту S) та збільшення активності гена Rhl-системи. Сполуки обумовлюють зміни у продукції піоціаніну та

гемолітичній активності бактеріальних клітин. Похідні 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу призводять до змін транскрипційної активності генів ефлюксних pomp родини RND *mexB*, *mexY*, *mexR*, *oprM*, які залежать від штаму мікроорганізмів та його антибіотикочутливості.

9. Результати досліджень щодо виявлених антибіоплівкових властивостей у похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу обґрунтовують доцільність та перспективність створення на їх основі лікарських засобів та засобів медичного застосування для використання з профілактичною метою та мінімізації ризику виникнення інфекційних процесів, пов'язаних з біоплівками. Для отримання більш тривалого ефекту на основі адамантанвмісних сполук можуть бути розроблені композиції з повільним вивільненням активної речовини, що можуть застосовуватися у пацієнтів з «забрудненими» або «брудними» ранами та загрозою виникнення гнійно-запального процесу, зокрема при травмах різного походження, як побутових, так і отриманих за бойових умов.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Global action plan on antimicrobial resistance [Electronic resource] / *World Health Organization*. 2015. URL: <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/1a487887-e162-46a0-8aef-802907c66070/content>. (date of access: 28.10.2025). Title from the screen.
2. Widmer A. F. Emerging antibiotic resistance: why we need new antibiotics!. *Swiss medical weekly*. 2022. Vol. 152. P. 45–46. <https://doi.org/10.57187/smw.2022.40032>.
3. Tang K. W. K., Millar B. C., Moore J. E. Antimicrobial resistance (AMR). *British journal of biomedical science*. 2023. Vol. 80. P. 11387. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>.
4. *Staphylococcus aureus* biofilm: morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies / M. Idrees et al. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021. Vol. 18(14). P. 7602. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147602>.
5. Shin H.-J., Yang S., Lim Y. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* with different degrees of biofilm formation. *Journal of Analytical Science and Technology*. 2021. Vol. 12(1). P. 41. <https://doi.org/10.1186/s40543-021-00294-2>.
6. Mechanisms and control strategies of antibiotic resistance in pathological biofilms / Y. Luo et al. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2021. Vol. 31(1). P. 1–7. <https://doi.org/10.4014/jmb.2010.10021>.
7. Upadhyay A., Jaiswal N., Kumar A. Biofilm battle: new transformative tactics to tackle the bacterial biofilm infections. *Microbial pathogenesis*. 2025. Vol. 199. P. 107277. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107277>.
8. Strategies for combating antibiotic resistance in bacterial biofilms / K. E. Grooters et al. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2024. Vol. 14. P. 1352273. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1352273>.

9. Staphylococcal biofilms: challenges and novel therapeutic perspectives / C. Kranjec et al. *Antibiotics (Basel)*. 2021. Vol. 10(2). P. 131. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020131>.
10. Adamantane-Isothiourea hybrid derivatives: synthesis, characterization, *in vitro* antimicrobial, and *in vivo* hypoglycemic activities / L. Al-Wahaibi et al. *Molecules*. 2017. Vol. 22(5). P. 710. <https://doi.org/10.3390/molecules22050710>.
11. Enzymatic self-assembly of adamantane-peptide conjugate for combating *Staphylococcus aureus* infection / W. Zhan et al. *Advanced healthcare materials*. 2023. Vol. 12(18). P. 2203283. <https://doi.org/10.1002/adhm.202203283>.
12. Bactericidal and anti-biofilm activity of the retinoid compound CD437 against *Enterococcus faecalis* / F. Tan et al. *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 10. P. 2301. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02301>.
13. Høiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS*. 2017. Vol. 125(4). P. 272–275. <https://doi.org/10.1111/apm.12686>.
14. Costerton J. W., Geesey G. G., Cheng K. J. How bacteria stick. *Scientific American*. 1978. Vol. 238(1). P. 86–95. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0178-86>.
15. The Limitations of *In Vitro* Experimentation in Understanding Biofilms and Chronic Infection / A. E. L. Roberts et al. *Journal of Molecular Biology*. 2015. Vol. 427(23). P. 3646–3661. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.002>.
16. Bacterial biofilm and associated infections / M. Jamal et al. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2018. Vol. 81(1). P. 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>.
17. Di Domenico E. G., Oliva A., Guembe M. The Current Knowledge on the Pathogenesis of Tissue and Medical Device-Related Biofilm Infections. *Microorganisms*. 2022. Vol. 10(7). P. 1259. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071259>.

18. Bouhrour N., Nibbering P. H., Bendali F. Medical Device-Associated Biofilm Infections and Multidrug-Resistant Pathogens. *Pathogens*. 2024. Vol. 13(5). P. 393. <https://doi.org/10.3390/pathogens13050393>.
19. Bacterial Biofilm Formation on Biomaterials and Approaches to Its Treatment and Prevention / P. Li et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24(14). P. 11680. <https://doi.org/10.3390/ijms241411680>.
20. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* in the specific context of cystic fibrosis / V. Jean-Pierre et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 24(1). P. 597. <https://doi.org/10.3390/ijms24010597>.
21. Interplay between biofilm microenvironment and pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung chronic infection / O. Guillaume et al. *Biofilm*. 2022. Vol. 4. P. 100089.
22. Bacterial biofilm in chronic wounds and possible therapeutic approaches / I. Cavallo et al. *Biology*. 2024. Vol. 13(2). P. 109. <https://doi.org/10.3390/biology13020109>.
23. Anti-biofilm approach in infective endocarditis exposes new treatment strategies for improved outcome / C. J. Lerche et al. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021. Vol. 9. P. 643335. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.643335>.
24. Bacterial biofilms in infective endocarditis: an *in vitro* model to investigate emerging technologies of antimicrobial cardiovascular device coatings / A. Lauten et al. *Clinical Research in Cardiology*. 2021. Vol. 110(3). P. 323–331. <https://doi.org/10.1007/s00392-020-01669-y>.
25. The prevalence and association of biofilms with otitis media with effusion: a systematic review and meta-analysis / S. Elzayat et al. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. 2023. Vol. 133(2). P. 229–238. <https://doi.org/10.1177/00034894231188855>.

26. Niedzielski A., Chmielik L. P., Stankiewicz T. The formation of biofilm and bacteriology in otitis media with effusion in children: a prospective cross-sectional study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021. Vol. 18(7). P. 3555. <https://doi.org/10.3390/ijerph18073555>.
27. The mechanisms of biofilm antibiotic resistance in chronic rhinosinusitis: a review / Y. Huang et al. *Medicine*. 2022. Vol. 101(49). P. e32168. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000032168>.
28. Chronic rhinosinusitis, *S. aureus* biofilm and secreted products, inflammatory responses, and disease severity / G. Shaghayegh et al. *Biomedicines*. 2022. Vol. 10(6). P. 1362. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061362>.
29. Singh, S., Tan, C. L., Ahmad, A. R. Explaining osteomyelitis and prosthetic joint infections (PJI) in terms of biofilm – A review. *Malaysian orthopaedic journal*. 2021. Vol. 15(2). P. 1–8. <https://doi.org/10.5704/moj.2107.001>.
30. Biofilm lifestyle in recurrent urinary tract infections / A. S. A. Lila et al. *Life*. 2023. Vol. 13(1). P. 148. <https://doi.org/10.3390/life13010148>.
31. Novel antimicrobial approaches to combat bacterial biofilms associated with urinary tract infections / G. Mancuso et al. *Antibiotics*. 2024. Vol. 13(2). P. 154. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13020154>.
32. Prostatitis: A Review / A. Yebes et al. *Current Urology Reports*. 2023. Vol. 24(5). P. 241–251. <https://doi.org/10.1007/s11934-023-01150-z>.
33. The role of staphylococcal biofilm on the surface of implants in orthopedic infection / Y. Lu et al. *Microorganisms*. 2022. Vol. 10(10). P. 1909. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101909>.
34. Current and novel diagnostics for orthopedic implant biofilm infections: a review / D. Ronin et al. *Apmis*. 2021. Vol. 130(2). P. 59–81. <https://doi.org/10.1111/apm.13197>.
35. Bacteriology of endotracheal tube biofilms and antibiotic resistance: a systematic review / S. K. Mishra et al. *Journal of Hospital Infection*. 2024. Vol. 147. P. 146–157. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2024.03.004>.

36. Biofilm-forming microorganisms causing hospital-acquired infections from intravenous catheter: a systematic review / S. P. Cangui-Panchi et al. *Current research in microbial sciences*. 2022. Vol. 3. P. 100175. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100175>.
37. Bouhrour N., Nibbering P. H., Bendali F. Medical device-associated biofilm infections and multidrug-resistant pathogens. *Pathogens*. 2024. Vol. 13(5). P. 393. <https://doi.org/10.3390/pathogens13050393>.
38. Urinary catheters coated with a novel biofilm preventative agent inhibit biofilm development by diverse bacterial uropathogens / S. Navarro et al. *Antibiotics*. 2022. Vol. 11(11). P. 1514. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111514/>.
39. A comprehensive review of microbial biofilms on contact lenses: challenges and solutions / A. Voinescu et al. *Infection and Drug Resistance*. 2024. Vol. 17. P. 2659–2671. <https://doi.org/10.2147/idr.s463779>.
40. Biofilm formation in cardiovascular infection and bioengineering approaches for treatment and prevention / Q. Tong et al. *MedComm – Biomaterials and Applications*. 2025. Vol. 4(1). P. e70003. <https://doi.org/10.1002/mba2.70003>.
41. Patel N. K., Patel V., Vasava S. (2025). Evaluation of Biofilm Formation in Bacterial Isolates from Cardiac Valve Infections. *Journal of Heart Valve Disease*. 2025. Vol. 30. P. 245–248.
42. Tiwari V. ESKAPE biofilm: challenges and solutions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2023. Vol. 13. P. 1253439. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1253439>.
43. Del Pozo J. L. Biofilm-related disease. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2017. Vol. 16(1). P. 51–65. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>.

44. Biofilms by bacterial human pathogens: clinical relevance - development, composition and regulation - therapeutical strategies / A. Schulze et al. *Microbial cell*. 2021. Vol. 8(2). P. 28–56. <https://doi.org/10.15698/mic2021.02.741>.
45. Mulcahy L. R., Isabella V. M., Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microbial Ecology*. 2014. Vol. 68(1). P. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0297-x>.
46. Tolerance and resistance of microbial biofilms / O. Ciofu et al. *Nature Reviews Microbiology*. 2022. Vol. 20(10). P. 621 – 635. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00682-4>.
47. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014 / N. Høiby et al. *Clinical microbiology and infection*. 2015. Vol. 21. P. S1–S25. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.10.024>.
48. Wu Y.-K., Cheng N.-C., Cheng C.-M. Biofilms in chronic wounds: pathogenesis and diagnosis. *Trends in Biotechnology*. 2019. Vol. 37(5). P. 505–517. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.011>.
49. Microbial biofilms and chronic wounds / A. Omar et al. *Microorganisms*. 2017. Vol. 5(1). P. 9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5010009>.
50. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease / L. K. Vestby et al. *Antibiotics*. 2020. Vol. 9(2). P. 59. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>.
51. Characterization of *Staphylococcus aureus* biofilm formation in urinary tract infection / M. Yousefi et al. *Iran J Public Health*. 2016. Vol. 45(4). P. 485–493.
52. Hamam S. S., El Kholy R. M., Zaki M. E. S. Study of various virulence genes, biofilm formation and extended-spectrum β -lactamase resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infections. *The Open Microbiology Journal*. 2019. Vol. 13(1). P. 249–255. <https://doi.org/10.2174/1874285801913010249>.

53. Biofilm-forming microorganisms causing hospital-acquired infections from intravenous catheter: A systematic review / S. P. Cangui-Panchi et al. *Current Research in Microbial Sciences*. 2022. Vol. 3. P. 100175. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100175>.
54. Screening of FDA-approved drugs using a 384-well plate-based biofilm platform: the case of fingolimod / S. Gilbert-Girard et al. *Microorganisms*. 2020. Vol. 8(11). P. 1834. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111834>.
55. Høiby N., Ciofu O., Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol.* 2010. Vol. 5(11). P. 1663–1674. <https://10.2217/fmb.10.125>.
56. Öztürk F. Y., Darcan C., Kariptaş E. The determination, monitoring, molecular mechanisms and formation of biofilm in *E. coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2023. Vol. 54(1). P. 259–277. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00895-y>.
57. Rather M. A., Gupta K., Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2021. Vol. 52(4). P. 1701–1718. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>.
58. Biochemistry of bacterial biofilm: insights into antibiotic resistance mechanisms and therapeutic intervention / K. Azeem et al. *Life*. 2025. Vol. 15(1). P. 49. <https://doi.org/10.3390/life15010049>.
59. Staphylococcal biofilms: challenges and novel therapeutic perspectives / C. Kranjec et al. *Antibiotics*. 2021. Vol. 10(2). P. 131. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020131>.
60. Schilcher K., Horswill A. R. Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2020. Vol. 84(3). P. e00026-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-19>.

61. Ruhai R., Kataria R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiological research*. 2021. Vol. 251. P. 126829. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126829>.
62. Clinical *Escherichia coli*: from biofilm formation to new antibiofilm strategies / V. Ballén et al. *Microorganisms*. 2022. Vol. 10(6). P. 1103. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061103>.
63. Antimicrobial treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms / F. F. Tuon et al. *Antibiotics*. 2023. Vol. 12(1). P. 87. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010087>.
64. Foster T. J. Surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology Spectrum*. 2019. Vol. 7(4). 10.1128/microbiolspec.gpp3-0046-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0046-2018>.
65. Nguyen H. T. T., Nguyen T. H., Otto M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA – Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2020. Vol. 18. P. 3324–3334. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.10.027>.
66. A review of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and its regulation mechanism / Q. Peng et al. *Antibiotics*. 2022. Vol. 12(1). P. 12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010012>.
67. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: a review / F. F. Tuon et al. *Pathogens*. 2022. Vol. 11(3). P. 300. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030300>.
68. Polysaccharides' structures and functions in biofilm architecture of antimicrobial-resistant (AMR) pathogens / E. Balducci et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24(4). P. 4030. <https://doi.org/10.3390/ijms24044030>.

69. The Pel polysaccharide is predominantly composed of a dimeric repeat of α -1,4 linked galactosamine and N-acetylgalactosamine / F. Le Mauff et al. *Communications Biology*. 2022. Vol. 5(1). P. 502. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03453-2>.
70. Jones C. J., Wozniak D. J. Psl produced by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* contributes to the establishment of biofilms and immune evasion. *mBio*. 2017. Vol. 8(3). P. e00864 – 17. <https://doi.org/10.1128/mbio.00864-17>.
71. Thi M. T. T., Wibowo D., Rehm B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21(22). P. 8671. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>.
72. Dombach J. L., Quintana J. L. J., Detweiler C. S. Staphylococcal bacterial persister cells, biofilms, and intracellular infection are disrupted by JD1, a membrane-damaging small molecule. *mBio*. 2021. Vol. 12(5). P. e0180121. <https://doi.org/10.1128/mbio.01801-21>.
73. Bacterial persister cells and development of antibiotic resistance in chronic infections: an update / A. P. Kunnath et al. *British Journal of Biomedical Science*. 2024. Vol. 81. P. 12958. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2024.12958>.
74. Microbial Biofilms and Resistome: Concept and Applications / S. A. Salim et al. In *Omics Approaches in Biofilm Research: Perspectives and Applications*. Cham: Springer Nature Switzerland. 2025. P. 45–62. https://doi.org/10.1007/978-3-031-91863-6_2.
75. The role of RNA regulators, quorum sensing and c-di-GMP in bacterial biofilm formation / M. Condinho et al. *FEBS open bio*. 2022. Vol. 13(6). P. 975–991. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13389>.
76. PelX is a UDP-N-acetylglucosamine C4-epimerase involved in Pel polysaccharide-dependent biofilm formation / L. S. Marmont et al. *Journal of Biological Chemistry*. 2020. Vol. 295(34). P. 11949–11962. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra120.014555>.

77. Quorum sensing-mediated microbial interactions: mechanisms, applications, challenges and perspectives / X. Zeng et al. *Microbiological Research*. 2023. Vol. 273. P. 127414. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127414>.
78. Sionov R. V., Steinberg D. Targeting the holy triangle of quorum sensing, biofilm formation, and antibiotic resistance in pathogenic bacteria. *Microorganisms*. 2022. Vol. 10(6). P. 1239. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061239>.
79. A review of chemical signaling pathways in the quorum sensing circuit of *Pseudomonas aeruginosa* / K. Vadakkan et al. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024. Vol. 254. P. 127861. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127861>.
80. Irene J.-M., Maite S.-M., Siobhán M. *Pseudomonas aeruginosa*: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22(6). P. 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>.
81. Santajit S., Sookrung N., Indrawattana N. Quorum sensing in ESKAPE bugs: a target for combating antimicrobial resistance and bacterial virulence. *Biology*. 2022. Vol. 11(10). P. 1466. <https://doi.org/10.3390/biology11101466>.
82. Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: relationships between normoxia and anoxia lifestyle / R. Papa et al. *Antibiotics*. 2023. Vol. 13(1). P. 1. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13010001>.
83. Flagellar motility and the mucus environment influence aggregation-mediated antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in chronic lung infection / M. G. Higgs et al. *mBio*. 2025. Vol. 16(6). P. e00831-25. <https://doi.org/10.1128/mbio.00831-25>.
84. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and antivirulence strategies to combat its drug resistance / C. Liao et al. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022. Vol. 6(12). P. 926758. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.926758>.

85. Chadha J., Harjai K., Chhibber S. Revisiting the virulence hallmarks of *Pseudomonas aeruginosa*: a chronicle through the perspective of quorum sensing. *Environmental Microbiology*. 2022. Vol. 24(6). P. 2630–2656. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15784>.
86. Antimicrobial resistance dynamics and the one-health strategy: a review / K. S. Singh et al. *Environmental Chemistry Letters*. 2021. Vol. 19(4). P. 2995–3007. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01238-3>.
87. Current strategies for combating biofilm-forming pathogens in clinical healthcare-associated infections / R. Biswas et al. *Indian Journal of Microbiology*. 2024. Vol. 64(3). P. 781–796. <https://doi.org/10.1007/s12088-024-01221-w>.
88. Doring G., Meisner C., Stern M. A double-blind randomized placebo-controlled phase III study of a *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine in cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. Vol. 104(26). P. 11020–11025. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702403104>.
89. Natural anti-biofilm agents: strategies to control biofilm-forming pathogens / R. Mishra et al. *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. P. 566325. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.566325>.
90. Study to Evaluate the Efficacy and Safety of TRL1068 for the Treatment of Prosthetic Joint Infection [Electronic resource] / *ClinicalTrials.gov*. URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06621251> (date of access: 28.10.2025). Title from the screen.
91. Comparison of Three Different Antibiotic Treatments Against Recurrent Urinary Tract Infections in Catheterized Patients [Electronic resource] / *ClinicalTrials.gov*. URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05402319> (date of access: 28.10.2025). Title from the screen.

92. Safety and Efficacy in Patients Treated for Hip or Knee PJI With Vancomycin and Tobramycin Joint Irrigation [Electronic resource] / *ClinicalTrials.gov*. URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03721328> (date of access: 28.10.2025). Title from the screen.
93. Effectiveness and Safety of Using Prontosan to Treat Bacterial Biofilm [Electronic resource] / *ClinicalTrials.gov*. URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06185465> (date of access: 28.10.2025). Title from the screen.
94. Acetic Acid 2% Solution for Skin Ulcers (ECA-AA) [Electronic resource] / *ClinicalTrials.gov*. URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06297967> (date of access: 28.10.2025). Title from the screen.
95. Safety and Tolerability of Single and Multiple Doses of SoftOx Biofilm Eradicator (SBE) in Chronic Leg Wounds [Electronic resource] / *ClinicalTrials.gov*. URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05710094> (date of access: 28.10.2025). Title from the screen.
96. Procellera® Compared to Standard of Care Treatment in Mitigating Biofilm Formation in Acute Trauma and Burn Wounds [Electronic resource] / *ClinicalTrials.gov*. URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04079998> (date of access: 28.10.2025). Title from the screen.
97. RATNO, Reducing Antibiotic Tolerance Using Nitric Oxide in CF - a Phase 2 Pilot Study (RATNO) [Electronic resource] / *ClinicalTrials.gov*. URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02295566> (date of access: 28.10.2025). Title from the screen.
98. Antimicrobial and antibiofilm activity of auranofin and its two derivatives bearing naproxen and acetylcysteine as ligands against *Staphylococci* / C. Ferretti et al. *Antibiotics*. 2025. Vol. 14(2). P. 118. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14020118>.

99. Auranofin inhibits virulence pathways in *Pseudomonas aeruginosa* / J. Kuok Hoong Yam et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2023. Vol. 79. P. 117167. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2023.117167>.
100. Auranofin coated catheters inhibit bacterial and fungal biofilms in a murine subcutaneous model / L. Felix et al. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2023. Vol. 13. P. 1135942. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1135942>.
101. Bactericidal and anti-biofilm activity of ebastine against *Staphylococcus aureus* / L. Zhao et al. *Letters in Applied Microbiology*. 2025. Vol. 78(7). ovaf086. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovaf086>.
102. Antimicrobial and antibiofilm effects of combinatorial treatment formulations of anti-inflammatory drugs—common antibiotics against pathogenic bacteria / F. Tabatabaeifar et al. *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 15(1). P. 4. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010004>.
103. Kwan B. W., Chowdhury N., Wood T. K. Combatting bacterial infections by killing persister cells with mitomycin C. *Environmental Microbiology*. 2015. Vol. 17(11). P. 4406–4414. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12873>.
104. Mitomycin C as an anti-persister strategy against *Klebsiella pneumoniae*: toxicity and synergy studies / O. Pacios et al. *Antibiotics*. 2024. Vol. 13(9). P. 815. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13090815>.
105. Niazy, A., Alrashed, M. M., Niazy, A. Mini-Review of the Effect of 5-Fluorouracil on *Pseudomonas aeruginosa*: Impact on Virulence, Biofilm Formation, and Bacterial Growth. 2025. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 16. P. 1584479. <https://doi: 10.3389/fmicb.2025.1584479>.
106. 5-Fluorouracil inhibits bacterial growth and reduces biofilm in addition to having synergetic effects with gentamicin against *Pseudomonas aeruginosa* / A. A. Niazy et al. *Microorganisms*. 2024. Vol. 12(11). P. 2257. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12112257>.

107. 5-Fluorouracil blocks quorum-sensing of biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in mice / F. Sedlmayer et al. *Nucleic Acids Research*. 2021. Vol. 49(13). P. e73–e73. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab251>.
108. Unravelling the potential of natural chelating agents in the control of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / M. M. Leitão et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2025. Vol. 283. P. 117163. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.117163>.
109. Metal Chelation as an Antibacterial Strategy for *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* / M. M. Golden et al. *RSC Chemical Biology*. 2024. Vol. 5(11). P. 1083–1096. <https://doi.org/10.1039/d4cb00175c>.
110. *Staphylococcus aureus*: biofilm formation and strategies against it / A. Nasser et al. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2022. Vol. 23(5). P. 664–678. <https://doi.org/10.2174/1389201022666210708171123>.
111. Sivaranjani M., Liu F., White A. P. Synergistic activity of tetrasodium-EDTA, ethanol and chlorhexidine hydrochloride against planktonic and biofilm cells of clinically relevant pathogens. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2021. Vol. 24. P. 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.12.002>.
112. Conservative Treatment of Catheter - Related Injections With Gentamicine/EDTA [Electronic resource] / *ClinicalTrials.gov*. URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT0478992> (date of access: 28.10.2025). Title from the screen.
113. Developments in strategies for Quorum Sensing virulence factor inhibition to combat bacterial drug resistance / S. Haque et al. *Microbial Pathogenesis*. 2018. Vol. 121. P. 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.046>.
114. Bacteriophage – A Promising Alternative Measure for Bacterial Biofilm Control / F. Tian et al. *Infection and Drug Resistance*. 2021. Vol. 14. P. 205–217. <https://doi.org/10.2147/idr.s290093>.

115. Amankwah S., Abdusemed K., Kassa T. Bacterial Biofilm Destruction: A Focused Review On The Recent Use of Phage-Based Strategies With Other Antibiofilm Agents. *Nanotechnology, Science and Applications*. 2021. Vol. 14. P. 161–177. <https://doi.org/10.2147/nsa.s325594>.
116. Antimicrobial Peptides: A Promising Alternative to Conventional Antimicrobials for Combating Polymicrobial Biofilms / C. A. Roque-Borda et al. *Advanced Science*. 2025. Vol. 12(1). P. e2410893. <https://doi.org/10.1002/advs.202410893>.
117. Batoni G., Maisetta G., Esin S. Therapeutic potential of antimicrobial peptides in polymicrobial biofilm-associated infections. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22(2). P. 482. <https://doi.org/10.3390/ijms22020482>.
118. Novel adamantane derivatives: synthesis, cytotoxicity and antimicrobial properties / Ł. Popiołek et al. *Applied sciences*. 2024. Vol. 14(9). P. 3700. <https://doi.org/10.3390/app14093700>.
119. Design, synthesis, anti-infective potency and mechanism study of novel Ru-based complexes containing substituted adamantane as antibacterial agents / L. Wang et al. *European journal of medicinal chemistry*. 2024. Vol. 270. P. 116378. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116378>.
120. Adamantane-pyrido[2,3-d]pyrimidine derivatives; synthesis, characterization and investigation of antimicrobial study / M. J. Tank et al. *Oriental journal of chemistry*. 2023. Vol. 39(2). P. 393–402. <https://doi.org/10.13005/ojc/390219>.
121. A new exploration toward adamantane derivatives as potential anti-MDR agents: Design, synthesis, antimicrobial, and radiosterilization activity as potential topoisomerase IV and DNA gyrase inhibitors / A. Ragab et al. *Drug development research*. 2022. Vol. 83(6). P. 1305–1330. <https://doi.org/10.1002/ddr.21960>.

122. Novel adamantane-linked isothiourea derivatives as potential chemotherapeutic agents: synthesis, structural insights, and antimicrobial/anti-proliferative profiles / F. A. M. Al-Omary et al. *ACS omega*. 2023. Vol. 8(14). P. 13456–13477. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01469>.
123. Adamantane appended antimicrobial supramolecular self-associating amphiphiles / A. Rutkauskaitė et al. *Supramolecular chemistry*. 2021. Vol. 33(12). P. 677–686. <https://doi.org/10.1080/10610278.2022.2161902>.
124. Вринчану Н. О., Максимов Ю. М. Лікувальна ефективність мазі на основі похідного аміноадамантина при асептичних ранах. *Biomedical and Biosocial Antropology*. 2008. №10. С. 265–267.
125. Антимікробна мазь для профілактики та лікування хвороб шкіри інфекційного генезу: пат. 79059 України: МПК А61К 31/13, А61Р 17/00, А61Р 31/00. № а 200607005; заявл. 23.06.2006; опубл. 10.05.2007, Бюл. № 6.
126. 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-(п-бензил,п-диметиламіно)-2-пропанол хлорид: пат. 89570 України: МПК С07С 213/00, С07С 215/00, А61К 31/14. № а200804978; заявл. 17.04.2008; опубл. 10.02.2010, Бюл. № 3.
127. Застосування 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-(N-бензил, N-диметиламіно)-2-пропанол хлориду як інгібітору утворення патогенних біоплівок: пат. 113780 України: МПК С07С 217/44, С07С 215/20, А61К 31/14. № а 201503826; заявл. 22.04.2015; опубл. 10.03.2017, Бюл. № 5.
128. Dane C., Montgomery A. P., Kassiou M. The adamantane scaffold: beyond a lipophilic moiety. *European journal of medicinal chemistry*. 2025. Vol. 291. P. 117592. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.117592>.
129. Dragomanova S., Andonova V. Adamantane-containing drug delivery systems. *Pharmacia*. 2023. Vol. 70(4). P. 1057–1066. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.70.e111593>.

130. Yousefbeigi S., Marsusi F. Advanced computational approaches to evaluate the potential of new-generation adamantane-based drugs as viroporin inhibitors: a case study on SARS-CoV-2. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2025. Vol. 129(32). P. 8127–8143. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5c02898>.
131. Butterworth R. F. Potential for the repurposing of adamantane antivirals for COVID-19. *Drugs in R&D*. 2021. Vol. 21(3). P. 267–272. <https://doi.org/10.1007/s40268-021-00351-6>.
132. Nascent pharmacological advancement in adamantane derivatives / A. Ragshaniya et al. *Archiv der Pharmazie*. 2024. Vol. 357(3). P. 2300595. <https://doi.org/10.1002/ardp.202300595>.
133. Adamantane – A lead structure for drugs in clinical practice / K. Spilovska et al. *Current medicinal chemistry*. 2016. Vol. 23(29). P. 3245–3266. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160525114026>.
134. The novel adamantane derivatives as potential mediators of inflammation and neural plasticity in diabetes mice with cognitive impairment / I. Piątkowska-Chmiel et al. *Scientific reports*. 2022. Vol. 12(1). P. 6708. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10187-y>.
135. Garrino M. G., Henquin J. C. Adamantane derivatives: a new class of insulin secretagogues. *British journal of pharmacology*. 1987. Vol. 90(3). P. 583–591. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1987.tb11209.x>.
136. Adamantane amine-linked chloroquinoline derivatives as chloroquine resistance modulating agents in *Plasmodium falciparum* / O. M. Yvette et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2018. Vol. 28(8). P. 1287–1291. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.03.026>.
137. The tuberculosis drug candidate SQ109 and its analogs have multistage activity against *Plasmodium falciparum* / S. J. Watson et al. *ACS Infectious Diseases*. 2024. Vol. 10(9). P. 3358–3367. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.4c00461>.

138. Synthesis and testing of analogs of the tuberculosis drug candidate SQ109 against bacteria and protozoa: identification of lead compounds against *Mycobacterium abscessus* and malaria parasites / M. Stampolaki et al. *ACS Infectious Diseases*. 2023. Vol. 9(2). P. 342–364. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00537>.
139. Alamri M. A. Fluorophenyl adamantane derivatives anticancer activity and biological targets. *Journal of Molecular Structure*. 2024. Vol. 1326. P. 141103. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.141103>.
140. Optimizing adamantane derivatives for enhanced EGFR inhibition in MCF-7 breast cancer cells / P. M. Uppar et al. *Journal of Molecular Structure*. 2025. Vol. 1331. P. 141554. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2025.141554>.
141. Adamantane-Quinoxalone hybrids: precision chemotypes and their molecular mechanisms in acute myeloid leukemia / S. D. Shinde et al. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2025. Vol. 68(7). P. 7963–7706. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5c00262>.
142. Synthesis and *in vitro* antibacterial, antifungal, anti-proliferative activities of novel adamantane-containing thiazole compounds / E. T. Warda et al. *Scientific reports*. 2022. Vol. 12(1). P. 21058. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25390-0>.
143. Emmerich V. K., Purvis C. G., Feldman S. R. An overview of adapalene and benzoyl peroxide once-daily topical gel as a therapeutic option for acne. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2021. Vol. 22(13). P. 1661–1667. <https://doi.org/10.1080/14656566.2021.1939678>.
144. Recent advances regarding the therapeutic potential of adapalene / A. Rusu et al. *Pharmaceuticals*. 2020. Vol. 13(9). P. 217. <https://doi.org/10.3390/ph13090217>.

145. Structure-Activity relationship and anticancer profile of second-generation anti-MRSA synthetic retinoids / A. V. Cheng et al. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2019. Vol. 11(3). P. 393–397. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00159>.
146. Parab D. D., Kohli H. K. Synthesis, Antibacterial and Antifungal Activity of N'-(3-Hydroxy-4-Methoxy Benzyldiene) Adamantane-1-Carbohydrazide (IVAC) and Its Isomers. *Journal of Scientific Research*. 2025. Vol. 17(2). P. 547–560. <https://doi.org/10.3329/jsr.v17i2.75876>
147. Synthesis, antimicrobial, and anti-proliferative activities of novel 4-(adamantan-1-yl)-1-arylidene-3-thiosemicarbazides, 4-arylmethyl N'-(adamantan-1-yl)piperidine-1-carbothioimides, and related derivatives / A. A. Al-Mutairi et al. *Molecules*. 2019. Vol. 24(23). P. 4308. <https://doi.org/10.3390/molecules24234308>.
148. Overcoming *Mycobacterium tuberculosis* through small molecule inhibitors to break down cell wall synthesis / W. Kuang et al. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2022. Vol. 12(8). P. 3201 – 3214. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.04.014>.
149. Efficacy of novel regimens targeting oxidative phosphorylation in *Mycobacterium tuberculosis* / D. Li et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2025. Vol. 69(6). P. e0001925. <https://doi.org/10.1128/aac.00019-25>.
150. Вринчану Н. О. Антимікробні властивості нових похідних аміноадамантану та експериментальне обґрунтування доцільності їх медичного використання: автореф. дис. ... д-ра. мед. наук : спец. 14.03.05. К., 2010. 38 с.
151. Дудікова Д. М. Антимікробні властивості четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу: автореф. дис. ... канд. біол. наук : спец. 14.03.05. К., 2018. 25 с.

152. Dudikova D. M., Vrynchanu N. O., Nosar V. I. Alteration of *Pseudomonas aeruginosa* respiration by 4-(1-adamantyl)-phenol derivative. *Biologija*. 2018. Vol. 64(3). P. 228–234. <https://doi.org/10.6001/biologija.v64i3.3828>.
153. Державна Фармакопея України. 2-е вид. / Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2015. Т. 1. 1128 с.
154. ISO 20776-1:2019. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases [Electronic resource] / Geneva: International Organization for Standardization. 2019. URL: <https://www.iso.org/standard/70464.html>. (date of access: 25.10.2022).
155. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters [Electronic resource] / *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. Version 15.0. 2025. URL: <http://www.eucast.org> (date of access: 01.01.2025).
156. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100 / Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2020. 294 p.
157. O'Toole G. A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*. 2011. № 47. P. 2437. <https://doi.org/10.3791/2437>.
158. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. / G. D. Christensen et al. *Journal of clinical microbiology*. 1985. Vol. 22(6). P. 996–1006. <https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>.

159. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci / S. Stepanović et al. *APMIS*. 2007. Vol. 115(8). P. 891–899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.
160. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms / K. Toté et al. *Letters in Applied Microbiology*. 2007. Vol. 46(2). P. 249–254. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2007.02298.x>.
161. Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay / M. E. Sandberg et al. *Journal of Microbiological Methods*. 2009. Vol. 78(1). P. 104–106. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.04.014>.
162. Determination of cell viability using acridine orange/propidium iodide dual-spectrofluorometry assay / H. Hussain et al. *Cogent Food & Agriculture*. 2019. Vol. 5(1). P. 1582398. <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1582398>.
163. New derivatives of pyridoxine exhibit high antibacterial activity against biofilm-embedded *Staphylococcus* cells / A. R. Kayumov et al. *BioMed Research International*. 2015. Vol. 2015. P. 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/890968>.
164. Marques C. N. H. Isolation of persister cells from biofilm and planktonic populations of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bio-protocol*. 2015. Vol. 5(18). P. e1590. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1590>.
165. Chen C.-Y., Nace G. W., Irwin P. L. A 6×6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*. 2003. Vol. 55(2). P. 475–479. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(03\)00194-5](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(03)00194-5).

166. Efficacy of the myeloperoxidase enzyme system in a rat dermal model for the prevention of surgical site infection / A. Robins et al. 51st Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. Washington, 20-23 February 2005. Poster No: 1379.
167. Експериментальне вивчення нових препаратів для місцевого лікування ран: методичні рекомендації / Л. В. Яковлева та ін.; Х: НФаУ, 2013. 52 с.
168. Яковлєва Л. В., Ткачова О. В., Бутко Я. О. Алгоритм доклінічного вивчення препаратів для місцевого лікування ранового процесу: метод. рек. / Київ : Укрмедпатентінформ, 2013. 32 с.
169. Теория и тактика местного лечения гнойных ран / ред. Б. М. Даценко. К. : Здоров'я, 1995. 380 с.
170. Efficacy of antimicrobial agents delivered to hernia meshes using an adaptable thermo-responsive hyaluronic acid-based coating / B. Pérez-Köhler et al. *Hernia*. 2019. Vol. 24(6). P. 1201–1210. <https://doi.org/10.1007/s10029-019-02096-3>.
171. A critical review of the *in vitro* and *in vivo* models for the evaluation of anti-infective meshes / O. Guillaume et al. *Hernia*. 2018. Vol. 22(6). P. 961–974. <https://doi.org/10.1007/s10029-018-1807-z>.
172. Bellon-Fontaine M. N., Rault J., van Oss C. J. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*. 1996. Vol. 7(1-2). P. 47–53. [https://doi.org/10.1016/0927-7765\(96\)01272-6](https://doi.org/10.1016/0927-7765(96)01272-6).
173. Жорняк О. І., Палій В. Г. Вивчення впливу таблетованих антисептичних препаратів на адгезивні властивості мікроорганізмів / *Сучасні Медичні Технології*. 2012. № 3. С. 63–66.

174. Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113 / A. Navazo et al. *Microbial biotechnology*. 2009. Vol. 2(4). P. 489–498. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00103.x>.
175. Kinscherf T. G., Willis D. K. Swarming by *Pseudomonas syringae* B728a requires *gacS* (*lemA*) and *gacA* but not the acyl-homoserine lactone biosynthetic gene *ahlI*. *Journal of bacteriology*. 1999. Vol. 181(13). P. 4133–4136. <https://doi.org/10.1128/jb.181.13.4133-4136.1999>.
176. Semmler A. B. T., Whitchurch C. B., Mattick J. S. A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 1999. Vol. 145(10). P. 2863–2873. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-10-2863>.
177. A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability / A. Chiba et al. *Microbial biotechnology*. 2014. Vol. 8(3). P. 392–403. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12155>.
178. Protein measurement with the folin phenol reagent / O. Lowry et al. *Journal of Biological Chemistry*. 1951. Vol. 193(1). P. 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6).
179. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. DuBois et al. *Analytical Chemistry*. 1956. Vol. 28(3). P. 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
180. Ghafoor A., Hay I. D., Rehm B. H. A. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011. Vol. 77(15). P. 5238–5246. <https://doi.org/10.1128/aem.00637-11>.
181. Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose / A. J. Spiers et al. *Molecular microbiology*. 2003. Vol. 50(1). P. 15–27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03670.x>.

182. Congo red binding and salt aggregation as indicators of virulence in *Shigella species*. / F. Qadri et al. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988. Vol. 26(7). P. 1343–1348. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.7.1343-1348.1988>.
183. Taglialegna A., Lasa I., Valle J. Amyloid structures as biofilm matrix scaffolds. *Journal of Bacteriology*. 2016. Vol. 198(19). P. 2579–2588. <https://doi.org/10.1128/jb.00122-16>.
184. Penetration of topically used antimicrobials through *Staphylococcus aureus* biofilms: a comparative study using different models / Y. N. Albayaty et al. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2018. Vol. 48. P. 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.015>.
185. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. / D. W. Essar et al. *Journal of Bacteriology*. 1990. Vol. 172(2). P. 884–900. <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.884-900.1990>.
186. Involvement of a phospholipase C in the hemolytic activity of a clinical strain of *Pseudomonas fluorescens* / G. Rossignol et al. *BMC Microbiology*. 2008. Vol. 8(1). P. 189. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-189>.
187. Montville T. J. Dual-Substrate plate diffusion assay for proteases. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983. Vol. 45(1). P. 200–204. <https://doi.org/10.1128/aem.45.1.200-204.1983>.
188. High-throughput detection method of quorum-sensing molecules by colorimetry and its applications / Y.-H. Yang et al. *Analytical Biochemistry*. 2006. Vol. 356(2). P. 297–299. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.05.030>.
189. Ідентифікація генів антибіотикорезистентності у *Salmonella* spp. методом полімеразної ланцюгової реакції / Л. М. Іщенко та ін. *Аграрний вісник Причорномор'я*. 2019. Т. 93. С. 284–289.

190. AL-Sheikhly M. A. R. H., Musleh L. N., Al-Mathkhury H. J. F. Gene expression of *pelA* and *pslA* in *Pseudomonas aeruginosa* under gentamicin stress. *Iraqi Journal of Science*. 2020. Vol. 61(2). P. 295–305. <https://doi.org/10.24996/ijs.2020.61.2.6>.
191. Biofilm formation and expression of virulence genes of microorganisms grown in contact with a new bioactive glass / V. de C. Oliveira et al. *Pathogens*. 2020. Vol. 9(11). P. 927. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110927>.
192. Polymorphonuclear leukocytes or hydrogen peroxide enhance biofilm development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* / Q. Tan et al. *Mediators of inflammation*. 2018. Vol. 2018. P. 1–14. <https://doi.org/10.1155/2018/8151362>.
193. Integron types, antimicrobial resistance genes, virulence gene profile, alginate production and biofilm formation in Iranian cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates / P. Abazar et al. *Infez Med*. 2018. Vol. 26(3). P. 226–236.
194. Effects of ambroxol on alginate of mature *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / F. Li et al. *Current Microbiology*. 2008. Vol. 57(1). P. 1–7. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9142-8>.
195. Aspirin is an efficient inhibitor of quorum sensing, virulence and toxins in *Pseudomonas aeruginosa* / S. A. El-Mowafy et al. *Microbial Pathogenesis*. 2014. Vol. 74. P. 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.07.008>.
196. Relative expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes analyzed by a real time RT-PCR method during lung infection in rats / J. Be'atrice et al. *FEMS Microbiology Letters*. 2005. Vol. 243(1). P. 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.012>.

197. Khattab M. A, Nour M. S, ElSheshtawy N. M. Genetic identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes among different isolates. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. 2015. Vol. 7(5). P. 274 – 277. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000224>.
198. Biofilm formation and virulence factors among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients / Z. G. Corehtash et al. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2015. Vol. 8(10). P. e22345. <https://doi.org/10.5812/jjm.22345>.
199. Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / A. P. Lenz et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008. Vol. 74(14). P. 4463–4471. <https://doi.org/10.1128/AEM.00710-08>.
200. Association of overexpression of efflux pump genes with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains clinically isolated from urinary tract infection patients / K. Shigemura et al. *The Journal of Antibiotics*. 2015. Vol. 68(9). P. 568–572. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.34>.
201. Interference with *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and virulence by the mycobacterial *Pseudomonas* quinolone signal dioxygenase Aqdc in combination with the N-acylhomoserine lactone lactonase QsdA / F. S. Birmes et al. *Infection and Immunity*. 2019. Vol. 87(10). P. e00278-19. <https://doi.org/10.1128/iai.00278-19>.
202. Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR / H. Savli et al. *Journal of Medical Microbiology*. 2003. Vol. 52(5). P. 403–408. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05132-0>.
203. Candan E. D., Aksöz N. *Escherichia coli*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2017. Vol. 60. P. e17160410. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160416>.

204. Detection of *pap*, *sfa*, *afa*, *foc*, and *fim* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* isolates collected from patients with urinary tract infection / M. Rahdar et al. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2015. Vol. 8(8). P. e22647. <https://doi.org/10.5812/jjm.22647>.
205. Global gene expression analysis of *Escherichia coli* K-12 DH5 α after exposure to 2.4 GHz wireless fidelity radiation / I. H. Said-Salman et al. *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9(1). P. 14425. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51046-7>.
206. Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing / S. Y. Tartof et al. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005. Vol. 43(12). P. 5860–5864. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.12.5860-5864.2005>.
207. The role of quorum sensing in *Escherichia coli* (ETEC) virulence factors / R. T. Sturbelle et al. *Veterinary Microbiology*. 2015. Vol. 180(3-4). P. 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.015>.
208. Rapid PCR-Based Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Screening Swabs / D. Jonas et al. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002. Vol. 40(5). P. 1821–1823. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.5.1821-1823.2002>.
209. Baicalein inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and the quorum sensing system *in vitro* / Y. Chen et al. *PLoS One*. 2016. Vol. 11(4). P. e0153468. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153468>.
210. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus* / S. S. Atshan et al. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012. Vol. 2012(6). P. 976972. <https://doi.org/10.1155/2012/976972>.
211. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa / T. A. Melo et al. *BMC Microbiology*. 2016. Vol. 16(1). P. 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0871-8>.

212. Influence of adhesion force on *icaA* and *cidA* gene expression and production of matrix components in *Staphylococcus aureus* biofilms / A. K. Harapanahalli et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015. Vol. 81(10). P. 3369–3378. <https://doi.org/10.1128/AEM.04178-14>.
213. Zelena L., Gretskey I., Gromozova E. Influence of ultrahigh frequency irradiation on *Photobacterium phosphoreum luxB* gene expression. *Central European Journal of Biology*. 2014. Vol. 9(10). P. 1004–1010. <https://doi.org/10.2478/s11535-014-0347-5>.
214. Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods*. 2001. Vol. 25(4). P. 402–428. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
215. Heat treatment of bacteria: A simple method of DNA extraction for molecular techniques / A. A. Dashti et al. *Kuwait Medical Journal*. 2009. Vol. 41(2). P. 117–122.
216. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 2021. Vol. 38(7). P. 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
217. Статистичні методи в біології: підручник / Ю.І. Прилуцький та ін. Київ: Наукова думка, 2017. 216 с.
218. Effect of adamantane derivative on expression of biofilm-associated genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / N. Humeniuk et al. *Medicine in drug discovery*. 2023. Vol. 18. P. 100155. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2023.100155>.
219. Yousefpour Z., Davarzani F., Owlia P. Evaluating of the effects of sub-MIC concentrations of gentamicin on biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian Journal of Pathology*. 2021. Vol. 16(4). P. 403–410. <https://doi.org/10.30699/ijp.2021.524220.2584>.

220. Antimicrobial Sub-MIC induces *Staphylococcus aureus* biofilm formation without affecting the bacterial count / R. Elawady et al. *BMC Infectious Diseases*. 2024. Vol. 24(1). P. 1065. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09790-3>.
221. Effects of subinhibitory concentrations of chlorhexidine and mupirocin on biofilm formation in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / K. H. Park et al. *Journal of Hospital Infection*. 2020. Vol. 106(2). P. 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.07.010>.
222. Moori Bakhtiari N., Ezzati Givi M., Goudarzi S. Effect of sub-inhibitory concentrations of antibiotic on the production and N-acetylglucosamine scale of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 2023. Vol. 74(1). P. 5363–5370. <https://doi.org/10.12681/jhvms.29576>.
223. *In vitro* antibiofilm activity of resveratrol against avian pathogenic *Escherichia coli* / X. Ruan et al. *BMC Veterinary Research*. 2021. Vol. 17(1). P. 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02961-3>.
224. Antibiofilm Activities of Cinnamaldehyde Analogs against Uropathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* / Y. Kim et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23(13). P. 7225. <https://doi.org/10.3390/ijms23137225>.
225. Активність похідних амінопропанолу відносно біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* / Д. М. Дудікова та ін. *Фармацевтичний журнал*. 2017. № 1. С. 93–100.
226. Abdullah S., Younis K. The impact of minimum inhibitory and sub inhibitory concentrations of antibiotics on *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm production. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*. 2024. Vol. 55(5). P. 1423–1433. <https://doi.org/10.21608/ejvs.2024.255158.1725>.

227. Effect of sub-inhibitory concentrations of cefepime on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* / S. A. Hagra et al. *Canadian Journal of Microbiology*. 2021. Vol. 67(12). P. 894–901. <https://doi.org/10.1139/cjm-2021-0229>.
228. Inhibition of biofilm and virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* by sub-inhibitory concentrations of aminoglycosides / F. Khan et al. *Microbial Pathogenesis*. 2020. Vol. 146. P. 104249. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104249>.
229. Bacterial adhesion at the single-cell level / C. Berne et al. *Nature Reviews Microbiology*. 2018. Vol. 16(10). P. 616–627. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0057-5>.
230. Krasowska A., Sigler K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2014. Vol. 4. P. 112. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00112>.
231. Kearns D. B. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*. 2010. Vol. 8(9). P. 634–644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>.
232. Maier B., Wong G. C. L. How bacteria use type IV pili machinery on surfaces. *Trends in Microbiology*. 2015. Vol. 23(12). P. 775–788. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.09.002>.
233. Wilmaerts D., Michiels J. Antibiotic persistence: the power of being a diploid. *Current Biology*. 2021. Vol. 31(10). P. R467–R495. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.03.072>.
234. *In vitro* studies of persister cells / N. Kaldalu et al. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2020. Vol. 84(10). P. 1128. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00070-20>.

235. Generation of persister cells of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* by chemical treatment and evaluation of their susceptibility to membrane-targeting agents / L. Grassi et al. *Frontiers in Microbiology*. 2017. Vol. 8 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01917>.
236. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*. 2006. Vol. 5(1). P. 48–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1557>.
237. Möker N., Dean C. R., Tao J. *Pseudomonas aeruginosa* Increases Formation of Multidrug-Tolerant Persister Cells in Response to Quorum-Sensing Signaling Molecules. *Journal of Bacteriology*. 2010. Vol. 192(7). P. 1946–1955. <https://doi.org/10.1128/jb.01231-09>.
238. Вринчану Н. О., Шаламай А. С., Балакир Л. В. Дослідження ефективності мазі, розробленої на основі адамантанвмісної речовини. Мат. XII з'їзду товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського, м. Ужгород, 25 – 30 травня 2009 р. Ужгород, 2009. С. 172.
239. Дудикова Д. М., Гриневич С. В. Острая токсичность производных 1-адамантанфенола. *Проблемы и перспективы развития современной медицины*. 2015. Т. 2. С. 26–28.
240. Biofilm and Antimicrobial Resistance: Mechanisms, Implications, and Emerging Solutions / B. Singh et al. *Microbiology Research*. 2025. Vol. 16(8). P. 183. <https://doi.org/10.3390/microbiolres16080183>.
241. Liu H. Y., Prentice E. L., Webber M. A. Mechanisms of antimicrobial resistance in biofilms. *npj Antimicrobials and Resistance*. 2024. Vol. 2(1). P. 27. <https://doi.org/10.1038/s44259-024-00046-3>.
242. Sharif S., Yadav A. K. Bacterial Biofilm and Its Role in Antibiotic Resistance. *The Microbe*. 2025. Vol. 7. P. 100356. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100356>.

243. New Attempts to Inhibit Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm? A Combination of Daptomycin and Azithromycin / Y. Zhou et al. *Infection and Drug Resistance*. 2023. Vol. 16. P. 7029–7040. <https://doi.org/10.2147/idr.s433439>.
244. Antibacterial, antibiofilm, and anti-adhesion activities of Piper betle leaf extract against Avian pathogenic *Escherichia coli* / P. Kulnanan et al. *Archives of Microbiology*. 2021. Vol. 204(1). P. 49. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02701-z>.
245. *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome adaptations from colonization to biofilm infection of skin wounds / P. D'Arpa et al. *Scientific Reports*. 2021. Vol. 11(1). P. 20632. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00073-4>.
246. Cell death and biomass reduction in biofilms of multidrug resistant extended spectrum β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolates by 1,8-cineole / N. M. Vazquez та ін. *PLoS ONE*. 2020. Vol. 15(11). P. e0241978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241978>.
247. Secondary Effects of Antibiotics on Microbial Biofilms / A. Penesyan et al. *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. P. 2109. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02109>.
248. Gram Negative Biofilms: Structural and Functional Responses to Destruction by Antibiotic-Loaded Mixed Polymeric Micelles / T. Damyanova et al. *Microorganisms*. 2024. Vol. 12(12). P. 2670. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12122670>.
249. Bactericidal and anti-biofilm effects of uncharged and cationic ultrasound-responsive nitric oxide microbubbles on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / G. LuTheryn et al. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022. Vol. 12. P. 956808. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.956808>.

250. Piperine, a phytochemical prevents the biofilm city of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A biochemical approach to understand the underlying mechanism / S. Das et al. *Microbial Pathogenesis*. 2024. Vol. 189. P. 106601. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106601>.
251. Piperine, a Plant Alkaloid, Exhibits Efficient Disintegration of the Pre-existing Biofilm of *Staphylococcus aureus*: a Step Towards Effective Management of Biofilm Threats / S. Das et al. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2024. Vol. 196(3). P. 1272–1291. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04610-x>.
252. Aflakian F., Hashemitabar G. Biosynthesized silver nanoparticles at subinhibitory concentrations as inhibitors of quorum sensing, pathogenicity, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Heliyon*. 2025. Vol. 11(4). P. e42899. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e42899>.
253. Attenuation of Las/Rhl quorum sensing regulated virulence and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by artocarpesin / M. S. Mohan et al. *Microbial Pathogenesis*. 2024. Vol. 189. P. 106609. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106609>.
254. Cuminaldehyde exhibits potential antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa* involving reactive oxygen species (ROS) accumulation: a way forward towards sustainable biofilm management / S. Chatterjee et al. *3 Biotech*. 2021. Vol. 11(11). P. 485. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-03013-1>.
255. Antibiofilm property and multiple action of peptide PEW300 against *Pseudomonas aeruginosa* / M. Wang et al. *Frontiers in Microbiology*. 2022. Vol. 13. P. 963292. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.963292>.
256. Zeuko'O M. E. The mechanisms of bacterial biofilm inhibition and eradication: The search for alternative antibiofilm agents [Electronic resource] / *In Focus on Bacterial Biofilms*. IntechOpen. 2022. URL: <https://cdn.intechopen.com/pdfs/81928.pdf>. (date of access: 28.10.2025). Title from the screen.

257. Antibiofilm action of plant terpenes in *Salmonella strains*: potential inhibitors of the synthesis of extracellular polymeric substances / J. J. Palomares-Navarro et al. *Pathogens*. 2022. Vol. 12(1). P. 35. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010035>.
258. François P., Schrenzel J., Götz F. Biology and regulation of staphylococcal biofilm. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24(6). P. 5218. <https://doi.org/10.3390/ijms24065218>.
259. Shukla S. K., Rao T. S. Targeting hydrophobicity in biofilm-associated protein (Bap) as a novel antibiofilm strategy against *Staphylococcus aureus* biofilm. *Biophysical chemistry*. 2022. Vol. 289. P. 106860. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2022.106860>.
260. Control measurements of *Escherichia coli* biofilm: a review / F. Zhou et al. *Foods*. 2022. Vol. 11(16). P. 2469. <https://doi.org/10.3390/foods11162469>.
261. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its control / A. Vetrivel et al. *Biologics*. 2021. Vol. 1(3). P. 312–336. <https://doi.org/10.3390/biologics1030019>.
262. Reichhardt C. The *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix protein cdra has similarities to other fibrillar adhesin proteins. *Journal of Bacteriology*. 2023. Vol. 205(5). P. e00019-23. <https://doi.org/10.1128/jb.00019-23>.
263. Biofilm matrix: a multifaceted layer of biomolecules and a defensive barrier against antimicrobials / H. Ragupathi et al. *Archives of Microbiology*. 2024. Vol. 206(11). P. 432. <https://doi.org/10.1007/s00203-024-04157-3>.
264. Antimicrobial resistance in biofilms: Exploring marine actinobacteria as a potential source of antibiotics and biofilm inhibitors / N. Goel et al. *Biotechnology Reports*. 2021. Vol. 30. P. e00613. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00613>.
265. A comprehensive review on biofilm-associated infections: Mechanisms, diagnostic challenges, and innovative therapeutic strategies / O. Grari et al. *The Microbe*. 2025. Vol. 8. P. 100436. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100436>.

266. Penetration barrier contributes to bacterial biofilm-associated resistance against only select antibiotics, and exhibits genus-, strain- and antibiotic-specific differences / R. Singh et al. *Pathogens and Disease*. 2016. Vol. 74(6). P. ftw056. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw056>.
267. Detection of *mecA* Genes in Hospital-Acquired MRSA and SOSA Strains Associated with Biofilm Formation / R. González-Vázquez et al. *Pathogens*. 2024. Vol. 13(3). P. 212. <https://doi.org/10.3390/pathogens13030212>.
268. Unveiling genetic profiles and correlations of biofilm-associated genes, quorum sensing, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from a Malaysian Teaching Hospital / Y. L. Chan et al. *European Journal of Medical Research*. 2024. Vol. 29(1). P. 246. <https://doi.org/10.1186/s40001-024-01831-6>.
269. Beenken K. E., Smeltzer M. S. *Staphylococcus aureus* Biofilm-Associated Infections: Have We Found a Clinically Relevant Target?. *Microorganisms*. 2025. Vol. 13(4). P. 852. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13040852>.
270. Взаємодія похідного адамантану з компонентами біомембран / Н. О. Вринчану та ін. *Вісник Вінницького національного медичного університету*. 2007. Т. 11 (2/1). С. 534 – 535.
271. Antibiotic-induced DNA damage results in a controlled loss of pH homeostasis and genome instability / J. A. Booth et al. *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10(1). P. 19422. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76426-2>.
272. Couce A., Blázquez J. Side effects of antibiotics on genetic variability. *FEMS Microbiology Reviews*. 2009. Vol. 33(3). P. 531–538. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00165.x>.
273. Martín-Rodríguez A. J. Respiration-induced biofilm formation as a driver for bacterial niche colonization. *Trends in Microbiology*. 2022. Vol. 31(2). P. 120–134. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.08.007>.

274. Coordination of gene expression with cell size enables *Escherichia coli* to efficiently maintain motility across conditions / T. Honda et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022. Vol. 119(37). P. e2110342119 URL. <https://doi.org/10.1073/pnas.2110342119>.
275. Role of Pel and Psl polysaccharides in the response of *Pseudomonas aeruginosa* to environmental challenges: oxidative stress agents (UVA, H₂O₂, sodium hypochlorite) and its competitor *Staphylococcus aureus* / R. Grossich et al. *Microbiology*. 2023. Vol. 169(2). P. 001301. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001301>.
276. Effect of azithromycin and phenylalanine-arginine beta-naphthylamide on quorum sensing and virulence factors in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* / A. Elsheredy et al. *Iranian Journal of Microbiology*. 2021. Vol. 13(1). P. 37. <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i1.5491>.
277. Different mutations in *mucA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strains in cystic fibrosis patients and their effect on *algU* gene expression / G. Pulcrano et al. *New microbiologica*. 2012. Vol. 35(3). P. 295–305.
278. Mudaliar S. B., Bharath Prasad A. S. A biomedical perspective of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*: its applications and challenges. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2024. Vol. 40(3). P. 90. <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03889-0>.
279. Multidrug-Resistant Bacteria Quorum-Sensing Inhibitors: a particular focus on *Pseudomonas aeruginosa* / A. Maiga et al. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2025. Vol. 281. P. 117008. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.117008>.
280. Jurado-Martín I., Sainz-Mejías M., McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22(6). P. 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>.

281. The MexJK Multidrug Efflux Pump Is Not Involved in Acquired or Intrinsic Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, but Modulates the Bacterial Quorum Sensing Response / R. Amieva et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23(14). P. 7492. <https://doi.org/10.3390/ijms23147492>.
282. The impaired quorum sensing response of *Pseudomonas aeruginosa* MexAB-OprM efflux pump overexpressing mutants is not due to non-physiological efflux of 3-oxo-C₁₂-HSL / M. Alcalde-Rico et al. *Environmental Microbiology*. 2020. Vol. 22(12). P. 5167–5188. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15177>.
283. Efflux pumps as potential targets for biofilm inhibition / J. Ren et al. *Frontiers in Microbiology*. 2024. Vol. 15. P. 1315238. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1315238>.
284. Role of the Multidrug Resistance Efflux Pump MexCD-OprJ in the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Response / M. Alcalde-Rico et al. *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9. P. 2752. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02752>.
285. Role of Efflux Pump-Mediated Antibiotic Resistance in Quorum Sensing-Regulated Biofilm Formation by *Salmonella Typhimurium* / J. Dawan et al. *Pathogens*. 2022. Vol. 11(2). P. 147. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020147>.
286. Biofilm-mediated infections by multidrug-resistant microbes: a comprehensive exploration and forward perspectives / M. M. Zafer et al. *Archives of Microbiology*. 2024. Vol. 206(3). P. 101. <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03826-z>.
287. Bacterial biofilm infections, their resistance to antibiotics therapy and current treatment strategies / A. Singh et al. *Biomedical Materials*. 2022. Vol. 17(2). P. 022003. <https://doi.org/10.1088/1748-605x/ac50f6>.

288. Strategy to combat biofilms: a focus on biofilm dispersal enzymes / S. Wang et al. *npj Biofilms and Microbiomes*. 2023. Vol. 9(1). P. 63. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00427-y>.
289. Pant N., Eisen D. P. Non-Antimicrobial Adjuvant Strategies to Tackle Biofilm-Related *Staphylococcus aureus* Prosthetic Joint Infections. *Antibiotics*. 2021. Vol. 10(9). P. 1060. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091060>.
290. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects / C. R. Arciola et al. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2015. Vol. 5. P. 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00007>.
291. Effect of trans-Cinnamaldehyde on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation: Metabolic Activity Assessment and Analysis of the Biofilm-Associated Genes Expression / B. Kot et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Vol. 21(1). P. 102. <https://doi.org/10.3390/ijms21010102>.
292. New Molecular Mechanism of Superbiofilm Elaboration in a *Staphylococcus aureus* Clinical Strain / L. Yu et al. *Microbiology Spectrum*. 2023. Vol. 11(2). P. e0442522. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04425-22>.
293. Repurposing cinacalcet suppresses multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by disruption of cell membrane and inhibits biofilm by targeting IcaR / Z.-Y. Fang et al. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2024. Vol. 79(4). P. 903–917. <https://doi.org/10.1093/jac/dkae051>.
294. Mohammad G. J. Expression of *icaA*, *B*, *D*, *R* and *ebpS* biofilm-associated genes in methicillin-resistant-*Staphylococcus aureus* in exposure to curcumin. *Gene Reports*. 2022. Vol. 27. P. 101616. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101616>.
295. Inhibition of *S. aureus* biofilm formation by linezolid alleviates sepsis-induced lung injury caused by *S. aureus* infection through direct inhibition of *icaA* activity / H. Kuang et al. *New Microbiol*. 2023. Vol. 46(3). P. 285–295.

296. Therapeutic Targeting of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator (*agr*) System / L. Tan et al. *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9. P. 55. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00055>.
297. Sub-inhibitory concentrations of oxacillin modify the expression of *agr* locus in *Staphylococcus aureus* clinical strains belonging to different clonal complexes / E. Viedma et al. *BMC Infectious Diseases*. 2018. Vol. 18(1). P. 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3088-7>.
298. Subinhibitory Concentrations of Mupirocin Stimulate *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation by Upregulating *cidA* / Y. Jin et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020. Vol. 64(3). P. e01912-19. <https://doi.org/10.1128/aac.01912-19>.
299. Impact of Bacterial and Human Genetic Variation on *Staphylococcus aureus* Infections / J. A. Messina et al. *PLOS Pathogens*. 2016. Vol. 12(1). P. e1005330. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005330>.
300. Altered genomic methylation promotes *Staphylococcus aureus* persistence in hospital environment / Y. Yamazaki et al. *Nature Communications*. 2024. Vol. 15(1). P. 9619. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-54033-3>.
301. *Staphylococcus aureus* adhesion to the host / K. A. Berry et al. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2022. Vol. 1515(1). P. 75–96. <https://doi.org/10.1111/nyas.14807>.
302. Recent Developments in the Inhibition of Bacterial Adhesion as Promising Anti-Virulence Strategy / C. Pecoraro et al. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24(5). P. 4872. <https://doi.org/10.3390/ijms24054872>.
303. Effect of manuka honey on biofilm-associated genes expression during methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation / B. Kot et al. *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10(1). P. 13552. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70666-y>.

304. Artesunate inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation by reducing alpha-toxin synthesis / Y. Qian et al. *Archives of Microbiology*. 2020. Vol. 203(2). P. 707-717. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02077-6>.
305. The Role of Subinhibitory Concentrations of Daptomycin and Tigecycline in Modulating Virulence in *Staphylococcus aureus* / S. S. Atshan et al. *Antibiotics*. 2021. Vol. 10(1). P. 39. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010039>.
306. Regulatory Mechanisms and Promising Applications of Quorum Sensing-Inhibiting Agents in Control of Bacterial Biofilm Formation / L. Zhou et al. *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. P. 58960. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.589640>.
307. Medical Scope of Biofilm and Quorum Sensing during Biofilm Formation: Systematic Review / M. Erkihun et al. *Bacteria*. 2024. Vol. 3(3). P. 118–135. <https://doi.org/10.3390/bacteria3030008>.
308. Multidrug Adaptive Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Swarming Cells / S. R. Coleman et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020. Vol. 64(3). P. e01999-19. <https://doi.org/10.1128/aac.01999-19>.
309. Rütschlin S., Böttcher T. Inhibitors of Bacterial Swarming Behavior. *Chemistry-A European Journal*. 2020. Vol. 26(5). P. 964–979. <https://doi.org/10.1002/chem.201901961>.
310. Nakamura S., Minamino T. Flagella-Driven Motility of Bacteria. *Biomolecules*. 2019. Vol. 9(7). P. 279. <https://doi.org/10.3390/biom9070279>.
311. Wang S., Yang F., Yang B. Global effect of CsrA on gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Research in Microbiology*. 2017. Vol. 168(8). P. 700–709. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.08.003>.
312. GadE regulates *fliC* gene transcription and motility in *Escherichia coli* / W. R. Schwan et al. *World Journal of Clinical Infectious Diseases*. 2020. Vol. 10(1). P. 14–23. <https://doi.org/10.5495/wjcid.v10.i1.14>.

313. Regulation of Type 1 Fimbriae by Unlinked FimB- and FimE-Like Recombinases in Uropathogenic *Escherichia coli* Strain CFT073 / A. Bryan et al. *Infection and Immunity*. 2006. Vol. 74(2). P. 1072–1083. <https://doi.org/10.1128/iai.74.2.1072-1083.2006>.
314. Blomfield I. C. The regulation of *pap* and type 1 fimbriation in *Escherichia coli*. *Advances in Microbial Physiology*. 2001. Vol. 45. P. 1–49. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(01\)45001-6](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(01)45001-6).
315. Vitexin alters *Staphylococcus aureus* surface hydrophobicity to obstruct biofilm formation / M. C. Das et al. *Microbiological Research*. 2022. Vol. 263. P. 127126. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127126>.
316. Kim Y.-G., Lee J.-H., Lee J. Antibiofilm activities of fatty acids including myristoleic acid against *Cutibacterium acnes* via reduced cell hydrophobicity. *Phytomedicine*. 2021. Vol. 91. P. 153710. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153710>.
317. Alotaibi G. F. Factors Influencing Bacterial Biofilm Formation and Development. *American Journal of Biomedical Science & Research*. 2021. Vol. 12(6). P. 617–626. <https://doi.org/10.34297/ajbsr.2021.12.001820>.
318. Abdelghafar A., Yousef N., Askoura M. Zinc oxide nanoparticles reduce biofilm formation, synergize antibiotics action and attenuate *Staphylococcus aureus* virulence in host; an important message to clinicians. *BMC Microbiology*. 2022. Vol. 22(1). P. 244. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02658-z>.
319. Tryptophan interferes with the quorum sensing and cell surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus*: a promising approach to inhibit the biofilm development / P. Paul et al. *3 Biotech*. 2021. Vol. 11(8). P. 376. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02924-3>.

320. Mu Y., Zeng H., Chen W. Quercetin inhibits biofilm formation by decreasing the production of EPS and altering the composition of EPS in *Staphylococcus epidermidis*. *Frontiers in Microbiology*. 2021. Vol. 12. P. 631058. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.631058>.
321. Piperine Exhibits Potential Antibiofilm Activity Against *Pseudomonas aeruginosa* by Accumulating Reactive Oxygen Species, Affecting Cell Surface Hydrophobicity and Quorum Sensing / S. Das et al. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2023. Vol. 195. P. 3229–3256. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04280-1>.
322. Antimicrobial and antibiofilm effects of total flavonoids from *Potentilla kleiniana* Wight et Arn on *Pseudomonas aeruginosa* and its potential application to stainless steel surfaces / J. Tao et al. *LWT*. 2021. Vol. 154. P. 112631. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112631>.
323. The biofilm matrix: multitasking in a shared space / H.-C. Flemming et al. *Nature Reviews Microbiology*. 2023. Vol. 21(2). P. 70–86. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00791-0>.
324. Recent nanotechnologies to overcome the bacterial biofilm matrix barriers / X. Lv et al. *Small*. 2022. Vol. 19(6). P. 2206220. <https://doi.org/10.1002/smll.202206220>.
325. Das S. Genetic regulation, biosynthesis and applications of extracellular polysaccharides of the biofilm matrix of bacteria. *Carbohydrate polymers*. 2022. Vol. 291. P. 119536. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119536>.
326. Bacterial exo-polysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments / S. Singh et al. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2021. Vol. 19(1). P. 140. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00242-y>.

327. Enhanced biofilm disruption in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using rifampin and fluoroquinolone combinations / Y. R. Kang et al. *Pathogens*. 2025. Vol. 14(5). P. 404. <https://doi.org/10.3390/pathogens14050404>.
328. Di Bonaventura, G., Pompilio, A. *In vitro* antimicrobial susceptibility testing of biofilm-growing bacteria: current and emerging methods. *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health*. 2022. Vol. 1369. P. 33–51. https://doi.org/10.1007/5584_2021_641.
329. Comparative *in vitro* study of biofilm formation and antimicrobial susceptibility in gram-negative bacilli isolated from prosthetic joint infections / A. Macias-Valcayo et al. *Microbiology Spectrum*. 2022. Vol. 10(4). P. e00851-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00851-22>.
330. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix / K. M. Colvin et al. *Environmental Microbiology*. 2012. Vol. 14(8). P. 1913–1928. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x>
331. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl / M. J. Franklin et al. *Frontiers in Microbiology*. 2011. Vol. 2. P. 167. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00167>.
332. Glycoside hydrolase processing of the Pel polysaccharide alters biofilm biomechanics and *Pseudomonas aeruginosa* virulence / E. Razvi et al. *npj Biofilms and Microbiomes*. 2023. Vol. 9(1). P. 7. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00375-7>.
333. *Pseudomonas aeruginosa* Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization / M. Mishra et al. *Cellular Microbiology*. 2011. Vol. 14(1). P. 95–106. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01704.x>.

334. Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production / V. Urtuvia et al. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017. Vol. 33(11). P. 198. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2363-x>.
335. Okkotsu Y., Little A. S., Schurr M. J. The *Pseudomonas aeruginosa* AlgZR two-component system coordinates multiple phenotypes. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2014. Vol. 4. P. 82. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00082>.
336. Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. / D. W. Martin et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993. Vol. 90(18). P. 8377–8381. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8377>.
337. Saha P., Mukherjee S. K., Hossain S. T. Unveiling the role of *srbA* sRNA in biofilm formation by regulating *algU*, *mucA*, *rhlA*, and *rsmA* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Journal*. 2025. Vol. 482(11). P. 621–637. <https://doi.org/10.1042/bcj20240650>.
338. Regulation of ribonucleotide synthesis by the *Pseudomonas aeruginosa* two-component system AlgR in response to oxidative stress / A. Crespo et al. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7(1). P. 17892. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17917-7>.
339. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Exposed to Imipenem Exhibit Changes in Global Gene Expression and β -Lactamase and Alginate Production / N. Bagge et al. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004. Vol. 48(4). P. 1175–1187. <https://doi.org/10.1128/aac.48.4.1175-1187.2004>.
340. Stewart P. S. Antimicrobial Tolerance in Biofilms. *Microbiology Spectrum*. 2015. Vol. 3(3). 10.1128/microbiolspec.MB-0010-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0010-2014>.

341. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies / F. Sun et al. *Future Microbiology*. 2013. Vol. 8(7). P. 877–886.
<https://doi.org/10.2217/fmb.13.58>.
342. Penetrating the Bacterial Biofilm: Challenges for Antimicrobial Treatment / E. Teirlinck et al. *Functionalized Nanomaterials for the Management of Microbial Infection: A Strategy to Address Microbial Drug Resistance*, ed. by Rabah Boukherroub et al. Elsevier. 2017. pp. 49–76.
343. Cytochrome bd promotes *Escherichia coli* biofilm antibiotic tolerance by regulating accumulation of noxious chemicals / C. J. Beebout et al. *npj Biofilms and Microbiomes*. 2021. Vol. 7(1). P. 35.
<https://doi.org/10.1038/s41522-021-00210-x>.
344. Lee J., Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*. 2015. Vol. 6(1). P. 26–41.
<https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>.
345. Michalska M., Wolf P. *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Frontiers in Microbiology*. 2015. Vol. 6. P. 963.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00963>.
346. Universal antibiotic tolerance arising from antibiotic-triggered accumulation of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* / K. Zhu et al. *PLOS Biology*. 2019. Vol. 17(12). P. e3000573.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000573>.
347. Галкін М. Б., Іваниця В. О. Синтез піоціаніну *Pseudomonas aeruginosa* за впливу вісмутових металокомплексів порфіринів та аутоіндукторів системи quorum sensing. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2013. Т. 1. С. 29–36.
348. Horna G., Ruiz J. Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research*. 2021. Vol. 246. P. 126719.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126719>.

349. Poole K. Bacterial Multidrug Efflux Pumps Serve Other Functions. *Microbe Magazine*. 2008. Vol. 3(4). P. 179–185. <https://doi.org/10.1128/microbe.3.179.1>.
350. Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* / K. Poole et al. *Molecular Microbiology*. 1996. Vol. 21(4). P. 713–724. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.281397.x>.
351. Evans K., Adewoye L., Poole K. MexR Repressor of the *mexAB-oprM* Multidrug Efflux Operon of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of MexR Binding Sites in the *mexA-mexR* Intergenic Region. *Journal of Bacteriology*. 2001. Vol. 183(3). P. 807–812. <https://doi.org/10.1128/jb.183.3.807-812.2001>.

Додаток А

Хімічна назва та структурні формули похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Для дослідження механізму антибіоплівкової активності використано 2 адамантанвмісні сполуки серед похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу, які виявляють антимікробну активність щодо планктонних клітин бактерій та біоплівкок [125–127, 150, 151]:

- 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил) бензол (шифр АМ-166), отримана від ПАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод» (Україна);

- 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-(N-бензил, N-диметиламіно)-2-пропанолу хлорид (шифр KBM-97), сполука синтезована в Інституті органічної хімії НАН України канд. фарм. наук Ю. В. Коротким.

Загальна формула похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу представлена на рис. А.1.

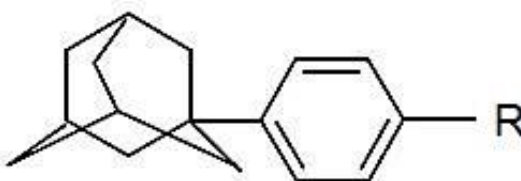


Рис. А.1 Загальна формула похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу

Примітки:

1. R = -CH₃-(CH₂)₂-CH-(NH₂) –АМ-166;
2. R = -O-CH-CH(OH)-CH₂-NMe₂- Bz + Cl⁻ – KBM-97.

Структурні формули досліджуваних сполук наведено на рис. А.2.

Продовж. дод. А

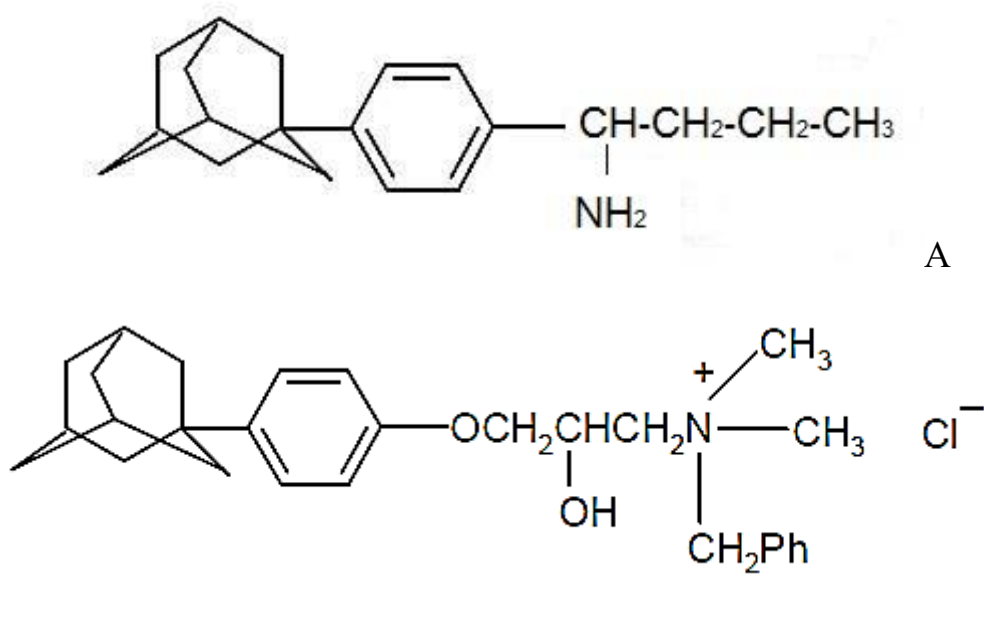


Рис. А.2 Структурні формули похідних 4-(1'-адамантил)-1R-бензолу:
А – АМ-166, Б – KBM-97

Додаток Б

Список публікацій здобувача

1. Антибактеріальна активність амінопропанолів з адамантильним і N-алкіларильним радикалом відносно біоплівки *E. coli* / Дудікова Д. М., Вринчану Н. О., Короткий Ю. В., Дронова М. Л., Суворова З. С., Шарова А. О., Гринчук Н. І., Недашківська В. В. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2017. № 6. С. 37–42. (Особистий внесок – брала участь у дослідженнях, обробці, узагальненні результатів та підготовці тексту статті до публікації).
2. Вплив 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензил, N-диметиламіно)-2-пропанол хлориду на компоненти матриксу біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* / Дудікова Д. М., Гринчук Н. І., Суворова З. С., Недашківська В. В., Вринчану Н. О. *The scientific heritage*. 2018. № 25. С. 3–9. (Особистий внесок – виконано частину експериментального блоку, проведено статистичну обробку та аналіз даних, підготовлено статтю до публікації).
3. Біоплівки. Сучасний стан та перспективи антимікробної терапії / Вринчану Н. О., Дудікова Д. М., Гринчук Н. І., Недашківська В. В. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2019. № 5. С. 311–321. <https://doi.org/10.33250.13.05.311>. (Особистий внесок – аналіз літературних джерел та підготовка тексту статті до публікації).
4. Antibiofilm effect of adamantane derivative against *Staphylococcus aureus* / Hrynchuk N. I., Vrynchanu N. O., Buchtyarova T. A., Dudikova D. M., Korotkyi Yu. V., Bondarenko L. B. *Mikrobiolohichniy Zhurnal*. 2021. Vol. 83, № 1. P. 58–67. <https://doi.org/10.15407/microbiolj83.01.058> (Scopus, Q4). (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, проведення експериментів, аналіз результатів та підготовка тексту статті до публікації).

Продовж. дод. Б

5. Гринчук Н. І., Бойко І. О., Вринчану Н. О. Антибіоплівкова дія ципрофлоксацину щодо *Pseudomonas aeruginosa*. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. Т. 15, № 2. С. 82–91. <https://doi.org/10.33250/15.02.082>. (Особистий внесок – брала участь у дослідженнях, аналізі та обговоренні результатів, підготовці тексту статті до публікації).

6. Anti-adhesion properties of 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl) benzole against *Escherichia coli* / Hrynychuk N., Bukhtiarova T., Vrynchanu N., Ishchenko L., Vazhnichay E. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2021. Т. 15, № 6. С. 380–393. <https://doi.org/10.33250/15.06.380>. (Особистий внесок – брала участь у аналізі літературних джерел, проведенні досліджень, аналізі та обговоренні результатів, підготовці тексту статті до публікації).

7. Antibiofilm activity of 4-(adamantyl-1) -1- (1-aminobutyl) benzol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Hrynychuk N., Zelena L., Bukhtiarova T., Vrynchanu N, Ishchenko L., Vazhnichaya E. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*. 2022. Vol. 84, № 3. С. 39–50. <https://doi.org/10.15407/microbiolj84.03.039> (Scopus, Q4). (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, проведення досліджень, аналіз результатів та підготовка тексту статті до публікації).

8. Гуменюк Н. І., Вринчану Н. О., Іщенко Л. М. Вплив похідного адамантану на експресію генів плівкоутворення *P. aeruginosa*. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2023. Т. 17, № 1. С. 44–52. <https://doi.org/10.33250/17.01.044>. (Особистий внесок – брала участь у проведенні досліджень, аналізі результатів, підготовці тексту статті до публікації).

Продовж. дод. Б

9. Антивірулентні властивості похідного адамантану 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил) бензолу щодо *Pseudomonas aeruginosa* / Гуменюк Н. І., Вринчану Н. О., Зелена Л. Б., Іщенко Л. М., Бухтіарова Т. А., Бойко І. О. *Innovative Biosystems and Bioengineering*. 2023. Vol. 7, № 3. Р. 44–54. <https://doi.org/10.20535/ibb.2023.7.3.282006> (Scopus, Q4). (Особистий внесок – брала участь у аналізі літературних джерел, проведенні експериментів, аналізі та обговоренні результатів, підготовці тексту статті до публікації).

10. Effect of adamantane derivative on expression of biofilm-associated genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Humeniuk N., Zelena L., Vrynchanu N., Ishchenko L., Bukhtiarova T., Korotkij Y., Vazhnichaya E. *Medicine in Drug Discovery*. 2023. Vol. 18. P. 100155. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2023.100155> (Scopus, Q2). (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, проведення досліджень, аналіз та обговорення результатів, підготовка тексту статті до публікації).

11. Гуменюк Н. Антиадгезивні властивості 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил)бензолу щодо *Staphylococcus aureus*. *Innovative Biosystems and Bioengineering*. 2025. Vol. 9, № 2. Р. 21–28. <https://doi.org/10.20535/ibb.2025.9.2.313507> (Scopus, Q4). (Особистий внесок – аналіз літературних джерел, проведення досліджень, аналіз та обговорення результатів, підготовка тексту статті до публікації).

12. КПКВ-6561040 Похідне адамантану (ПА) 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензилдиметиламіно)-2-пропанолу хлорид для профілактики інфікування ран та формування біоплівки / Вринчану Н. О., Гринчук Н. І., Недашківська В. В., Бойко І. О. Інформаційний Бюлетень. Київ. 2021. Випуск 51. С. 162–163.

Продовж. дод. Б

13. Гринчук Н. І. Вплив азитроміцину на адгезивні властивості *Staphylococcus aureus*. Мат. Буковинського міжнар. медико-фармацевтичного конгресу студентів і молодих учених, ВІМСО – 2018, м. Чернівці, 4 – 6 квітня 2018 р. Чернівці, 2018. С. 408.

14. Dudikova D, Hrynychuk N, Vrynchanu N. Influence of KVM-97 on cell surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. 4th International conference of cell biology, Krakow, May 11–12, 2018. Krakow, Poland, 2018. P. 71.

15. Отримання клітин-персистерів *Pseudomonas aeruginosa* / Гринчук Н. І. Дудікова Д. М., Суворова З. С., Вринчану Н. О. Мат. Наукової конференції присвяченій 100-річчю кафедри мікробіології, вірусології та імунології «Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології», м. Київ, 5 листопада 2019 р. Київ, 2019. С. 44–45.

16. Вплив адамантанвмісної сполуки на патогенність *Pseudomonas aeruginosa* / Гринчук Н. І., Вринчану Н. О., Дудікова Д. М., Недашківська В. В. Матеріали IV Міжнар. наук. практ. конф. «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» у 2-х т., м. Харків, 12–13 березня 2020 р. Харків, НФаУ, 2020. – Т. 2. С. 199–201.

17. Гринчук Н. І., Вринчану Н. О., Дудікова Д. М. Формування персистерів *Escherichia coli* за дії сполуки з адамантильним радикалом. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в сучасній клінічній і лабораторній медицині: матеріали дистанційної наук.-практ. конф., м. Харків, 19 березня 2020 р. Х. : НФаУ, 2020. С. 27.

Продовж. дод. Б

18. Гринчук Н. І., Вринчану Н. О., Короткий Ю. В. Вплив адамантанвмісної сполуки на гемолітичну активність *Pseudomonas aeruginosa*. Науково-практична конференція «Другий національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 175-річчю з дня народження І. І. Мечникова», м. Харків, 16–17 вересня 2020 р. Харків, 2020. С. 35–37.

19. Detection of *mecA*, *ica*, *icaA*, *icaD* genes in clinical strain of *Staphylococcus aureus* using polymerase chain reaction / Hrynychuk N. I., Ishchenko L. M., Zelena L. B., Boiko I. O., Vrynchanu N. O. Міжнародний симпозіум зі зменшення біологічної загрози 2021 р. (IBTRS 2021), Віртуальний, 28 червня – 2 липня 2021 р. С. 18.

20. Influence of adamantane derivative KVM-97 on *cidA* gene expression in *Staphylococcus aureus* / Hrynychuk N., Boiko I., Vrynchanu N., Zelena L., Ishchenko L., Korotkyi Yu. “Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology”: materials of III Scientific and practical Conference of young researchers, Kyiv, November 09–11, 2021. Kyiv, Ukraine. 2021. P. 16.

21. Експресія генів *appB*, *appX* у *Escherichia coli* за дії похідного адамантану / Вринчану Н. О., Зелена Л. Б., Гуменюк Н. І. Бойко І. О., Короткий Ю. В. «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології (Пам'яті професора В.В. Дунаєва)»: збірка тез II науково-практичної конференції з міжнародною участю, м. Запоріжжя, 22 листопада 2022 р. Запоріжжя, 2022. С. 58–59.

22. Influence of adamantane derivative on the formation of *Pseudomonas aeruginosa* persisters / Humeniuk N., Boiko I., Nedashkivska V., Vrynchanu N., Vazhnichaya E., Korotkij Yu. “Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology”: materials of IV Scientific and practical Conference of young researchers, Kyiv, November 15–17, 2022. Kyiv, Ukraine. 2022. P. 10.

Продовж. дод. Б

23. Експресія ефлюкс-асоційованого гена *oprM Pseudomonas aeruginosa* за дії похідного адамантану / Гуменюк Н. І., Вринчану Н. О., Іщенко Л. М., Недашківська В. В., Короткий Ю. В. Матеріали III науково-практичної міжнародної дистанційної конференції «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині», м. Харків, 24 березня 2023 р. Харків, 2023. С. 77–78.

24. Вплив похідного адамантану на експресію генів токсиноутворення *P. aeruginosa* / Гуменюк Н. І., Зелена Л. Б., Вринчану Н. О., Недашківська В. В., Бойко І. О. Міжнародна науково-практична конференція «Продовольча та екологічна безпека в умовах війни та повоєнної відбудови: виклики для України і світу», м. Київ, 25 травня 2023 р. Київ. 2023. С. 58–60.

25. Вплив похідних амінопропанолу на експресію генів токсиноутворення *Pseudomonas aeruginosa* / Вринчану Н. О., Зелена Л. Б., Гуменюк Н. І., Короткий Ю. В. Міжнародна науково-практична конференція «Експериментальна та клінічна фармакологія», присвячена 100-річчю кафедри фармакології НФаУ, м. Харків, 23–24 жовтня 2024 р. Харків. 2024. С. 91–92.

Додаток В

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях:

1. Буковинський міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих учених, ВІМСО – 2018 (м. Чернівці, Україна, 4 – 6 квітня 2018 р., форма участі – публікація тез);
2. 4th International conference of cell biology (Krakow, Poland, May 11–12, 2018., форма участі – постерна доповідь);
3. Наукова конференція присвячена 100-річчю кафедри мікробіології, вірусології та імунології «Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології» (м. Київ, Україна, 5 листопада 2019 р., форма участі – публікація тез);
4. IV Міжнародна науково-практична конференція «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (м. Харків, Україна, 12 – 13 березня 2020 р., форма участі – публікація тез);
5. Дистанційна науково-практична конференція «Мікробіологія, вірусологія та імунологія в сучасній клінічній і лабораторній медицині» (м. Харків, Україна, 19 березня 2020 р., форма участі – публікація тез);
6. Науково-практична конференція «Другий національний форум імунологів, алергологів, мікробіологів та спеціалістів клінічної медицини, присвячений 175-річчю з дня народження І.І. Мечникова» (м. Харків, Україна, 16 – 17 вересня 2020 р., форма участі – усна доповідь);
7. Віртуальний Міжнародний симпозіум зі зменшення біологічної загрози 2021 р. (IBTRS 2021) (28 червня – 2 липня 2021 р., форма участі – публікація тез);

Продовж. дод. В

8. III Scientific and practical Conference of young researchers «Youth and modern problems of microbiology and virology» (м. Київ, Україна, 09 – 11 листопада 2021 р., форма участі – публікація тез);

9. II науково-практична конференція з міжнародною участю «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології (Пам'яті професора В.В. Дунаєва)» (м. Запоріжжя, Україна, 22 листопада 2022 р., форма участі – публікація тез);

10. IV Scientific and practical Conference of young researchers “Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology” (м. Київ, Україна, 15 – 17 листопада 2022 р., форма участі – публікація тез);

11. III науково-практична міжнародна дистанційна конференція «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині» (м. Харків, Україна, 24 березня 2023 р., форма участі – публікація тез);

12. Міжнародна науково-практична конференція «Продовольча та екологічна безпека в умовах війни та повоєнної відбудови: виклики для України і світу» (м. Київ, Україна, 25 травня 2023 р., форма участі – публікація тез);

13. Міжнародна науково-практична конференція «Експериментальна та клінічна фармакологія», присвячена 100-річчю кафедри фармакології НФаУ (м. Харків, Україна, 23–24 жовтня 2024 р., форма участі – усна доповідь).

Додаток Г

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Професор кафедри науково-педагогічної роботи
 фармацевтичного
 факультету
 професор Ч.М. Володимирова

2023 р. ✓

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
матеріалів наукових досліджень
у науково-педагогічний процес

1. Назва пропозиції для впровадження:

«Механізми антибіоплівкової дії похідних адамантану: експресія генів *Quorum Sensing* у мікроорганізмів за їх дії»

2. Установа-розробник, автор: ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», лабораторія фармакології протимікробних засобів відділу фармакології.

3. Джерело інформації: Фрагменти науково-дослідної роботи: «Особливості формування біоплівок *Pseudomonas aeruginosa* та *Quorum Sensing* регуляції за дії похідних адамантану» (№ держреєстрації 0121U109291).

- Hrynchuk N.I., Antibiofilm effect of adamantane derivative against *Staphylococcus aureus* / Hrynchuk N.I., Vrynchanu N.O., Bukhtiarova T.A., Dudikova D.M., Korotkyi Yu. V., Bondarenko L.B. // Мікробіологічний журнал. – 2021. – V. 83, № 1. – P. 58-67. doi.org/10.15407/microbiolj83.01.058

- Hrynchuk N. Antibiofilm activity of 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl) benzol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Hrynchuk N., Zelena L., Bukhtiarova T., Vrynchanu N., Ishchenko L., Vazhnichaya E. // Мікробіологічний журнал. – 2022. – V. 84, № 3. – P. 39-50. doi.org/10.15407/microbiolj84.03.039

- Hrynchuk N. Anti-adhesion properties of 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl) benzole against *Escherichia coli* / Hrynchuk N., Bukhtiarova T., Vrynchanu N., Ishchenko L., Vazhnichaya E. // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2021. – Т. 15, № 6. – С. 380-393/ https://doi.org/10.33250/15.06.380

- Humeniuk N. Effect of adamantane derivative on expression of biofilm-associated genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Humeniuk N.; Zelena L.; Vrynchanu N.; Ishchenko L.; Bukhtiarova T.; Korotkyi Yu., Vazhnichaya E. // Medicine in Drug Discovery». – 2023. V.18. 100155. doi.org/10.1016/j.medidd.2023.100155

Продовж. дод. Г

- Гуменюк Н.І., Вринчану Н.О., Іщенко Л.М. Вплив похідного адамантану на експресію генів плівкоутворення *P. aeruginosa* / Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2023. – Т.17, № 1. /doi.org/10.33250/17.01.044

- Гуменюк Н.І. Антивірулентні властивості похідного адамантану 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил) бензолу щодо *Pseudomonas aeruginosa* / Гуменюк Н.І., Вринчану Н.О., Зелена Л.Б., Іщенко Л.М., Бухтіарова Т.А., Бойко І.О. // Innovative Biosystems and Bioengineering. – 2023. – V. 7, № 3. – С. 44–54. doi.org/10.20535/ibb.2023.7.3.282006

4. **Де і коли впроваджено:** На кафедрі фармакології та фармакотерапії Національного фармацевтичного університету в лекційному курсі та при проведенні практичних занять з фармакології протимікробних, противірусних, протипаразитарних, протигрибкових лікарських засобів.

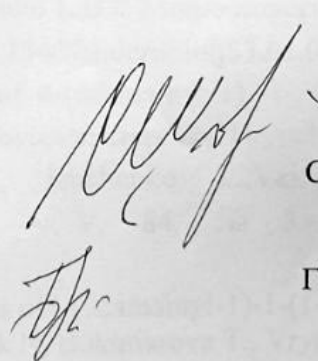
5. **Результати застосування:** Комісія під головуванням завідувача кафедри фармакології та фармакотерапії підтверджує, що надані дані щодо впливу похідних адамантану на формування біоплівки, механізмів реалізації антибіоплівкової дії, зокрема, експресії генів систем *Quorum Sensing* у бактерій за їх дії, використовуються в лекційному курсі та на практичних заняттях з фармакології протимікробних, противірусних, протипаразитарних, протигрибкових лікарських засобів, що сприяє поліпшенню професійної підготовки здобувачів вищої освіти.

6. **Зауваження та пропозиції:** не внесено

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри, протокол № 5 від 7 листопада 2023 р.

Завідувач кафедри фармакології
та фармакотерапії
д. мед. н., професор

Відповідальний за впровадження
канд. фарм. н., доцент



С.Ю. Штриголь

Г.В. Белік

Продовж. дод. Г

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Тернопільського національного медичного
університету імені І. Я. Горбачевського
проф. А. Г. ПУЛЬГАЙ



2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ
матеріалів наукових досліджень
в освітній процес

1. Назва пропозиції для впровадження:

«Механізми антибіоплівкової дії похідних адамантану: експресія генів *Quorum Sensing* у мікроорганізмів за їх дії»

2. Установа-розробник, автор: ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», лабораторія фармакології протимікробних засобів відділу фармакології.

3. Джерело інформації: Фрагменти науково-дослідної роботи: «Особливості формування біоплівок *Pseudomonas aeruginosa* та *Quorum Sensing* регуляції за дії похідних адамантану» (№ держреєстрації 0121U109291).

- Hrynchuk N.I., Antibiofilm effect of adamantane derivative against *Staphylococcus aureus* /Hrynchuk N.I., Vrynchanu N.O., Bukhtiarova T.A., Dudikova D.M. Korotkyi Yu. V.Bondarenko L.B.// Мікробіологічний журнал. – 2021. – V. 83, № 1.– P. 58-67. doi.org/10.15407/microbiolj83.01.058

- Hrynchuk N. Antibiofilm activity of 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl) benzol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Hrynchuk N., Zelena L., Bukhtiarova T., Vrynchanu N., Ishchenko L., Vazhnichaya E.// Мікробіологічний журнал. – 2022. – V. 84, № 3.– P. 39-50. doi.org/10.15407/microbiolj84.03.039

- Hrynchuk N. Anti-adhesion properties of 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl) benzole against *Escherichia coli* / Hrynchuk N., Bukhtiarova T., Vrynchanu N., Ishchenko L., Vazhnichaya E. // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2021. – Т. 15, № 6. – С. 380-393/ https://doi.org/10.33250/15.06.380

- Humeniuk N. Effect of adamantane derivative on expression of biofilm-associated genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/ Humeniuk N.; Zelena L.; Vrynchanu N.; Ishchenko L.; Bukhtiarova T.; Korotkyi Yu., Vazhnichaya E. //Medicine in Drug Discovery». – 2023. V.18. 100155. doi.org/10.1016/j.medidd.2023.100155

Продовж. дод. Г

- Гуменюк Н.І., Вринчану Н.О., Іщенко Л.М. Вплив похідного адамантану на експресію генів плівкоутворення *P. aeruginosa* / Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2023. – Т.17, № 1. /doi.org/10.33250/17.01.044

- Гуменюк Н.І. Антивірулентні властивості похідного адамантану 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил) бензолу щодо *Pseudomonas aeruginosa* / Гуменюк Н.І., Вринчану Н.О., Зелена Л.Б., Іщенко Л.М., Бухтіарова Т.А., Бойко І.О. // Innovative Biosystems and Bioengineering. – 2023. – V. 7, № 3. – С. 44–54. doi.org/10.20535/ibb.2023.7.3.282006

4. **Де і коли впроваджено:** В освітній процес на кафедрі фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського у лекційному курсі та при проведенні практичних занять за темою «Фармакологія антибіотиків».

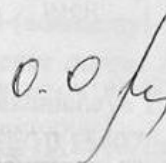
5. **Результати застосування:** Комісія під головуванням завідувача кафедри фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського підтверджує, що надані дані щодо впливу похідних адамантану на формування біоплівки, механізмів реалізації антибіоплівкової дії, зокрема, експресії генів систем *Quorum Sensing* у бактерій за їх дії, використовуються у лекційному курсі та на практичних заняттях за темою «Фармакологія антибіотиків».

6. **Зауваження та пропозиції:** не внесено

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології з клінічною фармакологією, протокол № 12 від 31.10 2023 р.

Відповідальний за впровадження: _____

Завідувач кафедри фармакології з
клінічною фармакологією
д. мед. н., професор



О.М. Олещук

Продовж. дод. Г

“ЗАТВЕРДЖУЮ”Проректор з науково-педагогічної роботи
Дніпровського державного медичного
університету

Сергій ЗАХАРОВ

2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**матеріалів наукових досліджень в навчальний процес****1. Назва пропозиції для впровадження:**«Механізми антибіоплівкової дії похідних адамантану: експресія генів *Quorum Sensing* у мікроорганізмів за їх дії»**2. Установа-розробник, автор:** ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», лабораторія фармакології протимікробних засобів відділу фармакології.**3. Джерела інформації:** Фрагменти науково-дослідної роботи: «Особливості формування біоплівок *Pseudomonas aeruginosa* та *Quorum Sensing* регуляції за дії похідних адамантану» (№ держреєстрації 0121U109291).- Hrynychuk N.I., Antibiofilm effect of adamantane derivative against *Staphylococcus aureus* /Hrynychuk N.I., Vrynchanu N.O., Bukhtiarova T.A., Dudikova D.M. Korotkyi Yu. V.Bondarenko L.B.// Мікробіологічний журнал. – 2021. – V. 83, № 1.– P. 58-67. doi.org/10.15407/microbiolj83.01.058- Hrynychuk N. Antibiofilm activity of 4-(adamantyl-1) -1- (1-aminobutyl) benzol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Hrynychuk N., Zelena L., Bukhtiarova T., Vrynchanu N., Ishchenko L., Vazhnichaya E.// Мікробіологічний журнал. – 2022. – V. 84, № 3.– P. 39-50. doi.org/10.15407/microbiolj84.03.039- Hrynychuk N. Anti-adhesion properties of 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl) benzole against *Escherichia coli* / Hrynychuk N., Bukhtiarova T., Vrynchanu N., Ishchenko L., Vazhnichay E. // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2021. – Т.15, № 6. – С. 380-393/ <https://doi.org/10.33250/15.06.380>- Humeniuk N. Effect of adamantane derivative on expression of biofilm-associated genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/ Humeniuk N.; Zelena L.; Vrynchanu N.; Ishchenko L.; Bukhtiarova T.; Korotkyi Yu., Vazhnichaya E. //Medicine in Drug Discovery». – 2023. V.18. 100155. doi.org/10.1016/j.medidd.2023.100155- Гуменюк Н.І., Вринчану Н.О., Іщенко Л.М. Вплив похідного адамантану на експресію генів плівкоутворення *P. aeruginosa* /Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2023. – Т.17, № 1. /doi.org/10.33250/17.01.044- Гуменюк Н.І. Антивірулентні властивості похідного адамантану 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил) бензолу щодо *Pseudomonas aeruginosa*/ Гуменюк Н.І., Вринчану Н.О., Зелена Л.Б., Іщенко Л.М., Бухтіарова Т.А.,

Продовж. дод. Г

Бойко І.О. //Innovative Biosystems and Bioengineering. – 2023. – V. 7, № 3.– С. 44–54. doi.org/10.20535/ibb.2023.7.3.282006

4. **Де і коли впроваджено:** кафедра фармакології Дніпровського державного медичного університету в лекційному курсі та при проведенні практичних занять змістового модулю: «Фармакологія хіміотерапевтичних лікарських засобів».

5. **Результат впровадження:** надані дані щодо впливу похідних адамантану на формування біоплівки, механізмів реалізації антибіоплівкової дії, зокрема, експресії генів систем *Quorum Sensing* у бактерій за їх дії, дозволять розширити і поглибити наукові знання в лекційному курсі та на практичних заняттях змістового модулю: «Фармакологія хіміотерапевтичних лікарських засобів».

6. **Зауваження та пропозиції:** не має.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології, протокол №4 від 10.11.2023 р.

Відповідальний за впровадження:

Професор кафедри фармакології
д.мед.н., професор

Володимир ЖИЛЮК



Продовж. дод. Г

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи та інновацій
 Національного медичного університету
 імені О.О. Богомольця
 професор

С.В. Земсков

2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів наукових досліджень в науково-педагогічний процес

1. Назва пропозиції для впровадження:

«Механізми антибіоплівкової дії похідних адамантану: експресія генів *Quorum Sensing* у мікроорганізмів за їх дії»

2. Установа-розробник, автор: ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», лабораторія фармакології протимікробних засобів відділу фармакології.

3. Джерело інформації: Фрагменти науково-дослідної роботи: «Особливості формування біоплівок *Pseudomonas aeruginosa* та *Quorum Sensing* регуляції за дії похідних адамантану» (№ держреєстрації 0121U109291).

- Hrynychuk N.I., Antibiofilm effect of adamantane derivative against *Staphylococcus aureus* /Hrynychuk N.I., Vrynchanu N.O., Bukhtiarova T.A., Dudikova D.M. Korotkyi Yu. V.Bondarenko L.B.// Мікробіологічний журнал. – 2021. – V. 83, № 1.– P. 58-67. doi.org/10.15407/microbiolj83.01.058

- Hrynychuk N. Antibiofilm activity of 4-(adamantyl-1) -1- (1-aminobutyl) benzol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Hrynychuk N., Zelena L., Bukhtiarova T., Vrynchanu N., Ishchenko L., Vazhnichaya E.// Мікробіологічний журнал. – 2022. – V. 84, № 3.– P. 39-50. doi.org/10.15407/microbiolj84.03.039

- Hrynychuk N. Anti-adhesion properties of 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl) benzole against *Escherichia coli* / Hrynychuk N., Bukhtiarova T., Vrynchanu N., Ishchenko L., Vazhnichay E. // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2021. – Т.15, № 6. – С. 380-393/ https://doi.org/10.33250/15.06.380

- Humeniuk N. Effect of adamantane derivative on expression of biofilm-associated genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*/ Humeniuk N.; Zelena L.; Vrynchanu N.; Ishchenko L.; Bukhtiarova T.; Korotkyi Yu., Vazhnichaya E. //Medicine in Drug Discovery». – 2023. V.18. 100155. doi.org/10.1016/j.medidd.2023.100155

- Гуменюк Н.І., Вринчану Н.О., Іщенко Л.М. Вплив похідного адамантану на експресію генів плівкоутворення *P. aeruginosa* /Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2023. – Т.17, № 1. /doi.org/10.33250/17.01.044

- Гуменюк Н.І. Антивірулентні властивості похідного адамантану 4-(адамантил-1)-1-(1-амінобутил) бензолу щодо *Pseudomonas aeruginosa*/ Гуменюк Н.І., Вринчану Н.О., Зелена Л.Б., Іщенко Л.М., Бухтіарова Т.А.,

Продовж. дод. Г

Бойко І.О. //Innovative Biosystems and Bioengineering. – 2023. – V. 7, № 3.– С. 44–54. doi.org/10.20535/ibb.2023.7.3.282006

4. Базова установка, яка проводить впровадження: На кафедрі фармакології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця в лекційному курсі та при проведенні практичних занять за темами «Фармакологія протимікробних лікарських засобів», «Фармакологічні шляхи попередження резистентності до протимікробних лікарських засобів».

5. Форма впровадження: науково-педагогічний процес.

6. Результат впровадження: Комісія під головуванням завідувачки кафедри фармакології проф. Зайченко Г.В. підтверджує, що надані дані щодо впливу похідних адамантану на формування біоплівки, механізмів реалізації антибіоплівкової дії, зокрема, експресії генів систем *Quorum Sensing* у бактерій за їх дії, впроваджені в науковий та освітній процес кафедри, використовується в лекційному курсі, на практичних заняттях зі студентами медичних, фармацевтичного і стоматологічного факультетів за темами «Фармакологія протимікробних лікарських засобів», «Фармакологічні шляхи попередження резистентності до протимікробних лікарських засобів».

7. Ефективність впровадження: Результати наукових досліджень впроваджені в науково-методичну роботу кафедри фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Використання розробки показало, що ефективність впровадження відповідає критеріям, які наведені у джерелах інформації.

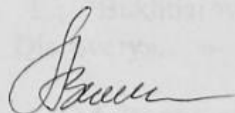
8. Термін впровадження: 2023/2024 навчальний рік.

9. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри, протокол № 13, від 20 листопада 2023 р.

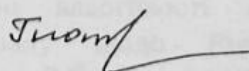
Відповідальний за впровадження: доц. Гнатюк В.В.

Завідувачка кафедри фармакології
НМУ імені О.О. Богомольця
д. мед. н., професор



Зайченко Г. В.

Доцент кафедри фармакології
НМУ імені О.О. Богомольця
д.мед.н, доцент



Гнатюк В.В.

Продовж. дод. Г

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної та
навчальної роботи Запорізького
державного медико-фармацевтичного
університету,
С.А.Моргунцова



» _____ 2023 р

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів наукових досліджень ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» в науково-педагогічний процес

1. Назва пропозиції для впровадження:

«Механізми антибіоплівкової дії похідних адамантану: експресія генів *Quorum Sensing* у мікроорганізмів за їх дії»

2. Установа-розробник, автор:

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», лабораторія фармакології протимікробних засобів відділу фармакології.

3. Джерело інформації:

Фрагменти науково-дослідної роботи: «Особливості формування біоплівок *Pseudomonas aeruginosa* та *Quorum Sensing* регуляції за дії похідних адамантану» (№ держреєстрації 0121U109291).

1.Hrynychuk N.I., Antibiofilm effect of adamantane derivative against *Staphylococcus aureus* /Hrynychuk N.I., Vrynchanu N.O., Bukhtiarova T.A., Dudikova D.M. Korotkyi Yu. V.Bondarenko L.B.// Мікробіологічний журнал. – 2021. – V. 83, № 1.– P. 58-67. doi.org/10.15407/microbiolj83.01.058

2.Hrynychuk N. Antibiofilm activity of 4-(adamantyl-1) -1- (1-aminobutyl) benzol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Hrynychuk N.,Zelena L.,Bukhtiarova T,Vrynchanu N,Ishchenko L,Vazhnichaya E.// Мікробіологічний журнал. – 2022. – V. 84, № 3.– P. 39-50. doi.org/10.15407/microbiolj84.03.039

3.Hrynychuk N. Anti-adhesion properties of 4-(adamantyl-1)-1-(1-aminobutyl) benzole against *Escherichia coli* / Hrynychuk N, Bukhtiarova T., Vrynchanu N., Ishchenko L.,Vazhnichay E. // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2021. – Т.15, № 6. – С. 380-393/ <https://doi.org/10.33250/15.06.380>

4. **Де впроваджено:** кафедра фармакології та медичної рецептури з курсом нормальної фізіології Запорізького державного медико-фармацевтичного університету.

5. **Форма впровадження:** науково-педагогічний процес

Продовж. дод. Г

6.Результат впровадження: Використання результатів наукових досліджень лабораторії фармакології протимікробних засобів відділу фармакології ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» в учбовому процесі дозволяє розширити знання студентів про антимікробні, протівірусні, протитуберкульозні ЛЗ.

7.Зауваження та пропозиції: немає.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри, протокол № 4, від 10 11 2023 р.

Відповідальний за впровадження: _____

Завідувач кафедри
фармакології та медичної рецептури з
курсом нормальної фізіології
д. біол. н., професор

Бленічев І.Ф.

Додаток Д

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

**ІНФОРМАЦІЙНИЙ
БЮЛЕТЕНЬ**

Додаток до
«Журналу Національної академії
медичних наук України»
Випуск 51

Київ – 2021

Продовж. дод. Д

Отримані результати доповнюють дані щодо дії акутравми, акубаротравми на структури слухового аналізатора та її системну дію. Визначено найбільш інформативні показники в плані діагностики порушень у різних відділах слухового аналізатора та екстрауральних змін при акутравмі, отриманій в реальних бойових умовах. Отримані дані сприяють підвищенню якості діагностики та ефективності лікування акутравматичного ураження слухової системи.

Нововведення впроваджено в ДУ „Інститут отоларингології НАМН України”, Військово-медичного клінічного центру Південного регіону МО України, Національного Військово-медичного клінічного центру «ГВКГ» МО України, а також 61-ого мобільного військового госпіталю. Показана ефективність розробки в клінічній практиці.

Необхідне обладнання: необхідно клінічний аудіометр, бажано устаткування для об'єктивної оцінки стану різних відділів слухового аналізатору та екстрауральних змін.

Послуги розробників: курси інформації і стажування, семінари.

ДУ ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ

03057, м.Київ, вул. Антона Цедіка, 14; тел.: 044-456-42-56, факс 044-536-98-78

1. КПКВ - 6561040

Похідне адамантану (ПА) 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензилдиметиламіно)-2-пропанолу хлорид для профілактики інфікування ран та формування Біоплівок.

Автори-розробники: Вринчану Н.О., Гринчук Н.І., Недашківська В.В., Бойко І.О.

Контактний телефон: (044) 456-83-32.

Пропонується похідне адамантану 1-[4-(1-адамантил)фенокси]-3-(N-бензил-, N-диметиламіно)-2-пропанолу хлорид як антимікробний засіб із антиадгезивними властивостями, що впливає на неспецифічні та специфічні фактори адгезії. Сполука на моделі інфікованих ран попереджує адгезію мікроорганізмів до ранової поверхні, сприяє зниженню мікробної контамінації рани. Експериментами *in vitro* підтверджено здатність запропонованої сполуки знижувати адгезію бактерій до абіотичної поверхні (полістиролові планшети), порушувати *twitching*-міграцію *P. aeruginosa* та *E. Coli* та змінювати гідрофобність поверхні клітин *P. aeruginosa*. В експериментах *in vivo* доведена здатність ПА виявляти антимікробну дію, що реалізується зменшенням мікробного обсіменіння ранової поверхні.

Застосування нововведення дасть змогу створити антимікробний засіб з широким спектром дії для місцевого застосування з метою профілактики ранової інфекції та як засіб медичного призначення (обробка катетерів, сидотрахеальних трубок тощо) для запобігання плівкоутворення.

Продовж. дод. Д

Нововведення впроваджено в ДУ «Інститут фармакології та токсикології» НАМН України.

Впровадження нововведення потребує додаткових коштів в об'ємі, необхідному для проведення комплексу доклінічних та клінічних досліджень і реєстрації нового лікарського засобу.

Необхідне обладнання: стандартний набір обладнання для мікробіологічної лабораторії, стандартне біологічне обладнання, необхідне для проведення медико-біологічних випробувань; віварій з тваринами, сертифікований за стандартами GLP.

Послуги розробників: методична допомога, консультації та стажування.

2. КПКВ - 6561040

Комплексна методологія пошуку потенційного лікарського засобу з анальгетичною та протизапальною активністю серед оригінальних похідних тетрагідроазепіну (ПТА).

Автори-розробки: Демченко А.М., Серединська Н.М., Бобкова Л.С., Демченко С.А., Ядловський О. Є., Середенко О.В., Бухтіарова Т.А.

Контактний телефон: (044) 456-94-18

Пропонується комплексна методологія оптимізації пошуку інноваційного неболеючого та протизапального засобу на основі поєднання сучасних *in silico* досліджень з класичним раціональним дизайном, синтезом та фармакологічним скринінгом. Із застосуванням методів раціонального дизайну здійснено структурну модифікацію та синтез ПТА, що реалізується введенням до базової структури бензенсульфонамідного фрагменту, характерного для селективного гібітора ЦОГ-2 Целекоксибу. Методом молекулярного докінгу *in silico* встановлена аналогічна Целекоксибу спорідненість ПТА до ЦОГ-2. За відсутності ільного сайту зв'язування з Диклофенаком у ЦОГ-1. Це дозволяє прогнозувати гтсву антиноцицептивну активність у сполук зазначеного хімічного ряду, канізм який може бути опосередкований через взаємодію з ЦОГ-2.

У двох незалежних моделях *in vivo* (хімічна ноцицептивна стимуляція – терального болю та карагенин-індуковане запалення) на різних видах ораторних тварин виявили вірогідний антиноцицептивний ефект, іставимий з активністю Кеторолака та дещо нижчий за активність екоксибу. Свідченням антиноцицептивної активності ПТА є зменшення «чоловчів» та підвищення порогу больової чутливості (ПБЧ) у дослідних тварин з індукції болю карагенином. На моделях ексудативного та карагенин-індукованого запалення на різних видах лабораторних тварин досліджено изапальний ефект ПТА, рівень якого співставлений з рівнем диклофенаку та перевищує такий Целекоксиба (зменшення набряку та температури). Застосування нововведення сприятиме цілеспрямованій пошуку оригінального лікарського засобу серед нових оригінальних речовин з ефектом зменшення болю та запалення.