**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ**

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА**

**«ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ»**

**ДУДІКОВА ДАР′Я МАРАТІВНА**

УДК 547.435.4: 615.281.9: 615.282.84:615.015

**Антимікробні властивості четвертинних солей
1-[4-(1-АДАМАНТИЛ)-ФЕНОКСИ]-3-ДІАЛКІЛАМІНО-2-ПРОПАНОЛУ**

14.03.05 – фармакологія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня

 кандидата біологічних наук

**КИЇВ -2018**

Дисертацією є рукопис.

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

**Науковий керівник**: доктор медичних наук

 **ВРИНЧАНУ Ніна Олексіївна**,

 ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»,

 завідувач лабораторії фармакології протимікробних засобів

 відділу фармакології

**Офіційні опоненти:**  доктор медичних наук, професор

**ШТРИГОЛЬ Сергій Юрійович,**

Національний фармацевтичний університет МОЗ України,

завідувач кафедри фармакології

кандидат біологічних наук, доцент

**ДОМБРОВСЬКА Ірина Володимирівна,**

Київський національний університет

імені Тараса Шевченка,

ННЦ «Інститут біології та медицини»,

доцент кафедри мікробіології та імунології

Захист відбудеться "12" грудня 2018 року об 11 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01 при ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» за адресою: 03057, м. Київ, вул.  Антона Цедіка , 14.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (03057, м. Київ, вул. Антона Цедіка , 14).

Автореферат розісланий " \_\_" \_\_\_\_\_\_\_\_ 2018 року.

Учений секретар

спеціалізованої вченої ради,

кандидат біологічних наук І.В. Данова

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність теми**. Одним із величних досягнень XX століття є впровадження у клінічну практику антибіотиків. Завдяки застосуванню антимікробних препаратів (АМП) було врятовано мільйони людських життів, отримано можливість використовувати сучасні медичні технології, здійснювати оперативні втручання, запобігати виникненню ускладнень тощо. Але формування у мікроорганізмів резистентності до дії АМП та розповсюдження стійких штамів призвело до зниження ефективності антимікробної терапії, що є не тільки серйозною медичною проблемою, але й має значні соціальні та економічні наслідки. Щорічно у світі від хвороб, обумовлених антибіотикорезистентними мікроорганізмами, помирають 700 000 осіб, у США та країнах Європейського союзу (ЄС) реєструють близько 23 тис. та 25 тис. летальних випадків відповідно (Review on Antimicrobial Resistance, 2016). За даними ВООЗ (WHO, 2018) резистентні мікроорганізми зумовили у 2017 році гнійно-запальні процеси у 500 000 осіб, а до 2050 року ця кількість може збільшитись до 10 млн (Review on Antimicrobial Resistance, 2016). Підрахунок вартості лікування пацієнтів з гнійно-запальними процесами, зумовленими антибіотикорезистентними збудниками, показав, що щорічні витрати у країнах ЄС сягають до 7 млрд. євро, у США − до 6,5 млрд. доларів США (А. А. Салманов, А. В. Руденко, 2017; FAO, 2017; K. E. Thorpe, 2018).

Формування резистентності мікроорганізмів до дії АМП потребує термінового прийняття заходів щодо запобігання розповсюдження резистентних штамів та розробки шляхів підвищення ефективності антибіотикотерапії. Усвідомлення наслідків антибіотикорезистентності знайшло відображення у прийнятому ВООЗ документі «Глобальний план дій щодо стримування стійкості до антимікробних препаратів» (WHO, 2015 р.), у якому зазначено конкретні задачі, серед яких – удосконалення мір щодо координації та епіднагляду, розробка більш ефективних методів контролю, стимулювання фармкомпаній для розробки нових АМП, вакцин, діагностичних систем тощо.

Одним із шляхів боротьби з антибіотикорезистентністю є пошук сполук з виразним інгібувальним ефектом і розробка на їх основі ефективних АМП. На особливу увагу заслуговують сполуки нових хімічних класів, які раніше самостійно або як складові АМП не використовувались, сполуки з новим механізмом дії та здатністю впливати на декілька мішеней в клітині мікроорганізмів. Починаючи з 2000 року до застосування рекомендовано більше 20 нових АМП, серед них тільки 5  є принципово новими (W. Qin, 2014; C. L. Ventola, 2015; WHO, 2017).

Перспективним класом для розробки нових АМП є адамантанвмісні сполуки (B. A. Orzeszko, 2004; В. А. Ермохин, 2007; Н. О. Вринчану, 2010; A. A. El-Emam, 2012; В. М. Одинцова, 2016; L. H. Al-Wahaibi, 2017), зокрема, четвертинні солі
1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу завдяки широкому спектру активності (Г. І. Степанюк, 2016; O. M. Voloshchuk, 2017). У дисертаційній роботі відображено результати поглиблених досліджень цих сполук щодо токсичності, антимікробної активності, ефективності при гнійно-запальних процесах, механізму дії, що дає можливість оцінити їх перспективність для подальшого цілеспрямованого синтезу та доцільність створення на їх основі нових ефективних та безпечних АМП.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота є фрагментом планових науково-дослідних робіт лабораторії фармакології протимікробних засобів ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» «Дослідження механізму антимікробної дії похідних аміноадамантану» (№ державної реєстрації 0109U002115) та «Дослідження впливу аміноспиртів з адамантильним або N-алкіларильним радикалом на процеси плівкоутворення монокультур бактерій, грибів та мікробних асоціацій» (№ державної реєстрації 0115U002442).

**Мета і завдання дослідження.** Мета дослідження –на підставі дослідження антибактеріальної та антифунгальної активності, встановлення широти спектра та механізму дії оцінити перспективність четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу для створення нових антимікробних препаратів.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. У скринінгових дослідженнях визначити антибактеріальну та антифунгальну активність 19 вперше синтезованих сполук, виявити серед них найбільш активні та проаналізувати залежність антимікробної дії від хімічної структури четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу.
2. Визначити гостру токсичність та місцевоподразнювальну дію найбільш активних сполук.
3. В експериментах *in vitro* вивчити антимікробні властивості найбільш активних сполук (чутливість планктонних мікроорганізмів, біоплівок, наявність постантибіотичного ефекту, можливість утворення резистентних штамів, залежність активності від рН середовища та щільності інокуляту).
4. У дослідах *in vivo* оцінити ефективність найбільш активних сполук при генералізованому та місцевому гнійно-запальному процесі, на катетерній моделі − їх антибіоплівкові властивості.
5. Визначити зміни в ультраструктурі клітин бактерій та грибів за умови дії четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу.
6. Дослідити вплив найбільш активних сполук на клітинну оболонку бактерій та грибів (проникність цитоплазматичної мембрани, вміст стеринів та полісахаридів, функціонування ефлюксних помп, чутливість протопластів).
7. Встановити зміни внутрішньоклітинних процесів у бактерій та грибів при дії четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу (за вмістом білка, загальним жирнокислотним складом та енергозабезпеченням клітин).

*Об’єкт дослідження –* інфекційно-запальні процеси бактеріального та мікотичного ґенезу.

*Предмет дослідження* −антибактеріальні та антифунгальні властивості вперше синтезованих четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу.

*Методи дослідження:* токсикологічні, мікробіологічні, фармакологічні, біохімічні, фізико-хімічні, електронно-мікроскопічні, статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше теоретично обґрунтовано та експериментально підтверджено доцільність пошуку серед четвертинних солей
1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу сполук з широким спектром антимікробної дії, а також з односпрямованим антибактеріальним ефектом. Вперше доведено доцільність пошуку сполук з антисиньогнійною активністю серед адамантанвмісних речовин та розробки на їх основі ефективних та безпечних лікарських засобів.

Поглиблені знання щодо фармакологічних властивостей сполук, що містять адамантильний радикал, четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу, зокрема досліджено закономірність «хімічна структура − антимікробна дія» та встановлено, що широкий спектр антимікробної дії сполукам забезпечує наявність у структурі 4-(1-адамантил)-фенільного радикала, антисиньогнійної активності − введення бензильного радикала до диметиламіну чи насичених 5-членного та 6-членного гетероциклів (піролідин та морфолін відповідно).

Розширено уявлення щодо токсикологічних властивостей адамантанвмісних сполук. Встановлено, що найбільш активні сполуки відносяться до малотоксичних (IV клас) та помірно небезпечних (III клас) речовин, залежно від шляху введення.

Встановлено, що найактивніша сполука 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензилдиметиламіно)-2-пропанол хлорид (шифр КВМ-97) *in vitro* виявляє широкий спектр антибактеріальної (грампозитивні та грамнегативні бактерії, у тому числі *P. aeruginosa*) та антифунгальної активності (дріжджоподібні та міцеліальні гриби), чинить інгібувальний вплив на мікоплазми та біоплівкові мікроорганізми. На моделі генералізованої інфекції, зумовленій синьогнійною паличкою, у лікувально-профілактичному режимі застосування сполука КВМ-97 сприяла виживанню 100 % (у дозі 0,01 ЛД50) та 30 % (у дозі 0,001 ЛД50) тварин при 100 % летальності у контролі. При місцевому гнійно-запальному процесі (кон’юнктивіт, спричинений *S. aureus*) застосування КВМ-97 супроводжувалось скороченням терміну перебігу запального процесу більш ніж у три рази (з 12 до 4 діб), сприяло зменшенню мікробної контамінації ока тварин (мікроорганізми виявляли лише на першу добу).

В експериментах на катетерній моделі встановлено, що сполука КВМ-97 порушує адгезію мікроорганізмів до поверхні катетера та плівкоутворення, що запобігатиме розвитку катетер-асоційованих інфекцій.

При визначенні широти спектра 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензил,
N-метил, N-циклогексил)-2-пропанол хлориду (ЮК-23) встановлено, що сполука виявляє виразну активність щодо грампозитивних бактерій, молікутів та грибів (міцеліальних та дріжджоподібних).

Відсутність резистентних колоній при дії сполук КВМ-97 та ЮК-23, що у
4–16 разів перевершує МІК відносно *P. aeruginisa* та *S. aureus* свідчить, що стійкість у мікроорганізмів до їх дії формуватись не буде або буде утворюватись повільно.

Вперше встановлені фармакодинамічні особливості четвертинних солей
1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу (порушення структурно-функціональної організації зовнішньої оболонки, збільшення проникності цитоплазматичної мембрани, лізис протопластів, пригнічення активності дихання) можуть свідчити, що механізм дії сполук КВМ-97 та ЮК-23 пов’язаний з їх мембранотропними властивостями.

Доповнено наукові дані про механізм антимікробної активності похідних адамантану, зокрема їх здатність пригнічувати активність ефлюксних помп та порушувати енергетичні процеси в клітинах бактерій та грибів.

**Практичне значення одержаних результатів.** Вперше експериментально обґрунтовано, що четвертинні солі 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу є перспективними сполуками для створення ефективних та безпечних антимікробних засобів (патент України на винахід № 113780 (2017 р.) та патент України на корисну модель № 126151 (2018 р.)). Впровадження в медичну практику нових антибактеріальних та антифунгальних засобів підвищить ефективність антимікробної хіміотерапії.

Встановлений механізм антибактеріальної та антифунгальної дії похідних четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу дасть можливість раціонально використовувати лікарські засоби, розроблені на їх основі (призначення в залежності від локалізації та тяжкості гнійно-запального процесу, застосування у складі комбінованої антимікробної терапії).

Експериментально обґрунтована доцільність розробки нових антимікробних препаратів на основі четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу підтверджується нововведенням «[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-(N-бензил, N-диметиламіно)-2-пропанолу хлориду з антимікробною активністю», рекомендованим до впровадження у практику охорони здоров’я (Інформаційний бюлетень НАМН України, вип. 43, 2017 р.). Окремі результати дисертаційної роботи впроваджено в науково-педагогічний процес кафедр фармакології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (протокол №14 від 24.05.2018 р.), Тернопільського державного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського (протокол №6 від 04.06.2018 р.), Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця (протокол №1 від 28.08.2018 р.), Харківського національного медичного університету (протокол №2 від 28.08.2018 р.), ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (протокол №2 від 19.09.2018 р.), Запорізького державного медичного університету (протокол №1 від 10.09.2018 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, що віддзеркалюють основні положення дисертації, та текст дисертації.

Вивчення впливу сполук на дихання бактерій та грибів проведено на базі Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України при методичній та консультативній допомозі к. б. н. В. І. Носар. На базі Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України були проведені електронно-мікроскопічні дослідження при методичній та консультативній допомозі к. б. н. С. І. Войчука, експерименти щодо впливу сполуки КВМ-97 на загальний жирнокислотний склад *E. coli* − при методичній та консультативній допомозі д. б. н., проф. Л. Д. Варбанець; чутливість мікоплазм визначена при методичній та консультативній допомозі к. б. н. К.С. Коробкової, за що автор роботи щиро їм вдячна.

У роботах, опублікованих у співавторстві, дисертанту належать фактичний матеріал й основний творчий доробок: результати власних досліджень, участь у аналізі та узагальненні отриманих даних, підготовка статей до друку.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертації доповідались на ХІІ Міжнародному медичному конгресі студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2009), Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2010» (Запоріжжя, 2010), 38-й Конференції молодих вчених та 62-й студентській науковій конференції Смоленської державної медичної академії (з міжнародною участю) (Смоленськ, 2010), ХІ Науковій конференції студентів та молодих вчених «Новини і перспективи медичної науки» (Дніпропетровськ, 2011), Ювілейній конференції з медичної мікології (до 100-річчя З.Г. Степанищевої) (Москва, 2013), 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (Барселона, 2014), ІІІ Міжнародній науково-практичній конференції «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології» (Київ, 2015), Міжнародній конференції „Smart Bio” (Каунас, 2017), 8th Trends in Medical Mycology (TIMM-8) (Белград, 2017).

**Публікації.** Матеріали дисертації опубліковано у 19 роботах, з них: 7 статей у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України, одна стаття у закордонному виданні, 9 тез доповідей у матеріалах конгресів та конференцій, у тому числі з міжнародною участю, 1 патент України на винахід та 1 патент України на корисну модель.

**Обсяг і структура дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи викладено на 257 сторінках друкованого тексту. Робота містить такі розділи: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали та методи дослідження, 4 розділи результатів власних досліджень, узагальнення результатів дослідження, висновки, список використаних джерел, який містить 255 джерел: 89 кирилицею й 166 латиницею, додатки. Дисертаційну роботу ілюстровано 35 рисунками та 43 таблицями.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

*Матеріали та методи дослідження*. В роботі досліджували 19 четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу (рис. 1). Сполуки синтезовані к. фарм. н. Ю. В. Коротким у Інституті органічної хімії НАН України.



Рис. 1. Загальна формула четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу

У дослідженні використано мікроорганізми: 28 еталонних та 5 клінічних тест-штамів бактерій та грибів. Еталонні штами мікроорганізмів отримані з ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України», ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечнікова НАМН України», Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Клінічні штами виділені від пацієнтів ДУ «Інститут урології НАМН України».

У дослідженнях *in vivo* було використано 150 білих нелінійних мишей та 15 кролів породи Шиншила обох статей, отриманих з віварію ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». Експерименти з використанням тварин проводили відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Дотримання біоетичних норм засвідчено висновком комісії з біоетики ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (протокол № 01/07/18 від 26.07.2018 р.). Загальну схему дослідження представлено на рис. 2.

Як препарати порівняння використовували ципрофлоксацин («Ципринол», «KRKA», Словенія), меропенем («Меронем», «Астра Зенека ЮК Лімітед», Великобританія), цефтазидим («Цефтум®», ПАТ «Київмедпрепарат», Україна), амфотерицин В («Амфотрет», Бхарат Сірамс енд Вакцинс Лімітед, Індія), ітраконазол («Ітракон», ПАТ «Фармак», Україна), тобраміцин («Тобрекс», «Алкон-Куврьор», Бельгія; «Бруламіцин», «Teva Pharmaceutical Industries Ltd», Ізраїль), цефтриаксон («Цефтріаксон», ПАТ «Київмедпрепарат», Україна), «Таванік» («Авентіс Фарма Дойчланд ГмбХ», Німеччина), сульфацил натрію («Сульфацил», ПАТ «Фармак», Україна), хлорпромазин («Аміназин», ПАТ «Галичфарм», Україна), фуразолідон («Фуразолідон», ПАТ «Монфарм», Україна) та субстанції гентаміцину, азитроміцину, клотримазолу та ністатину (ПАТ НВЦ «Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод», Україна), флуконазолу та мірамістину (ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна).

Чутливість тест-штамів мікроорганізмів до четвертинних солей
1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу проводили методом серійних розведень у рідких поживних середовищах (із визначенням МІК) згідно з міжнародними стандартами (МУК 4.2.1890-04, 2004; Eucast EDef 7.3, 2015; Eucast EDef 9.3, 2015; CLSI М100, 2017). Сполуки розчиняли у воді для ін’єкцій, підігрітій до 37 °С, або у 10,0 % розчині диметилсульфоксиду. Препарати порівняння розчиняли у відповідних розчинниках (CLSI М100, 2017).

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

Активність сполук та препаратів по відношенню до бактерій у стані біоплівки вивчали загальноприйнятими методами з використанням полістиролових планшетів та полівінілхлоридних катетерів (O`Tool, 1999).

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

Визначення здатності вперше синтезованих речовин запобігати утворенню резистентних штамів мікроорганізмів визначали в умовах зростаючих концентрацій (J. M. Blondeau, 2009).

*In vitro*

Терапевтична ефективність *in vivo*

Аналіз залежності «хімічна структура – антимікробна активність»

Скринінг антимікробної дії четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу

Поглиблені дослідження антимікробної дії найбільш активних сполук

Спектр антимікробної активності

Визначення типу дії на мікробну клітину

Залежність активності від рН середовища

Визначення постантибіотичного ефекту

Залежність активності від щільності інокуляту

Можливість формування резистентних штамів

Чутливість біоплівкових форм мікроорганізмів

На моделі генералізованого гнійно-запального процесу

На моделі місцевого гнійно-запального процесу

Дослідження механізму антимікробної дії

Ультраструктура мікроорганізмів

7

Вміст полісахаридів зовнішньої мембрани в клітинах *P. aeruginosa*

6

6

Вміст стеринів у клітинах *C. albicans*

Мембранотропна активність

Вивчення токсичності та безпечності

Чутливість протопластів

Проникність мембрани

Активність ефлюксних помп

Гостра токсичність

Місцевоподразнювальна дія

Вплив на внутрішньоклітинні процеси

Активність дихання

Вміст білка

Вміст жирних кислот у клітинах *E. coli*

Рис. 2 Загальна схема дослідження

Гостру токсичність досліджували на статевозрілих білих нелінійних мишах при внутрішньоочеревинному та внутрішньошлунковому введенні з визначенням ЛД50 та класу токсичності (В. Б. Прозоровский, 1998; О. В. Стефанов, 2001). Місцевоподразнювальну дію досліджували при нанесенні на слизову оболонку ока кролів за загальноприйнятою методикою (В. П. Фисенко, 2000).

Ефективність сполуки КВМ-97 досліджували в умовах *in vivo* на моделях генералізованої бактеріальної інфекції (*P. aeruginosa*) та кандидемії (*C. albicans*) у мишей, а також кон’юнктивіту у кролів (*S.aureus*) (Н. В. Лазарев, 1954; Д. С. Саркисов, 1960; Г. Н. Першин, 1971). Ефективність сполуки КВМ-97 при генералізованій інфекції вивчали у лікувально-профілактичному режимі (внутрішньоочеревинно одноразово, одночасно з інфікуванням) та оцінювали за виживаністю тварин (Г. Н. Першин, 1971). Дози складали 0,1 ЛД50 (22,5 мг/кг); 0,01 ЛД50 (2,25 мг/кг); 0,001 ЛД50 (0,225 мг/кг) (О. В. Стефанов, 2001). Терапевтичну ефективність при стафілококовому кон’юнктивіті вивчали при нанесенні 0,025 % розчину сполуки КВМ-97 п’ять разів на день (перша інстиляція – через 5 год після інфікування) і оцінювали за наявністю контамінації бактеріями та симптомами кон’юнктивіту з використанням бальної шкали (Н. В. Лазарев, 1954; Д. С. Саркисов, 1960; В. П. Фисенко, 2000).

Ультраструктуру бактерій за умови впливу найбільш активних сполук вивчали методом трансмісійної електронної мікроскопії (J. J. Bazzola, 2007).

Вплив сполуки КВМ-97 на кількість полісахаридів у клітинах *P. aeruginosa* визначали за M. Dubois (1956) та A. Chiba (2015), ергостерину – за O. N. Breivik (1957) у модифікації B. A. Arthington-Skaggs (1999).

Вплив четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу на бар’єрно-транспортні властивості оцінювали за зміною проникності цитоплазматичної мембрани (Ф. Герхардт и соавт., 1984), за впливом на протопласти бактерій та грибів (К. В. Яковенко, 1985; Ю. И. Горлов, 1978) та за функціонуванням ефлюксних помп (L. Paixao et al., 2009).

Вплив сполук на внутрішньоклітинні процеси оцінювали за вмістом у клітинах мікроорганізмів білка (O. H. Lowry et al., 1951), жирних кислот (З. П. Васюренко, 1982), активністю дихання (B. Chance & Y. Williams, 1956) та зміною активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (R. W. Obrien, 1975).

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням програм Excel 2007 (Microsoft Corp., США) та Statistica 6.0 (StatSoft, США). Усі наведені дані подані у вигляді середнього арифметичного (М) і стандартного відхилення (s). Застосовували параметричний t-критерій Стьюдента за умов нормального розподілу; за його відсутності аналіз проводили за допомогою непараметричного U-критерію Манна-Уїтні. Для множинних порівнянь при нормальному розподілі використовували дисперсійний аналіз (ANOVA). У випадку розподілу, відмінного від нормального, застосовували ранговий критерій Крускала-Уолліса. Для аналізу закономірностей зв’язку між окремими показниками проведено кореляційний аналіз за допомогою коефіцієнта кореляції Спірмена. При обліку результатів у альтернативній формі (летальність) застосовували точний критерій Фішера. Вірогідними вважалися відмінності між групами при рівні значущості р < 0,05.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

Антимікробна активність четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу досліджена з використанням еталонних тест-штамів грампозитивних (*S. aureus*), грамнегативних (*E. coli*, *P. aeruginosa*) бактерій та дріжджоподібних грибів (*C. albicans*). Отримані дані свідчать, що з 19 досліджених сполук переважна більшість одночасно інгібує ріст та розмноження грампозитивних коків та грибів роду *Candida*, найбільшу чутливість бактерії та гриби виявили до дії сполуки ЮК-23. Відносно грамнегативних бактерій *E. coli* виразна протимікробна дія зареєстрована у 3 сполук (ЮК-37, КВМ-86, КВМ-97), щодо *P. aeruginosa* – у КВМ-97. Серед усіх протестованих сполук найбільш широкий спектр антимікробної активності притаманний сполуці КВМ-97.

Аналіз залежності «хімічна структура − антимікробна активність» показав, що прояв антимікробної активності досліджуваних четвертинних солей залежить від будови алкільного/арильного ланцюга та кількості атомів вуглецю в його складі. Наявність у структурі молекули 4-(1-адамантил)-фенільного радикала забезпечує сполукам широкий спектр антимікробної активності, а введення бензильного радикала до диметиламіну чи насичених 5-членного та 6-членного гетероциклів (піролідин та морфолін відповідно) – антисиньогнійну активність.

Поглиблені дослідження найактивніших сполук (ЮК-23 та КВМ-97) свідчать про широкий спектр специфічної антимікробної активності, їх здатність пригнічувати як бактерії, так і гриби. Так, сполука ЮК-23 характеризується виразною активністю щодо грампозитивних бактерій (МІК 0,15−2,5 мкг/мл), молікутів (МІК 3,12–6,25 мкг/мл), дріжджоподібних (МІК 0,07–0,6 мкг/мл) та міцеліальних грибів (МІК 0,3–2,5 мкг/мл), менш чутливими виявились грамнегативні мікроорганізми (МІК 10,0–> 50,0 мкг/мл). Сполуці КВМ-97 притаманний виразний антимікробний ефект щодо усіх тест-штамів мікроорганізмів: грамнегативних (МІК 0,9–6,25 мкг/мл) та грампозитивних (МІК 0,3–5,0 мкг/мл) бактерій, молікутів (МІК 1,56–12,5 мкг/мл) та грибів
(МІК 0,3–2,5 мкг/мл).

Щодо грампозитивних бактерій (*Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium glutamicum*) досліджені сполуки переважають або практично не поступаються ванкоміцину (МІК ≤ 4,0 мкг/мл), а також, залежно від виду мікроорганізмів, азитроміцину (МІК ≤ 1,0 мкг/мл), лінезоліду (МІК ≤ 4,0 мкг/мл) та тетрацикліну (МІК ≤ 4,0 мкг/мл). За інгібувальним ефектом щодо грамнегативних бактерій сполука КВМ-97 (МІК 0,9–6,25 мкг/мл) виявляє переваги перед ампіциліном (МІК ≤ 8,0 мкг/мл) та хлорамфеніколом (МІК ≤ 8,0 мкг/мл), практично не поступається активності гентаміцину (МІК ≤ 2,0 мкг/мл) та цефтазидиму (МІК ≤ 4,0 мкг/мл) і наближається до дії меропенему (МІК ≤ 1,0 мкг/мл).

Відносно тест-штамів анаеробних бактерій *Clostridium* spp. МІК сполук знаходиться у межах 0,35−1,25 мкг/мл, що переважає активність метронідазолу, кліндаміцину та ампіциліну-сульбактаму (МІК ≤ 4,0 мкг/мл).

Залежно від тест-штаму дріжджоподібних грибів досліджувані сполуки переважають або не поступаються за значенням МІК флуконазолу (МІК ≤ 2,0 мкг/мл, окрім *C. glabrata*) та амфотерицину В (МІК ≤ 1,0 мкг/мл).

Досліджувані адамантанвмісні сполуки є активними щодо збудників зигомікозів (*M. circinelloides*), фузаріозів (*F. oxysporum*) та аспергільозів (*A. niger*), МІК становить 0,3–2,5 мкг/мл. За значенням МІК сполуки ЮК-23 та КВМ-97 не поступаються або наближаються до активності амфотерицину В та представників азолів − вориконазолу та позаконазолу.

У дослідженнях *in vitro* встановлено, що для сполук ЮК-23 та КВМ-97 характерною є бактерицидна та фунгіцидна дія, їх активність не залежить від рН та знижується у 2–4 рази при збільшенні мікробного навантаження. Постантибіотичний ефект сполук реалізується затримкою (тривалість ефекту – до 6 год) або інгібуванням росту мікроорганізмів. Концентрація сполук, яка попереджує утворення стійких штамів, перевищує значення МІК у 4–16 разів.

Результати дослідження антибіоплівкових властивостей свідчать, що сполука КВМ-97 у діапазоні концентрацій 0,5–5,0 МІК здатна пригнічувати плівкоутворення і руйнувати сформовані біоплівки бактерій (*P.* *аeruginosa*) та грибів (*C. glabrata*), а також попереджувати колонізацію засобів медичного призначення, що підтверджено на катетерній моделі. Антибіоплівкова активність зростала зі збільшенням концентрації сполуки. За здатністю пригнічувати плівкоутворення бактерій (на 31,8–84,3 %) сполука КВМ-97 не поступалась меропенему та цефтазидиму, залежно від концентрації виявляла перевагу перед ципрофлоксацином (0,5 МІК) та гентаміцином (5,0 МІК). За здатністю руйнувати сформовані *P.* *аeruginosa* біоплівки(60,8–63,9 %) сполука в обох досліджених концентраціях виявляла перевагу перед цефтазидимом (інгібувальний ефект не перевищував 29,6 %) та не поступалась меропенему (47,5–56,6 %). Залежно від концентрації сполука КВМ-97 не поступалась за ступенем прояву ефекту ципрофлоксацину та гентаміцину або переважала їх.

За ступенем пригнічення плівкоутворення *C. glabrata* сполука КВМ-97 (інгібувальний ефект становив 25,8–78,1 %) не поступалась амфотерицину В, ністатину, ітраконазолу та кетоконазолу, а в концентрації 0,5 МІК виявляла перевагу перед ністатином. Щодо сформованих біоплівок (ступінь руйнування 35,0–73,6 %) сполука КВМ-97 у концентрації 5,0 МІК не поступалась амфотерицину В та переважала ністатин, ітраконазол та кетоконазол, у яких не було зареєстровано інгібувальної активності; у концентрації 0,5 МІК сполука виявляла перевагу перед усіма препаратами порівняння.

Досліджені сполуки ЮК-23 та КВМ-97 при внутрішньоочеревинному та внутрішньошлунковому введенні відносяться до малотоксичних (IV клас) та помірно небезпечних (III клас) речовин за умови внутрішньошлункового введення. За рівнем ЛД50 при внутрішньоочеревинному введенні ЮК-23 та КВМ-97 (225 мг/кг для обох сполук) не поступаються ністатину (200 мг/кг) та гентаміцину (235 мг/кг), при внутрішньошлунковому введенні (832 мг/кг та 1047 мг/кг відповідно) –тетрацикліну (678 мг/кг) та кетоконазолу (702 мг/кг).

Для сполуки КВМ-97 показана наявність дозозалежної місцевоподразнювальної дії при нанесенні на слизову оболонку ока кролів, прояви подразнювального ефекту не спостерігались при концентраціях нижче 0,025 %.

Ефективність сполуки КВМ-97 доведена на моделі генералізованої інфекції та місцевого гнійно-запального процесу. При введенні сполуки КВМ-97 у лікувально-профілактичному режимі тваринам з генералізованою інфекцією, обумовленою *P. aeruginosa*, найвиразніший ефект реєструвався у дозі 0,01 ЛД50, сполука забезпечувала виживання 100 % інфікованих тварин і не поступалась за ефективністю сучасному антимікробному препарату меропенему. При такій же дозі та режимі уведення на моделі кандидемії сполука КВМ-97 сприяла виживанню 30 % інфікованих мишей (при 100 % загибелі у контролі), на 10 добу спостереження вірогідних відмінностей з флуконазолом за виживаністю тварин не виявлено.

Доведено ефективність КВМ-97 у вигляді 0,025 % розчину на моделі стафілококового кон’юнктивіту у кролів: вже на першу добу не виявлялась контамінація кон’юнктиви *S. aureus* (при застосуванні 30 % розчину сульфацилу натрію − на 2 добу, тобраміцину − на 3 добу спостереження). Повне зникнення симптомів захворювання реєстрували на четверту добу, у тварин групи контролю − після дванадцятої доби. Експериментально встановлено, що за ефективністю на моделі стафілококового кон’юнктивіту сполука КВМ-97 практично не поступалась тобраміцину та сульфацилу натрію.

Для встановлення деяких аспектів механізму дії були проведені дослідження щодо впливу найактивніших сполук на ультраструктуру, склад та проникність мембрани, а також на внутрішньоклітинні процеси бактерій та грибів.

На першому етапі, використовуючи трансмісійну електронну мікроскопію, оцінювали ультраструктуру мікроорганізмів при дії четвертинних солей
1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу. Встановлено, що сполуки КВМ-97 та ЮК-23 у клітинах грамнегативних і грампозитивних бактерій зумовлюють порушення цілісності цитоплазматичної мембрани, дезорганізацію внутрішньої структури клітин (рис. 3) та їх лізис.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Рисунок1 | Рисунок1 | Рисунок1 |
| А | Б | В |

Рис. 3. Ультратонкі зрізи клітин *P. aeruginosa*. А – інтактні клітини, Б – через 6 год дії КВМ-97 (0,5 МІК), В – через 6 год дії КВМ-97 (2,0 МІК). Електронна мікроскопія, збільшення: ×10000 (А), ×12000 (Б), ×15000 (В).

Примітки: ГК – глікокалікс; КС – клітинна стінка; ИМ – інвагінації ЦПМ;
Н – нуклеоїд; ПИМ – порожнина, утворена інвагінованою мембраною;
ПП – периплазматичний простір; ПТ – полярні тільця; ЦПМ – цитоплазматична мембрана; ФЦ – фрагментація цитоплазми; зірочками (\*) позначені ділянки з конденсованою цитоплазмою.

Результати проведених електронно-мікроскопічних досліджень впливу адамантанвмісних сполук на ультраструктуру грибів *C. albicans* свідчать про наявність значних порушень у клітинній мембрані (ЮК-23) та у мітохондріях
(КВМ-97).

При дії сполуки КВМ-97 на клітини *P. aeruginosa* виявлено кількісні зміни загального полісахаридного складу клітинної оболонки (рис. 4). При дії сполуки у концентрації 0,5 МІК вміст полісахаридів зменшується на 40,6 %, при 2,0 МІК − відповідає такому в контролі.

Рис. 4. Вміст полісахаридів у клітинах *P. aeruginosa* в присутності сполуки
КВМ-97 (% щодо інтактного контролю)

Примітка. «\*» – відмінності вірогідні щодо інтактного контролю, р < 0,05.

Результати досліджень щодо впливу сполук на синтез стеринів у *C. albicans* показали, що ЮК-23 та КВМ-97 у концентраціях 0,5 МІК та 1,0 МІК не змінюють кількісний вміст стеринів у грибів*.* Збільшення концентрації до 5,0 МІК супроводжується посиленням синтезу стеринів у 4–7 разів проти показника інтактних клітин (табл. 1).

*Таблиця 1*

**Вміст стеринів (% сухої біомаси) у клітинах *C. albicans* при інкубації з різними концентраціями сполук ЮК-23 та КВМ-97**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Умови експерименту | ЮК-23 | КВМ-97 |
| Стерини, % сухої біомаси | % від контролю | Стерини, % сухої біомаси | % від контролю |
| 0,5 МІК | 0,074 ± 0,026 | 105,7 | 0,096 ± 0,005 | 94,9 |
| 1,0 МІК | 0,073 ± 0,006 | 104,3 | 0,110 ± 0,009 | 108,7 |
| 5,0 МІК | 0,495 ± 0,009\* | 704,7 | 0,398 ± 0,022\* | 392,6 |
| Контроль | 0,070 ± 0,006 | 100 | 0,101 ± 0,005 | 100 |

Примітка. «\*» – відмінності вірогідні щодо інтактного контролю, р < 0,05.

Проведені дослідження показали, що четвертинні солі 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу сприяють збільшенню проникності цитоплазматичної мембрани, про що свідчить вихід ендогенних речовин, які поглинають світло при 260 нм, з клітин бактерій (*S. aureus* та *P. aeruginosa*) та грибів (*C. albicans*). Це підтверджує наявність у сполук мембранотропних властивостей. Виявлено певні відмінності у характері дії досліджуваних речовин. Так, інкубація бактерій та грибів зі сполукою ЮК-23 супроводжується поступовим зростанням виходу внутрішньоклітинного вмісту із максимумом при 50,0 МІК. У присутності КВМ-97 максимальний вихід ендогенних речовин реєструється у діапазоні концентрацій від 10,0 МІК (*P. aeruginosa, C. albicans*) до 20,0 МІК (*S. aureus*) (табл. 2).

*Таблиця 2*

**Вплив КВМ-97 на вихід ендогенних речовин з клітин мікроорганізмів**

|  |  |
| --- | --- |
| Умови експерименту | Оптична щільність, 260 нм |
| *P. aeruginosa* | *S. aureus* | *C. albicans*  |
| 0,5 МІК | 0,10 ± 0,04 | 0,18 ± 0,02\* | 0,17 ± 0,01 |
| 1,0 МІК | 0,10 ± 0,01 | 0,18 ± 0,04\* | 0,18 ± 0,01 |
| 10,0 МІК | 0,18 ± 0,02\* | 0,18 ± 0,04\* | 0,26 ± 0,02 \* |
| 20,0 МІК | 0,12 ± 0,01 | 0,35 ± 0,01\* | 0,23 ± 0,02 \* |
| 50,0 МІК | - | 0,11 ± 0,01 | 0,23 ± 0,02 \* |
| Контроль | 0,10 ± 0,02 | 0,13± 0,02 | 0,16 ± 0,03 |

Примітка. «\*» – відмінності вірогідні щодо інтактного контролю, р < 0,05.

Мембранотропну активність також оцінювали за здатністю адамантанвмісних сполук зумовлювати лізис протопластів (клітин, позбавлених клітинної стінки). Дослідження, проведені з бактеріями (*E. coli*) та грибами (*C. albicans*) показали, що сполуки ЮК-23 та КВМ-97 у концентраціях 5,0–10,0 МІК впродовж 30–60 хв інкубації зумовлювали лізис 58,7–66,7 % протопластів, незалежно від виду мікроорганізмів.

Вплив сполук на транспортні системи синьогнійної палички оцінювали за активністю ефлюксних помп клінічного штаму *P. aeruginosa* 449 з помірною чутливістю до меропенему. Дослідження проведені у порівнянні з хлорпромазином, що є інгібітором ефлюксних помп родини RND (resistance–nodulation–division), яким належить головна роль у резистентності синьогнійної палички до антимікробних засобів (L. Paixao et al., 2009; J. Dreier, P. Ruggerone, 2015).

Результати досліджень впливу сполук на ефлюкс показали (рис. 5 А), що сполука КВМ-97 сприяє дозозалежному накопиченню бромистого етидію в клітинах *P. aeruginosa* (на 500–959 % порівняно з контролем, p < 0,05) і за блокувальним ефектом переважає хлорпромазин (182 %).

 А Б

Рис. 5. Накопичення бромистого етидію в клітинах *P. aeruginosa* у присутності сполуки КВМ-97 та хлорпромазину (ХПЗ) у середовищі без глюкози (А) та з нею (Б)

Відомо, що активність ефлюксних помп залежить від наявності глюкози в поживному середовищі (L. Paixao et al., 2009), що підтверджено нашими дослідженнями: вміст бромистого етидію в інтактних клітинах та в присутності хлорпромазину збільшився у 2,87 та 3,41 рази відповідно (рис. 5 Б). За умови наявності в інкубаційному середовищі сполуки КВМ-97 та глюкози змін інтенсивності накопичення бромистого етидію клітинами *P. aeruginosa* не виявлено. Ці дані свідчать, що вплив адамантанвмісної сполуки на ефлюксні помпи є енергонезалежним процесом.

Оскільки сполука КВМ-97 виявляє мембранотропні властивості, то внаслідок порушень структури та функцій мембранного апарату прокаріот можливі зміни внутрішньоклітинних процесів. Експериментально встановлено, що сполука
КВМ-97 у концентрації 0,5 МІК сприяє зниженню вмісту білка у клітинах *P. aeruginosa* та *S. aureus* (на 29,3 % та 51,9 % відповідно). У клітинах еукаріот (*C. albicans*) при дії сполуки ЮК-23 у концентрації 0,5 МІК реєструється незначне підвищення рівня білка (на 23 %), при збільшенні концентрації до 1,0 МІК вміст білка відповідає такому в контролі.

Сполука КВМ-97 у субінгібуючій концентрації (0,5 МІК) здатна порушувати синтез жирних кислот у клітинах грамнегативних бактерій (*E. coli*), її дія реалізується збільшенням вмісту додеканової, гексадеканової та гептадеканової кислот та зниженням вмісту ізо-гептадеканової кислоти.

Енергозабезпечення бактеріальної клітини великою мірою залежить від структурної організації та функції цитоплазматичної мембрани. Антимікробні засоби з мембранотропною дією, впливаючи на ферменти дихального ланцюга або окисного фосфорилювання, порушують енергозабезпечення і функціонування мікробної клітини (M.A. Lobritz, 2015). Проведені дослідження показали, що четвертинні солі 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу здатні впливати на енергетичні процеси у клітинах як бактерій, так і грибів. Встановлено, що сполука КВМ-97 знижує інтенсивність ендогенного дихання на 20,0 % (*P. aeruginosa*) (рис. 6 А), ЮК-23 – близько 45,0 % (*E.* *coli* та *C. albicans*). Виразніший вплив на інтенсивність субстратного дихання бактеріальних клітин для КВМ-97 виявлено в умовах окиснення сукцинату (рис. 6 Б), для ЮК-23 – при окисненні глутамату. При дії на клітини грибів реєструється збільшення швидкості субстратного дихання у присутності обох субстратів окиснення.

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| А | Б |

Рис. 6 Вплив сполуки КВМ-97 на активність дихання *P. aeruginosa.*А – ендогенне дихання, Б – субстратне дихання.

Примітка. «\*» – відмінності вірогідні щодо інтактного контролю, р < 0,05.

Вплив КВМ-97 на енергетичні процеси оцінювали за зміною активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази – ключового ферменту катаболізму вуглеводів у клітинах *P. aeruginosa*, який бере участь у шляху Ентнера-Дудорова (2-кето-3-дезокси-6-фосфоглюконатний (КДФГ) шлях) або у пентозофосфатному циклі. Встановлено, що сполука у концентрації 0,5 МІК інгібує активність ферменту на 29,2 %, а при збільшенні концентрації до 1,0 МІК, навпаки, реєструється збільшення на 20,8 %.

Таким чином, результати проведених досліджень показали, що четвертинні солі 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу виявляють широкий спектр антимікробної дії, який забезпечується наявністю у молекулі
4-(1-адамантил)-фенільного радикала. Введення бензильного радикала до диметиламіну чи насичених 5-членного та 6-членного гетероциклів (піролідин та морфолін відповідно) обумовлює активність відносно *P. aeruginosa*. Виявлені у скринінгових дослідженнях сполуки ЮК-23 та КВМ-97 інгібують ріст та розмноження як планктонних мікроорганізмів, так і біоплівок. Підтверджений в умовах *in vitro* та *in vivo* антимікробний ефект забезпечується здатністю досліджуваних сполук впливати на структуру та/або функціонування зовнішньої оболонки та внутрішньоклітинні процеси мікроорганізмів. Отримані дані щодо зміни ультраструктури клітин бактерій та грибів, збільшення проникності цитоплазматичної мембрани, лізису протопластів та пригнічення активності дихання можуть свідчити, що механізм дії сполук КВМ-97 та ЮК-23 пов’язаний з їх мембранотропними властивостями. Крім того, в експериментах доведено здатність похідних адамантану індукувати збільшення вмісту стеринів у клітинах грибів, впливати на жирнокислотний склад клітин бактерій, змінювати вміст полісахаридів, білка та активність катаболічних ферментів і ефлюксних помп мікроорганізмів. Отже, антимікробна дія четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу на життєдіяльність бактерій та грибів є комплексною, що може бути обумовлено впливом на декілька мішеней у мікробній клітині.

Таким чином, результати експериментів обґрунтовують доцільність подальших досліджень четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу для створення на їх основі нових ефективних та безпечних лікарських препаратів, які сприяли б розширенню асортименту сучасних антимікробних засобів та подоланню резистентності збудників.

**ВИСНОВКИ**

Зниження ефективності антимікробної хіміотерапії, що призводить до хронізації процесу, збільшення терміну перебування хворих у стаціонарі та матеріальні витрати на лікування хворих актуалізує проблему раціонального застосування антимікробних препаратів та розширення арсеналу протимікробних засобів завдяки впровадженню нових препаратів.

У дисертаційній роботі теоретично обґрунтовано та експериментально підтверджено перспективність пошуку сполук з антибактеріальними та антифунгальними властивостями серед четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу та доцільність розробки  на їх основі нових ефективних та безпечних лікарських засобів антимікробної дії.

1. У скринінгових дослідженнях антимікробної активності 19 четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу виявлені сполуки з односпрямованою та полівалентною дією. Найвиразніша активність притаманна двом сполукам: 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензил, N-диметиламіно)-2-пропанол хлориду (КВМ-97) та 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензил, N-метил, N-циклогексил)-2-пропанол хлориду (ЮК-23). Залежність «хімічна структура – антимікробна дія» визначається будовою амінного фрагмента, кількістю атомів вуглецю у складі алкільного/арильного ланцюга та його просторовим розташуванням, а також загальною енергією молекул, площею поверхні, об’ємом молекул та їх ліпофільністю. Полівалентні властивості забезпечує наявність у структурі молекули 4-(1-адамантил)-фенільного радикала, антисиньогнійну активність – введення бензильного радикала до диметиламіну чи насичених 5-членного та 6-членного гетероциклів.
2. За результатами вивчення гострої токсичності найбільш активних сполук ЮК-23 та КВМ-97 встановлено, що при однократному внутрішньошлунковому (ЛД50 832 мк/кг та 1047 мг/кг відповідно) та внутрішньоочеревинному (ЛД50 225 мк/кг для обох сполук) введенні вони належать до IV класу токсичності (малотоксичні речовини). Сполука КВМ-97 не чинить місцевоподразнювальну дію при нанесенні на слизову оболонку ока кролів у концентраціях нижче 0,025 %.
3. Четвертинні солі 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу виявляють широкий спектр антимікробної дії *in vitro,* інгібують ріст та розмноження як бактерій, так і грибів. Сполукам притаманні антибіоплівкові властивості, бактерицидна та фунгіцидна дія. Для сполуки ЮК-23 характерна більш виразна активність щодо грампозитивних бактерій, молікутів та грибів (міцеліальних та дріжджоподібних), МІК у залежності від тест-організму становить 0,07–6,25 мкг/мл. Сполуці КВМ-97 притаманний виразний антимікробний ефект щодо усіх тест-штамів бактерій та грибів, МІК становить 0,3–12,5 мкг/мл. Встановлено, що активність сполук не залежить від рН та знижується у 2–4 рази при збільшенні мікробного навантаження. У залежності від виду мікроорганізмів постантибіотичний ефект сполук супроводжується затримкою росту (до 6 год) або його повним пригніченням. Доведено, що концентрація, яка запобігає утворенню стійких штамів мікроорганізмів, перевищує значення МІК у 4–16 разів.
4. На моделі генералізованої інфекції у мишей, обумовленої *P. aeruginosa*, КВМ-97 виявляє виразний ефект у лікувально-профілактичному режимі введення у дозі 0,01 ЛД50. Сполука забезпечувала виживаність 100 % інфікованих тварин при 100 % загибелі у контролі та не поступалась препарату порівняння меропенему. При такій же дозі та режимі введення на моделі кандидемії КВМ-97 сприяла виживанню 30 % тварин при 100 % загибелі у контролі (на 10 добу спостереження відмінностей з флуконазолом не виявлено). На моделі стафілококового кон’юнктивіту доведено ефективність КВМ-97 (0,025 % розчин), сполука не поступається тобраміцину (0,3 % розчин) та сульфацилу натрію (30,0 % розчин). На катетерній моделі доведено здатність сполуки запобігати колонізації виробів медичного призначення, ступінь прояву ефекту зростає зі збільшенням концентрації.
5. За результатами дослідження ультраструктури клітин бактерій та грибів встановлено, що антимікробна активність четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу обумовлена мембранотропними властивостями: порушення цілісності цитоплазматичної мембрани бактерій *P. aeruginosa, S. aureus, C. albicans* реєструється впродовж 1–3 год дії, подовження терміну інкубації супроводжується дезорганізацією внутрішньої структури, появою дефектних органел (мітохондрій у грибів) та лізисом клітин.
6. Встановлено здатність сполук ЮК-23 та КВМ-97 впливати на склад клітинної оболонки бактерій та грибів, зокрема індукувати збільшення вмісту стеринів у клітинах *C. albicans* (у 4–7 разів) та змінювати кількісний склад полісахаридів *P. aeruginosa.* Мембранотропна дія сполук підтверджена дозозалежним збільшенням проникності цитоплазматичної мембрани та лізисом протопластів бактерій та грибів. Показано, що сполука КВМ-97 пригнічує активність ефлюксних помп *P. aeruginosa* у 3,5–10 разів (р < 0,05) .
7. Четвертинні солі 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу впливають на метаболічні процеси у клітинах мікроорганізмів. Виявлено порушення складу жирних кислот у клітинах *E. coli*, зниження вмісту білка у клітинах *P. aeruginosa* та *S. aureus* (на 29,3 % та 51,9 % відповідно) та відсутність впливу на його кількість у клітинах *C. albicans*. Порушення енергетичних процесів у клітинах бактерій та грибів реалізується змінами ендогенного та субстратного дихання.
8. Проведене дослідження експериментально обґрунтовує доцільність пошуку сполук як з широким спектром антимікробної дії, так і з односпрямованим антибактеріальним ефектом, зокрема з антисиньогнійною активністю, серед четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу. Отримані результати свідчать про перспективність розробки на їх основі ефективних та безпечних лікарських засобів.

**СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Дудікова Д.М. Антимікоплазмова активність похідних 1-адамантанфенолу / Д.М. Дудікова, К.С. Коробкова, І.П. Токовенко // Фармакологія і лікарська токсикологія. – 2014. – Т. 39, № 3. – С. 20–24. (*Здобувачем особисто виконано частину експериментального блоку, проведено аналіз даних, підготовлено статтю до публікації*).

2. Синтез та антимікробна активність четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу / Ю.В. Короткий, Д.М. Дудікова, Н.О. Вринчану, О.А. Смертенко // Медична хімія. – 2015. – Т. 17, № 1 (62). –
С. 12–16. (*Здобувачем особисто виконано частину експериментального блоку, проведено аналіз даних, підготовлено окремі розділи статті до публікації*).

3. Дудікова Д.М. Ультрастуктура *Candida albicans* при дії 1-[4-(1-адамантил)- фенокси]-3-(N-бензил, N-диметиламіно)-2-пропанол хлориду / Д.М. Дудікова, С.І. Войчук, Н.О. Вринчану // Вісник морфології. – 2015. – Т. 21, № 2. – С. 300–303. (*Здобувачем особисто виконано частину експериментального блоку, проведено аналіз даних, підготовлено статтю до публікації*).

4. Дудикова Д.М. Острая токсичность производных 1-адамантанфенола / Д.М. Дудикова, С.В. Гриневич // Проблемы и перспективы развития современной медицины. – 2015. – Т. 2. – С. 26–28. (*Здобувачем особисто виконано основну частину експериментального блоку, проведено аналіз даних, підготовлено статтю до публікації*).

5. Дудікова Д.М. Особливості ультраструктури *Staphylococcus aureus* за дії
4-(1-адамантил)фенокси-3-(N-бензил, N-метил, N-циклогексил)-2-пропанол хлориду / Д.М. Дудікова, С.І. Войчук, Н.О. Вринчану // Фармакологія і лікарська токсикологія. – 2017. – Т. 54, № 3. – С. 32–36. (*Здобувачем особисто виконано частину експериментального блоку, проведено аналіз даних, підготовлено статтю до публікації*).

6. Активність похідних амінопропанолу відносно біоплівок *Pseudomonas aeruginosa* / Д.М. Дудікова, З.С. Суворова, В.В. Недашківська, А.О. Шарова, М.Л. Дронова, Н.О. Вринчану // Фармацевтичний журнал. – 2017. ‑ № 1. – С. 93–100. (*Здобувачем особисто виконано частину експериментального блоку, проведено статистичну обробку та аналіз даних, підготовлено статтю до публікації*).

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

8. Дудикова Д.М. Влияние 4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензил,
N-диметиламино)-2-пропанол хлорида на ультраструктуру *Pseudomonas aeruginosa /* Д.М. Дудикова, С.И. Войчук, Н.А. Врынчану // Science Rise: Biological Science. – 2018. – Т. 12, № 4. – С. 35–41. (*Здобувачем особисто виконано частину експериментального блоку, проведено аналіз даних, підготовлено статтю до публікації*).

9. Патент України на винахід № 113780, МПК С07С 217/44, С07С 215/20, А61К 31/14. Застосування 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-(N-бензил, N-диметиламіно)-2-пропанол хлориду як інгібітору утворення патогенних біоплівок / Н.О. Вринчану, Д.М. Дудікова, З.С. Суворова, С.В. Гриневич, Ю.В. Короткий, А.О. Смертенко – № а 201503826; заявл. 22.04.2015, опубл. 10.03.2017, бюл. №5. – 4 с. (*Здобувачем особисто виконано частину експериментального блоку, проведено аналіз даних*).

10. Патент України на корисну модель № 126151, МПК С07С 213/00, С07С 215/00, А01N 33/00 Застосування четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-диалкіламіно-2-пропанолу, які виявляють протимікробну дію / Ю.В. Короткий, Н.О. Вринчану, Д.М. Дудікова, А.О. Смертенко – № u 2017 12682; заявл. 21.12.2017, опубл. 11.06.2018, бюл. №11. – 4 с. (*Здобувачем особисто виконано частину експериментального блоку, проведено аналіз даних*).

11. Антисиньогнійна активність нового похідного аміноадамантану / С. Гриневич, Л. Балакир, Д. Дудікова, А. Дудка // Матеріали ХІІ міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених, м. Тернопіль, 27-29 квітня 2009 р. – Тернопіль, 2009. – С. 239.

12. Литическое действие адамантансодержащего соединения ЮК-23 по отношению к протопластам *E. coli* / Д.М. Дудикова, А.В. Егорова, О.С. Фурман, О.В. Мищенко // Материалы 38-й конференции молодых ученых и 62-й студенческой научной конференции Смоленской государственной медицинской академии (с международным участием), г. Смоленск, 22 апреля 2010 г. – Смоленск, 2010. – С. 146–147.

13. Дудікова Д. М. Чутливість пліснявих грибів до дії похідного адамантану ЮК-23 / Д.М. Дудікова, О.В. Міщенко, З.С. Суворова // Матеріали всеукраїнської конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2010», м. Запоріжжя, 13-14 травня 2010 р. – Запоріжжя, 2010. – С. 93.

14. Дудикова Д.М. Изучение ингибирующего действия производного аминоадамантана ЮК-97 по отношению к протопластам *E. coli* / С.В. Гриневич, О.С. Фурман, Д.М. Дудикова // Матеріали ХІ наукової конференції студентів та молодих вчених «Новини і перспективи медичної науки», м. Дніпропетровськ, 13-15 квітня 2011 р. – Дніпропетровськ, 2011. – С. 166.

15. Врынчану Н.А. Чувствительность *Candida* spp. к производным 1-адамантанфенола / Н.А. Врынчану, Д.М. Дудикова, Ю.В. Короткий // Материалы Юбилейной конференции по медицинской микологии (к 100-летию З.Г. Степанищевой), г. Москва, 26 сентября 2013 г. – Москва, 2013. – С. 333–335.

16. Dudikova D. Membranotropic effects of 1-adamantane phenol derivative / D. Dudikova // 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, 10-13 May 2014. – Barcelona, 2014. – Режим доступу: http://www.escmid.org/escmid\_library/online\_lecture\_library/material/?mid=13292

17. Дудикова Д.М. Влияние производных 1-адамантанфенола на клеточную мембрану *Staphylococcus aureus* / Д.М. Дудикова, А.А. Дуплий, Н.А. Врынчану // Матеріали ІІІ Міжнародної науково-практичної конференції «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології», Київ, 22-23 жовтня 2015 р. – С. 52-53.

18. Dudikova D.M. Alteration of *Pseudomonas aeruginosa* respiration by
4-(1-adamantyl)-phenol derivative / D.M. Dudikova, N.O. Vrynchanu, V.I. Nosar // International Conference “SmartBio”, Kaunas, 18-20 May 2017, Kaunas, 2017. – P.108.

19. Antibiofilm effect of novel aminopropanol derivatives against *Candida* strains / N.O. Vrynchanu, A.V. Rudenko, Y.V. Korotkij, Z.S. Suvorova, D.M. Dudikova // 8th Trends in Medical Mycology (TIMM-8), 6-9 жовтня 2017, Белград, Сербія. – Mycoses. – 2017. – V. 60 (Suppl. 2). – Р. 82–83.

**АНОТАЦІЯ**

**Дудікова Д. М. Антимікробні властивості четвертинних солей
1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу.** – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ, 2018.

Дисертаційна робота присвячена вивченню антибактеріальних та антифунгальних властивостей четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу та дослідженню механізму їх дії. Отримані дані свідчать про широкий спектр антимікробної активності у четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу. Найбільш активні сполуки
КВМ-97 (4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензил, N-диметиламіно)-2-пропанол хлорид) та ЮК-23 (4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензил, N-метил, N-циклогексил)-2-пропанол хлорид) виявляють інгібувальний вплив відносно як планктонних мікроорганізмів, так і біоплівок. Сполука КВМ-97 виявляє ефективність на моделі генералізованої інфекції у мишей та кон’юнктивіту у кролів. Підтверджений в умовах *in vitro* та *in vivo* антимікробний ефект є комплексним та забезпечується здатністю досліджуваних сполук впливати на структуру та/або функціонування зовнішньої оболонки та внутрішньоклітинні процеси мікроорганізмів.

Наявність бактерицидного/фунгіцидного ефекту, широкого спектра активності, відсутність залежності інгібувальної дії від рН, належність до малотоксичних речовин (IV клас токсичності) свідчить про перспективність розробки на основі четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу нових антимікробних засобів.

**Ключові слова:** похідні адамантану, антимікробна активність, біоплівки, механізм дії, антибактеріальні засоби, препарати для лікування мікозів

**SUMMARY**

**Dudikova D. M. Antimicrobial properties of 1-[4-(1-adamantyl)-phenoxy]-3-dialkylamino-2-propanol quaternary salts. – Manuscript.**

Thesis for a candidate degree in biological sciences by speciality 14.03.05 – pharmacology. – SI “Institute of Pharmacology and Toxicology of NAMS of Ukraine”, Kyiv, 2018.

In the thesis, it provides a new solution of the challenging issue of pharmacology. The prospects for the quaternary salts of 1-[4-(1-adamantyl)-phenoxy]-3-dialkylamino-2-propanol development as new antimicrobial drugs were evaluated using microbiological, pharmacological, biochemical, electron microscopic and physic-chemical methods of research. The advisability of developing effective and safe antimicrobial agents on their basis was confirmed by the results of the study of the activity spectrum, mechanism of action, toxicity and *in vivo* efficacy.

In this work, 19 quaternary salts of 1-[4-(1-adamantyl)-phenoxy]-3-dialkylamino-2-propanol were investigated. It was found that the overwhelming majority of tested compounds possessed significant inhibitory activity against gram-positive cocci and fungi of the genus Candida, the greatest susceptibility of bacteria and fungi was detected by the action of the compound UK-23. The significant antimicrobial activity against the gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*) was revealed in KVM-97. The last one had broad spectrum of action and was the most active among all tested compounds.

The reported results showed that the quaternary salts of 1-[4-(1-adamantyl)-phenoxy]-3-dialkylamino-2-propanol possess a broad spectrum of antimicrobial activity, which is ensured by the presence 4-(1-adamantyl)-phenyl radical. Activity against *P. aeruginosa* was revealed in the presence the benzyl radical with either dimethylamine or saturated 5-membered and 6-membered heterocycles (pyrrolidine and morpholine respectively).

Selected in screening studies, compounds of UK-23 and KVM-97 possess inhibitory effects on both planktonic microorganisms and biofilms. The spectrum of action depends on the compound and microorganisms. Thus, the compound of UK-23 is characterized by more selective activity against gram-positive bacteria, mollicutes and fungi (including molds and yeasts). Gram-negative microorganisms are less susceptible to its action. The compound KVM-97 demonstrated the significant antimicrobial effect against all test-strains of bacteria (including both gram-negative and gram-positive strains, mollicutes) and fungi.

*In vitro* studies have shown that the compounds possess bactericidal and fungicidal effects; their activity is independent of pH and decreases with increasing of inoculum. The most active compounds either induce long post-antibiotic effect (the duration up to 6 h) or suppress the growth of the microorganisms. It was determined that the mutant prevention concentration exceeds the value of MIC in 4–16 times.

The reported results demonstrated that KVM-97 at the tested concentrations
(0.5–5.0 MIC) is capable of suppressing biofilm formation and destroying preformed bacterial (*P. aeruginosa*) and fungal biofilms (*Candida glabrata*), as well as preventing colonization of the means medical purpose that confirmed by the catheter model. The inhibiting effect was dose-dependent.

It was found that tested compounds (UK-23 and KVM-97) after single oral or intraperitoneal administration are low toxic substances (IV class of toxicity). The dose-dependent local irritation effect KVM-97 on ocular tissues was demonstrated in rabbits by the ocular irritation test. No irritating effect was observed in the application at concentrations below 0.025%.

The efficacy of compound KVM-97 was defined under the therapeutic-preventive treatment in murine infectious models caused by bacteria (*P. aeruginosa*) and fungi (*C. albicans*). In animals infected with a *P. aeruginosa* strain*,* therapeutic-preventive treatment with KVM-97 led to 100% and 30% survival at doses of 0.01 LD50 and 0.001 LD50 in the septicemia model. Mortality in the untreated control group was 100 %.

When KVM-97 activity against a strain of *C. albicans* was tested in the septicemia model, therapeutic-preventive treatment with compound led to 30% survival at dose of 0.01 LD50, mortality in the untreated control group was 100 %.

KVM-97 was also effective in rabbit staphylococcal conjunctivitis model. Under the treatment with KVM-97 (0.025 % solution) a strainof *S. aureus* in eyes conjunctival fluid was not detected on the first day, the complete disappearance of the disease symptoms was recorded for the fourth day; in the control animals – after the twelfth day. The efficacy of compound KVM-97 in staphylococcal conjunctivitis model is comparable to the 0.3% solution of tobramycin and superior that of a 30.0% solution of sodium sulfacyl.

*In vitro* and *in vivo* experiments confirmed that the antimicrobial effect is provided by the ability of the tested compounds to influence the structure and / or function of the outer membrane and the intracellular processes of the microorganisms. The detected alterations of bacterial and fungal cells ultrastructure, increased permeability of the cytoplasmic membrane, protoplast lysis and inhibition the oxygen uptake rates may indicate that the mechanism of action of KVM-97 and UK-23 is related to their membranotropic properties. In addition, it was shown the ability of compounds to induce an increase in the content of sterols in fungal cells, to affect the fatty acids composition of gram-negative bacteria, to alter the content of bacterial polysaccharides, the protein content and activity of catabolic enzymes and efflux pumps of microorganisms. Thus, the antimicrobial action of
1-[4-(1-adamantyl)-phenoxy]-3-dialkylamino-2-propanol quaternary salts on the activity of bacteria and fungi is complex, which may be due to the effect on several targets in the microbial cell.

**Key words:** adamantane’s derivatives, antimicrobial activity, biofilms, mechanism of action, antibacterial agents, antifungal agents.

**АННОТАЦИЯ**

**Дудикова Д.М. Антимикробные свойства четвертичных солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-диалкиламино-2-пропанола. –** Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.05 – фармакология. – ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», Киев, 2018.

Диссертационная работа посвящена изучению антибактериальных и антифунгальних свойств четвертичных солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-диалкиламино-2-пропанола и исследованию механизма их действия. Полученные данные свидетельствуют о широком спектре антимикробной активности четвертичных солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-диалкиламино-2-пропанола. Наиболее активные соединения КВМ-97 (4-(1-адамантил)-фенокси-3-(N-бензил,
N-диметиламино)-2-пропанол хлорид) и ЮК-23 (4-(1-адамантил)-фенокси-3-
(N-бензил, N-метил, N-циклогексил)-2-пропанол хлорид) проявляют ингибирующее действие в отношении как планктонных микроорганизмов, так и биопленок. Соединение КВМ-97 проявляет эффективность на модели генерализованной инфекции у мышей и конъюнктивита у кроликов. Подтвержденный в условиях
*in vitro* и *in vivo* антимикробный эффект является комплексным и обеспечивается способностью исследуемых соединений влиять на структуру и/или функционирование внешней оболочки и внутриклеточных процессов микроорганизмов.

Наличие бактерицидного/фунгицидного эффекта, широкого спектра активности, отсутствие зависимости ингибирующего действия от рН, принадлежность к малотоксичным веществам (IV класс токсичности) свидетельствует о перспективности разработки новых антимикробных средств на основе четвертичных солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-диалкиламино-2-пропанола.

**Ключевые слова:** производные адамантана, антимикробная активность, биопленки, механизм действия, антибактериальные средства, препараты для лечения микозов.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
| АМП | – | антимікробний препарат |
| АРМ | – | антибіотикорезистентні мікроорганізми |
| ЄС | – | Європейський союз |
| ЛД50 | – | доза, що викликає загибель 50 % організмів |
| МІК | – | мінімальна інгібуюча концентрація |