

20. Nielsen C.H. Immunoregulation by naturally occurring and disease-associated autoantibodies: binding to cytokines and their role in regulation of T-cell responses / C.H. Nielsen, K. Bendtzen // Adv Exp Med Biol. – 2012. Vol. 750. – P.116–132.
21. Inaba H. Coronavirus Disease 2019 and the Thyroid – Progress and Perspectives / H. Inaba, T. Aizawa // Front Endocrinol. – 2021. – Vol. 12. – P. 708333.

Сведения об авторах

А.В. Марулова – студент

О.Р. Хабаров – ассистент кафедры

Е.Ю. Зяблицкая * – доктор медицинских наук, профессор

Information about the authors

A.V. Marulova – Student

O.R. Khabarov – Department assistant

E.Yu. Zyablitskaya * – Doctor of Sciences (Medicine), Professor

***Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**

evgu79@mail.ru

УДК 579.61:615.28

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ДОКЛИНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ– КАНДИДАТОВ НА ОСНОВЕ БЕНЗОФЕНАЗИНА НА ПРИМЕРЕ МУЗЕЙНЫХ И КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Надточий Вадим Валерьевич¹, Алтоби Акил Махди Кетаб¹, Аминева Полина Геннадьевна^{2,3}, Никонов Игорь Леонидович^{1,4,5}, Зырянов Григорий Васильевич^{1,4}, Ворошилина Екатерина Сергеевна²

¹Кафедра органической и биомолекулярной химии

Химико– технологический институт ФГАОУ ВО «Уральский Федеральный Университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина»

²Кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

³Общество с ограниченной ответственностью «Кволити Мед»

⁴Институт органического синтеза УрО РАН им. И.Я. Постовского

⁵ФГБОУ ВО «Уральский государственный лесотехнический университет»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. На сегодняшний день одной из актуальных проблем здравоохранения является нарастающая антибиотикорезистентность патогенных микроорганизмов. В связи с этим повышается потребность в изыскании новых антибактериальных средств для медицинского применения. **Цель исследования** – получение данных об антибактериальной и противогрибковой активности новых синтезированных доклинических соединений– кандидатов, в том числе в отношении полирезистентных штаммов микроорганизмов. **Материал и методы.** Проведены микробиологические и молекулярно– генетические исследования для получения данных об антибиотикорезистентности бактерий. Опробована методика определения антибактериальной активности веществ. **Результаты.** Получены данные об антибактериальной и противогрибковой активности исследуемых соединений. **Выводы.** Незамещенный бензо[а]феназин–5–ол обладает активностью в отношении ряда бактерий, в том числе полирезистентных штаммов, а также грибов Candida.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, антибактериальная терапия, медицинская химия, феназины.

INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PRECLINICAL CANDIDATE COMPOUNDS BASED ON BENZOPHENAZINE USING THE EXAMPLE OF MUSEUM AND CLINICAL STRAINS OF MICROORGANISMS

Nadtochiy Vadim Valerievich¹, Altobi Akil Mahdi Ketab¹, Amineva Polina Gennadiyevna^{2,3}, Nikonov Igor Leonidovich^{1,4,5}, Zyryanov Grigory Vasilyevich^{1,4}, Voroshilina Ekaterina Sergeevna²

¹Department of Organic and Biomolecular Chemistry

Institute of Chemical Technology of the Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin

²Department of Medical Microbiology and Clinical Laboratory Diagnostics

Ural State Medical University

³Quality Med Limited Liability Company

⁴I.Y. Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences

⁵Ural State Forestry Engineering University

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Today, one of the urgent health problems is the increasing antibiotic resistance of pathogenic microorganisms. In this regard, there is an increasing need to find new antibacterial agents for medical use. **The aim of the study** was to obtain data on the antibacterial and antifungal activity of new synthesized preclinical candidate compounds, including against polyresistant strains of microorganisms. **Material and methods.** Microbiological and molecular genetic studies have been conducted to obtain data on the antibiotic resistance of bacteria. A method for determining the antibacterial activity of substances has been tested. **Results.** Data on the antibacterial and antifungal activity of the studied compounds were obtained. **Conclusions.** Unsubstituted benzo[*a*]phenazine– 5– ol has activity against a number of bacteria, including polyresistant strains, as well as *Candida* fungi.

Keywords: antibiotic resistance, antibacterial therapy, medical chemistry, phenazines.

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотикорезистентность патогенных микроорганизмов – одна из глобальных проблем современной медицины. Нарастающая устойчивость патогенов к антимикробной терапии повышает количество госпитальных пациентов и летальных исходов среди них, повышая нагрузку на систему здравоохранения в целом. Так, Всемирная организация здравоохранения выделяет список приоритетных бактериальных возбудителей для проведения исследований и создания новых антибиотиков. Согласно данному перечню, наиболее приоритетными возбудителями считают *Acinetobacter baumannii*, бактерии порядка *Enterobacterales*, *Mycobacterium tuberculosis*, в отношении которых часто приходится говорить о панрезистентности. Среди прочих мишеней для получения новых антибиотиков также отмечают *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* и др. [1].

В свете данной проблемы мишень– направленное изыскание новых антибактериальных средств является критически важной задачей. Так, интерес в области медицинской химии и фармакологии представляют производные феназина, в том числе бензофеназины, являясь потенциальными противомикробными агентами [2].

Среди методик для определения устойчивости микроорганизмов в рутинной практике микробиологической лаборатории выделяют такие, как микробиологическое исследование с определением чувствительности к антимикробным лекарственным препаратам (диско– диффузионный метод), а также метод полимеразной цепной реакции с определением генов резистентности, полимеразная цепная реакция в данном случае является инструментом выявления генов, ответственных за устойчивость к гликопептидным и бета– лактамным антибиотикам, что позволяет определить механизм резистентности и рационально подобрать антибиотикотерапию. [2,3].

Цель исследования – получить данные о противомикробной активности производных бензофеназинов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования противомикробной активности производных бензофеназинов использовали. В данной работе использована методика серийных разведений, зачастую используемая для исследования биологической активности перспективных соединений [4– 6]. Объектами для оценки противомикробной активности стали ранее незамещенный бензо[*a*]феназин– 5– ол (VN– 13) и его фторзамещенное производное (VN– 11), ранее были синтезированы путем конденсации 1,4– нафтохинона и соответствующего диамина, а также их а. Алкилированные производные (VN– 16– 3 и VN– 35– 3), полученные о– метилированием бензофеназинов (Рис. 1). Структуры соединений подтверждены методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса, масс– спектрометрией и элементным анализом. Для проведения исследования 5 мг каждого соединения растворяли в пробирках с 1 мл диметилсульфоксидаом.

Все объемы жидкостей в работе отбирали при помощи автоматических дозаторов переменного объема Sartorius mLine pipette 100– 1000 мкл, 1– 10 мл (Sartorius, Германия).

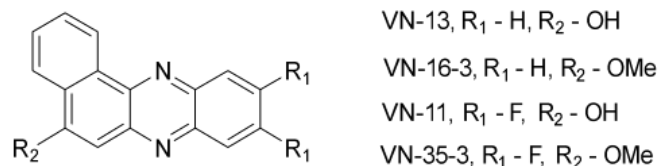


Рис. 1 «Структуры и коды синтезированных соединений»

В данной работе использовали методику серийных разведений, зачастую используемая для исследования биологической активности перспективных соединений [4– 6].

Для проведения исследования были взяты музейные штаммы *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 из коллекции микробиологической лаборатории ООО «Кволити Мед», а также выделенные в микробиологической лаборатории ООО «Кволити Мед» из биоматериалов пациентов клинические штаммы *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, клинические полирезистентные штаммы MRSA (methicillin– resistant *Staphylococcus aureus*), VRE (vancomycin– resistant *Enterococcus*), CRAB (carbapenem– resistant *Acinetobacter baumannii*) и клинический штамм грибов вида *Candida albicans*.

Наличие генов устойчивости к гликопептидным и бета– лактамным антибиотикам В отношении резистентных штаммов была проведена диагностика определяли методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (ПЦР– РВ) с помощью набора «Бакрезиста GLA» и амплификатора «ДТпрайм» («ДНК– Технология», Россия) на предмет генов резистентности. Так, в геноме MRSA (methicillin– resistant *Staphylococcus aureus*) обнаружен ген *mecA*, в геноме VRE (vancomycin– resistant *Enterococcus*) – ген *vanA*, в геноме CRAB (carbapenem– resistant *Acinetobacter baumannii*) – гены bla(OXA– 40) и bla(OXA– 51). Для ПЦР– диагностики были использованы мультиплексные наборы для определения у бактерий генов резистентности к гликопептидным и бета– лактамным антибиотикам «Бакрезиста GLA» от фирмы– производителя «ДНК– Технология» (Россия).

Бактериальный/грибковый инокулюм готовили перед исследованием следующим образом: в пробирку с 4,5 мл натрия хлорида бактериологической петлей вносили культуру микроорганизма под контролем мутности по МакФарланду (0,5) при помощи денситометра DensiCHEK (BioMerieux, Франция), после чего 60 мкл полученной суспензии переносили в пробирки с 13 мл бульона Мюллер– Хинтон (Laboratorios Conda, S.A., Испания) (для бактериальных культур) или бульона Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) (для грибковых культур).

Методика определения чувствительности микроорганизмов к исследуемым соединениям основывалась основывалась на утвержденном стандарте [7]. и включала внесение в во все лунки стерильного 96– луночного планшета вносили 50 мкл стерильной питательной среды – бульона Мюллера– Хинтон (Laboratorios Conda, S.A., Испания) для оценки роста бактериальных культур в присутствии соединений или. бульона Сабуро для оценки роста грибковых культур. Затем в первую лунку вносили 100 мкл раствора исследуемого соединения (5 мг соединения растворяли в 1 мл диметилсульфоксида) с последующим разведением его по 12,5 мкл от первой до последней лунки стрипа, после чего в каждую лунку добавлялось по 100 мкл бактериального/грибкового инокулюма, по такой же схеме был исследован растворитель – диметилсульфоксид, чтобы оценить и отделить его возможный противомикробный эффект от биологической активности исследуемых соединений. В отдельные лунки планшета вносили 100 мкл инокулюма без вещества (положительный контроль) и 100 мкл чистого бульона Мюллер– Хинтон (отрицательный контроль). После внесения всех компонентов в лунки, планшет инкубировали в термошейкере (Randox Inc., Великобритания) в течение 10 минут при комнатной температуре, а затем 24 часа инкубировали в микробиологическом термостат– инкубаторе Heratherm IMH60 (ThermoScientific, США) при температуре 35±0.5°C. После инкубирования в термостате был произведен высев по 10 мкл содержимого лунок на плотные питательные среды (для бактериальных культур был использован мясо– пептонный агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), для грибковой культуры – агар Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия)) и инкубировали 24 часа в термостате при температуре 35±0.5°C. 37 °C. После инкубирования учитывали результаты

исследования. Использованная методика исследования противомикробной активности соединений отражена графически (Рис. 2).

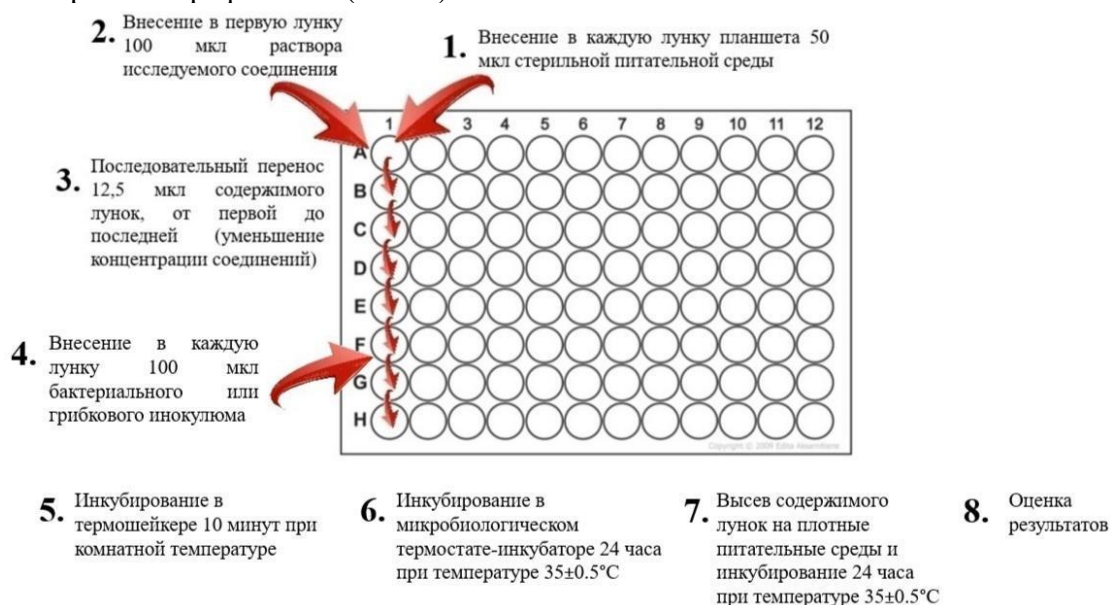


Рис. 2 «Методика исследования противомикробной активности соединений»

Для работы были использованы: ПЦР– амплификатор «ДТпрайм» («ДНК–Технология», Россия), термостат (Randox Inc., Великобритания), денситометр DensiCHEK (BioMerieux, Франция), микробиологический термостат– инкубатор Heratherm IMH60 (ThermoScientific, США), автоматические дозаторы переменного объема Sartorius mLine pipette 100– 1000 мкл, 1– 10 мл (Sartorius, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования антибактериальной и противогрибковой активности синтезированных бензофеназинов выражены ниже (Таблица 1).

Таблица 1

Противомикробная активность исследованных соединений

Культура микроорганизмов	Коды соединений и минимальные подавляющие концентрации (мг/мл)			
	VN– 13	VN– 16– 3	VN– 11	VN– 35– 3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Не выявлена активность	Не выявлена активность	Не выявлена активность	Не выявлена активность
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3.35	4.37	3.83	4.37
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	3.83	Не выявлена активность	Не выявлена активность	Не выявлена активность
<i>Candida albicans</i>	4.37	Не выявлена активность	Не выявлена активность	Не выявлена активность
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Не выявлена активность	Не выявлена активность	Не выявлена активность	Не выявлена активность
MRSA (methicillin–resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)	3.83	Не выявлена активность	Не выявлена активность	Не выявлена активность
VRE (vancomycin–resistant <i>Enterococcus</i>)	3.83	Не выявлена активность	Не выявлена активность	Не выявлена активность
CRAB (carbapenem–resistant <i>Acinetobacter baumannii</i>)	4.37	Не выявлена активность	Не выявлена активность	Не выявлена активность

Примечание: *различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$)

Надо прописывать результаты в таком ключе:

Для оценки антибактериальной активности и размышления о фармакодинамике соединений в отношении резистентных штаммов было проведено исследование клинических

и музейных штаммов на предмет наличие генов резистентности, посредством методом ПЦР–РВ. вВ геноме MRSA (methicillin– resistant *Staphylococcus aureus*) обнаружен ген mecA, в геноме VRE (vancomycin– resistant *Enterococcus*) – ген vanA, в геноме CRAB (carbapenem– resistant *Acinetobacter baumannii*) – гены bla(OXA– 40) и bla(OXA– 51).

В результате, все исследованные соединения продемонстрировали антибактериальную активность в отношении *Streptococcus agalactiae*. В отношении других испытуемых штаммов, включая резистентные, только соединение VN– 13 (незамещенный бензо[а]феназин– 5– ол) показало активность, исключение, впрочем составили *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* ATCC 25922. Прочие тестируемые соединения не показали антибактериальной или антимикотической активности в отношении исследованных штаммов.

ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам проведенных исследований значимые результаты показал незамещенный бензо[а]феназин– 5– ол в отношении ряда культур микроорганизмов, в отличие от других соединений, активность которых была отмечена только в отношении вида *Streptococcus agalactiae*, что может свидетельствовать о важности гидроксильной группы в молекуле феназинового гетероцикла, как фармакофорного участка. Представляет особый интерес действие незамещенного бензо[а]феназин– 5– ола в отношении клинических полирезистентных штаммов MRSA (methicillin– resistant *Staphylococcus aureus*), VRE (vancomycin– resistant *Enterococcus*) и CRAB (carbapenem– resistant *Acinetobacter baumannii*) с имеющимися у них генами резистентности к антибиотикам. Эффективность незамещенного бензо[а]феназин– 5– ола в данном случае может быть связана с тем, что его структура полностью отличается от структуры бета– лактамных и гликопептидных антибиотиков и имеет другие фармакофорные участки, потому механизмы резистентности не противодействуют конформационному связыванию незамещенного бензо[а]феназин– 5– ола с сайтами на поверхности бактериальной клетки, не способствуют формированию альтернативного субстрата для синтеза пептидогликана (в случае VRE и MRSA), а также не инактивируют молекулу бензо[а]феназин– 5– ола, однако, эти суждения необходимо подтверждать дополнительными исследованиями. Таким образом, незамещенный бензо[а]феназин– 5– ол представляет интерес, как потенциальный кандидат в антибактериальные и противогрибковые средства. В дальнейшем планируется укрепление его противомикробного потенциала более широкой выборкой бактериальных и грибковых культур и исследованием его дозозависимого эффекта. Остальные производные бензофеназина, попавшие в данное исследование, будут оценены с точки зрения взаимодействия структура– активность, а также будут исследованы в отношении других биологических мишеней.

ВЫВОДЫ

1. Незамещенный бензо[а]феназин– 5– ол представляет особый интерес, как потенциальный кандидат в антибактериальные и противогрибковые средства. В дальнейшем планируется укрепление его противомикробного потенциала более широкой выборкой бактериальных и грибковых культур и исследованием его дозозависимого эффекта.

2. Остальные производные бензофеназина, попавшие в данное исследование, будут оценены с точки зрения взаимодействия структура– активность, а также будут исследованы в отношении других биологических мишеней.

Альтернативные выводы

Незамещенный бензо[а]феназин– 5– ол продемонстрировал антибактериальную и антимикотическую активность в отношении *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213и (перечислить)... , *Candida albicans*, MRSA (methicillin– resistant *Staphylococcus aureus*), VRE (vancomycin– resistant *Enterococcus*), CRAB (carbapenem– resistant *Acinetobacter baumannii*), исключением стали *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* ATCC 25922, что позволяет рассматривать данное соединение как потенциальный кандидат в антимикробные средства.

Streptococcus agalactiae оказался единственным микроорганизмом, восприимчивым ко всем исследованным производным бензофеназина.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance от 17.05.2024 г. – URL: <https://www.who.int/publications/i/item/978924009346> / (дата обращения: 04.02.2025). Текст: электронный.
2. Design, synthesis, antimicrobial, antibiofilm evaluation and Z/E- isomerization of novel 6- ((arylamino)methylene)benzo[a]phenazin- 5(6H)- ones induced by organic solvent / A. Olyaei, N. Ghaleghovandi, F. Moghadami [et al.] // RSC Adv. – 2023. – Vol. 13. – № 42. – P. 29393– 29400.
2. Identification and characterisation of colistin- resistant *Acinetobacter colistiniresistens* co- producing IMP- 1 and OXA- 58 carbapenemases / S. Nishida, Y. Ono // New Microbes New Infect. – 2024. – Vol. 62. – Article №101484.
3. A multiplex real- time PCR for the direct, fast, economic and simultaneous detection of the carbapenemase genes blaKPC, blaNDM, blaVIM and blaOXA- 48 / D. Weiß, I. Engelmann, S. D. Braun [et al.] // J Microbiol Methods. – 2017. – № 142. – P. 20 – 26.
4. Antibacterial effect and mechanisms of action of forsythoside B, alone and in combination with antibiotics, against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* / Z. Shi, J. Zhang, Y. Wang [et al.] // Phytomedicine. – 2024. – Vol. 135. – Article № 156038.
5. Sulfonamide tethered 1,4- disubstituted 1,2,3- triazoles: Synthesis and antibacterial evaluation / J. Yadav, J., & C. P. Kaushik // Synthetic Communications. – 2024. – Vol. 54, № 7. – P. 536 – 552.
66. Synthesis of a di- O- acylated deoxynojirimycin (DNJ) derivative and evaluation of its antibacterial and antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* and *Stenotrophomonas maltophilia* / A. Esposito, D. D'Alonzo, M. Stabile [et al.] // Carbohydrate Research. – 2025. – Vol. 550. – Article №109379.
7. ГОСТ Р ИСО 20776– 2022. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам : национальный стандарт Российской Федерации : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 ноября 2022 г. N 1266– ст : взамен ГОСТ Р ИСО 20776– 1– 2010 : дата введения 2023– 10– 01. – Москва, 2023. – 24 с.

Сведения об авторах

В.В. Надточий* – аспирант

А.М.К. Алтоби – аспирант

П.Г. Аминева – врач– медицинский микробиолог

И.Л. Никонов – кандидат химических наук, старший научный сотрудник

Г.В. Зырянов – доктор химических наук, профессор РАН, профессор

Е.С. Ворошилина – доктор медицинских наук, профессор

Information about the authors

V.V. Nadtochiy – Postgraduate Student

A.M.K. Altobee – Postgraduate Student

P.G. Amineva – Medical Microbiologist

I.L. Nikonov – Candidate of Sciences (Chemistry), Leading Researcher

G.V. Zyryanov – Doctor of Sciences (Chemistry), Professor of Russian Academy of Sciences, Professor

E.S. Voroshilina – Doctor of Sciences (Medicine), Professor

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

nadtochiy– 99@mail.ru

УДК: 616– 093

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРНЫХ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ ОБРАЗЦОВ НА СОХРАННОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК

Нечаева Диана Мирзозоновна¹, Карякина Анастасия Евгеньевна¹, Симарзина Вероника Михайловна¹, Корнилов Даниил Олегович¹, Кейних Андрей Евгеньевич¹, Аминева Полина Геннаьевна^{1,2}, Ворошилина Екатерина Сергеевна^{1,3}, Зорников Данила Леонидович¹

¹Кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

²Лаборатория ООО «Кволити Мед»

³Медицинский центр «Гармония»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является высокочувствительным и специфичным методом лабораторной диагностики. Ключевым фактором для получения корректных результатов анализа является сохранность ДНК. Согласно инструкции от производителя наборов для выделения ДНК, хранение биоматериала при низких температурах может приводить к повреждению структуры нуклеиновой кислоты и, как следствие, искажению результатов. Однако, современные авторы ставят под вопрос необходимость соблюдения жестких температурных и временных ограничений. **Цель исследования** – оценить влияние температуры хранения и