

На правах рукописи

Рогачева Елизавета Владимировна

**АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ХИМИЧЕСКИХ
СОЕДИНЕНИЙ ПРИРОДНОГО И СИНТЕТИЧЕСКОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ
В ОТНОШЕНИИ БАКТЕРИЙ ГРУППЫ ESKAPE**

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в лаборатории медицинской бактериологии.

Научный руководитель: Краева Людмила Александровна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией медицинской бактериологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», профессор кафедры микробиологии ФГБВОУВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова».

Официальные оппоненты:

Миронов Андрей Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела микробиологии ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Царев Виктор Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Ростовский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 16 мая 2024г в 17 часов 30 мин на заседании диссертационного совета ПДС 0300.010 в ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства образования Российской Федерации по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (117198, г.Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6)

Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайтах
<https://www.rudn.ru/science/dissovet>
<http://vak.minobrnauki.gov.ru>

Автореферат разослан « » апреля 2024г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.010
кандидат медицинских наук, доцент

Подопригора Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Проблема антибиотикорезистентности стала особенно актуальной в XXI веке. Устойчивость к антибиотикам прогнозируется как одна из самых больших угроз здоровью человека в будущем. Ежегодно в мире регистрируется около 700 тыс. смертей, обусловленных антибиотикорезистентными штаммами микроорганизмов. По расчетам британского исследования *Review on Antimicrobial Resistance*, если ситуация не изменится коренным образом, то смертность по этой причине может возрасти к 2050 г. до 10 млн человек в год [The Review on Antimicrobial Resistance: Tackling drug-resistant infections globally/Chaired by J. O'Neill. 2014]. При этом бактерии с высокой скоростью приобретают и используют механизмы резистентности к антибиотикам. Так, если их устойчивость к пенициллину развивалась в течение 20 лет использования препарата, к эритромицину – в течение 15 лет, то к фторхинолонам и цефалоспорином, даже пятого поколения, она появилась после первого года использования антибиотика [Antibiotic Resistance Threats In The United States 2019. *Centers for Disease Control and Prevention*. 2019 – DOI: 10.15620/cdc:82532].

Поэтому разработка новых антибиотиков в последние годы оказалась затруднительной. Если в 1980-1985 гг. было предложено 15 новых антибиотиков, то в последующие годы количество зарегистрированных препаратов уменьшалось каждые 5 лет в 2 раза и закончилось разработкой всего 1 препарата в 2015 году.

В 2017 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) опубликовала список самых устойчивых к антибиотикам «приоритетных патогенов», представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека и для борьбы с которыми срочно требуется создание новых антибиотиков. Это группа ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*. Они часто обладают множественной устойчивостью к антибиотикам. По некоторым данным доля резистентных штаммов может достигать 95%, а то и 100%. По данным AMRmap – Российской онлайн платформы анализа данных резистентности к антимикробным препаратам, представители группы ESKAPE входят в пятерку самых распространенных возбудителей нозокомиальных инфекций в России, Северо-Западном регионе России и Санкт-Петербурге (Dessinioti S., 2017). А резистентность российских штаммов бактерий группы ESKAPE является одной из самых высоких в мире. По данным постоянно обновляемого регистра CDDEP – американского центра по слежению за динамикой заболеваемости, по этому показателю Россия входит в тройку «лидеров» наряду с Индией и странами Южной Африки (Amusan A.A., 2016; Chen J., 2020; Fahim H., 2014).

В этой связи Международный Координационный Совет по антибиотикорезистентности в своем обращении к Генеральному Секретарю ООН в апреле 2019 г. представил ситуацию в мире об угрозе, связанной с резистентностью микробов к антибиотикам и предложил несколько путей решения этой проблемы, одним из которых является разработка новых средств лечения, эффективных против инфекций с множественной лекарственной устойчивостью.

Степень разработанности темы исследования.

Существует несколько подходов к получению новых антибактериальных лекарственных средств: *сплошной и направленный скрининг веществ*, вновь синтезированных или выделенных из природных источников; *анализ генома патогенных бактерий* с целью выявления потенциальных мишеней для антибиотиков, а также анализ

генома и вторичных метаболитов продуцентов антибиотиков. Скрининг веществ, вновь синтезированных или выделенных из природных источников, широко используется, в том числе и российскими учеными. Сплошной скрининг, хотя и является очень трудоемким, имеет ряд преимуществ: возможность изучения широкого круга соединений, простота используемых методик, возможность быстрого получения результата. Вторым подходом является направленный скрининг – поиск химически стабильных молекул, называемых «соединениями-лидерами», которые могут быть синтезированы и должны обладать требуемой активностью. Для направленного скрининга используются такие методы, как ядерный магнитный резонанс, фармакофорный анализ и виртуальный скрининг с использованием различных компьютерных технологий (Chen J., 2020).

Анализ генома патогенных бактерий позволяет выявить потенциальные мишени для антибиотиков. В мире определены 160 наиболее важных белков, блокирование которых вызывает гибель бактериальной клетки. Таким образом, получена информация, необходимая для проведения направленного синтеза веществ с антибактериальным действием (Dotsenko V.V., 2023).

Известен целый ряд веществ с антибактериальным действием: природного происхождения (растительные, животные, минеральные, микробные), синтетического происхождения (большинство антибиотиков) (Cassini A., 2019). Однако многие из них оказались уже малоэффективными для борьбы с нозокомиальными штаммами группы ESKAPE, как большинство антибиотиков, или дорогими, со сложной технологией получения и высокой токсичностью, как многие пептиды. Поэтому для решения глобальной проблемы антибиотикорезистентности бактерий необходима разработка новых соединений антибактериальной направленности (преантибиотиков).

Цель исследования: изучить антибактериальные свойства новых синтезированных химических соединений природного и синтетического происхождения в отношении бактерий группы ESKAPE.

Задачи исследования:

1. Изучить фенотипические и генотипические маркеры антибиотикорезистентности бактерий группы ESKAPE, выделенных при различных инфекционных процессах.
2. Исследовать антибактериальную активность различных групп химических соединений в отношении штаммов бактерий группы ESKAPE.
3. Изучить возможность потенцирующего действия сульфонамидов с препаратами группы карбапенемов в отношении бактерий группы ESKAPE.
4. Исследовать антибактериальное действие соединений-лидеров *in vivo* в модельных опытах на лабораторных животных.

Научная новизна исследования

- Впервые выявлены антибактериальные свойства нановолокон на основе куркумина и гиалуроновой кислоты в отношении бактерий группы ESKAPE (МИК 90 мг/мл).
- Установлено снижение количества бактерий *S. aureus* в $1 \cdot 10^5$ раз под воздействием комплекса «титан (Ti) и серебро (Ag)».
- Определена антибактериальная активность азиринов из группы полусинтетического и синтетического происхождения (МИК для *S. aureus* 4,5 мкг/мл, МИК для *P. aeruginosa* и *E. aerogenes* – 9 мкг/мл).
- Определен механизм биоцидной активности сплава Cu-Zn, полученного путем сонохимической обработки, основанный на комплексе факторов, воздействующих на бактериальную клетку.

- Изучено потенцирование действия меропенема в отношении бактерий группы ESKAPE с помощью синтезированных соединений сульфонамидов со снижением МИК в 66 и 133 раза.
- Показано антибактериальное действие соединений-лидеров на модели экспериментальных животных.

Теоретическая и практическая значимость исследования:

- Выявление соединений-лидеров в группах растительной, минеральной природы и искусственно синтезированных с описанным механизмом антибактериального действия расширяет представление о возможностях конструирования новых образцов для борьбы с возбудителями нозокомиальных инфекций.
- Доказанная экспериментальным путем эффективность синергетического антибактериального действия новых химических соединений и официальных антибиотиков позволит разработать комплексный лекарственный препарат с низкой концентрацией ингредиентов и антибактериальной эффективностью.
- В опытах *in vitro* и *in vivo* определены действующие концентрации соединений-лидеров из разных групп (растительной, минеральной природы и искусственно синтезированных), которые могут быть использованы при проведении доклинических испытаний полученных соединений.

Методология и методы исследования:

Методологическая основа диссертационного исследования была спланирована на основании поставленной цели и включает применение методов научного познания с целью решения поставленных задач. Применялись следующие методы исследования: классические бактериологические, молекулярно-генетические, масс-спектрометрические, фенотипические методы определения устойчивости к антибиотикам согласно МУК 4.12.1890-04, Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к antimикробным препаратам» (2021), рекомендациям EUCAST (версия 13.0).

Организация и проведение диссертационного исследования одобрены Локальным Комитетом по этике ФБУН НИИЭМ имени Пастера Роспотребнадзора (выписка из протокола заседания № 57 от 24.12.2019 г.).

Положения, выносимые на защиту:

1. Среди выделенных штаммов бактерий группы ESKAPE 55% имеют выраженный гено-и фенотип резистентности к антибиотикам различных классов. В то же время они поддаются антибактериальному воздействию синтезированных соединений на основе растительных комплексов, минералов и синтезированных искусственным путем химических соединений. Наилучшим антибактериальным эффектом обладают соединения катионного типа с низкой молекулярной массой на основе 2*H*-азирин-2-карбоновых кислот. МИК этих соединений соответствует МИК антибиотиков, используемых в медицинской практике, к которым развилась резистентность бактерий группы ESKAPE.
2. Явление синергизма между синтезированными соединениями и официальными антибиотиками с утраченной эффективностью позволяет конструировать комплексы с высокой антибактериальной активностью.
3. Результаты исследований *in vivo* антибактериального действия соединения из группы 2*H*-азирин-2-карбоновых кислот могут быть использованы при

программируемом синтезе антибактериальных соединений, а сам препарат может быть передан для дальнейших доклинических испытаний.

Личный вклад автора:

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии во всех этапах выполнения диссертационного исследования: изучении литературы по теме исследования, написании плана работы, постановке экспериментов, исследовании проб и выделенных штаммов, анализе полученных результатов, написании публикаций, подготовки докладов, патентов, баз данных, оформлении диссертации.

Молекулярно-генетические исследования проведены совместно с Полевым Д.Е. – руководителем группы метагеномных исследований и Саитовой А.Т. – лаборантом-исследователем группы метагеномных исследований ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

Апробация результатов исследования:

Материалы и основные положения диссертации доложены и обсуждены на 5 Российских, в том числе с международным участием, и 3 зарубежных научно-практических конференциях.

Внедрение результатов исследования в практику:

- Создана рабочая коллекция штаммов бактерий группы ESKAPE (120 шт.), охарактеризованная по их отношению к антибиотикам выбора для этиотропной терапии инфекционного процесса, вызванного каждым представителем группы.
- Созданы и зарегистрированы базы данных: База данных резистентных к антибиотикам фенотипов бактерий группы ESKAPE (№2021621695), База данных чувствительных к антибиотикам фенотипов бактерий группы ESKAPE (№ 2021 622085), База данных фенотипа чувствительности к антибиотикам и бактериофагам и генотипа антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных при нозокомиальных инфекциях (№ 2023621897), База данных генотипа и фенотипа вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от больных COVID-19 (№ 2023621900).
- Разработан дизайн исследования антибактериальных свойств соединений растительной, минеральной природы и искусственно синтезированных, который может быть использован для оценки других разрабатываемых групп соединений антибактериального назначения.
- Полученные данные могут использоваться в процессе преподавания биологии, микробиологии и фармакологии в соответствующих высших учебных заведениях, на курсах повышения квалификации врачей, при проведении научно-практических семинаров.

Степень достоверности результатов исследования:

Достоверность полученных результатов исследования определяется достаточным объемом проведенных наблюдений, репрезентативностью материала. Дизайн исследования, анализ данных, статистическая обработка результатов соответствуют требованиям, цели и задачам исследования. Основные положения работы, выводы и практические рекомендации аргументированы с позиций доказательной медицины, логически вытекают из результатов исследований и подтверждены фактическим материалом. Достоверность полученных результатов и выводов обеспечена использованием адекватных методов исследования, методик проведения расчетов, достаточным объемом анализируемых материалов, апробацией

результатов и положений в рецензируемых журналах.

Соответствие паспорту специальности:

Диссертационное исследование, включающее вопросы изучения антибактериальных свойств различных химических соединений, соответствует паспорту специальности 1.5.11. Микробиология (Биологические науки). Результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 1, 2, 3, 6, 7 паспорта специальности.

Публикации результатов исследования:

По материалам диссертационной работы опубликовано 24 научных работы, из них 2 статьи – в научных рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК, 22 – в изданиях, входящих в библиографические базы данных Scopus и Web of Science.

Объем и структура диссертации:

Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав (обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования и обсуждения полученных результатов), выводов, практических рекомендаций, списка литературы, приложений. Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста, иллюстрирована 26 таблицами, 8 рисунками. Список литературы содержит 8 отечественных и 232 зарубежных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на базе Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера с 2019 по 2023 гг.

Бактериальные штаммы

В качестве контрольных объектов использовали типовые коллекционные штаммы микроорганизмов, полученные в Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection). Использование эталонных штаммов проводилось в рамках первичного скрининга химических соединений в отношении антимикробного действия диско-диффузионным и капельным методами.

Также в работе использованы клинические изоляты бактерий группы ESCAPE, выделенные из биологического материала больных в различных медицинских учреждениях г. Санкт-Петербурга. За период выполнения работы было собрано 119 единиц биологического материала от амбулаторных и стационарных больных в рамках рутинных микробиологических исследований (29 образцов мокроты, 8 образцов крови, 11 – мочи, 19 мазков из зева, 14 – из носа, 6 – из наружного слухового прохода, 7 – из женского уrogenитального тракта, 4 – из мужского уrogenитального тракта, 21 образец раневого отделяемого). Сбор биоматериала проводился на базе следующих учреждений: НИИЭМ им. Пастера (18 объектов), НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе (17 объектов), Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова (11 объектов), Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина (26 объектов), Городская больница № 14 (22 объекта), СЗГМУ им. И.И. Мечникова (14 объектов), Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова (11 объектов). Работа со штаммами осуществлялась согласно следующим нормативным документам: СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Таблица 1

Материалы и объем проведенных исследований

Род бактерий	Источник получения штаммов	Количество полученных штаммов	Количество проведенных исследований с антибиотиками	Количество проведенных исследований химическими соединениями
<i>Enterobacter cloacae</i>	АТСС 13047	1	2	250
	клинические штаммы	19	570	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	АТСС 29213	1	2	250
	клинические штаммы	20	600	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	АТСС 13883	1	2	250
	клинические штаммы	20	600	18
<i>Acinetobacter baumannii</i>	АТСС 19606	1	2	250
	клинические штаммы	20	600	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	АТСС 27853	1	2	250
	клинические штаммы	20	600	9
<i>Enterococcus faecalis</i>	АТСС 29212	1	2	250
	клинические штаммы	20	600	9
Итого проведено исследований			3582	1572

Для выполнения работы была разработана схема проведения исследования.

Дизайн исследования



Рисунок 1 - Дизайн исследования

Вещества с потенциальным антибактериальным действием

Химические соединения для исследований получены из ряда научно-исследовательских и научно-образовательных учреждений РФ (таб. 2). В данной работе исследовано 250 соединений из 20 групп различного происхождения (природные, минеральные, синтетические) в 1572 экспериментах, 18 из которых являлись соединениями-лидерами и были отобраны для дальнейшей оптимизации, 1 вещество рекомендовано для исследований *in vivo* на биологических моделях.

Таблица 2

Химические соединения, использованные в исследованиях

Учреждение	Группа веществ	Количество соединений
Соединения на растительной основе		
Центр химической инженерии Национального университета ИТМО	Нановолокна на основе куркумина и гиалуроновой кислоты	8
Соединения на основе минералов		
Национальном университете ИТМО (Санкт-Петербург)	Соединения кремния (Si) и селена (Se)	5
Санкт-Петербургский государственный университет	Соединения титана (Ti) и серебра (Ag)	5
Национальный университет ИТМО	Биоцидная латунь	5
Синтетические образцы		
Санкт-Петербургский государственный университет	Триазолы	9
Санкт-Петербургский государственный университет	Спироциклические аналоги нитрофуранов	12
Санкт-Петербургский государственный университет	Азирины	20
Санкт-Петербургский государственный университет	Аминоиндолы	12
Санкт-Петербургский государственный университет	Пиримидины	38 (19 + 19)
ЦТФТ им. М.В. Дорогова	Производные 5-амино-1,2,4-тидазола	28
МГУ	Производные ципрофлоксацина	36
Санкт-Петербургский государственный университет	Нитрофураны	13

МГУ	Пиперидины с уреанами	20
-----	-----------------------	----

Результаты исследования и их обсуждение

Чувствительность выделенных штаммов к антибиотикам

По результатам предварительного изучения изолятов были отобраны 120 штаммов бактерий группы ESKAPE для изучения профиля антибиотикочувствительности, а также для изучения чувствительности к новым антимикробным препаратам.

В результате исследования чувствительности бактерий к антибиотикам все изоляты были разделены на 2 группы: 1) проявили чувствительность не менее, чем к 80% антибиотикам (чувствительные) и 2) имели устойчивость к 91% препаратов и более (резистентные). Обе группы были охарактеризованы и представлены в виде Баз данных Чувствительных (S) штаммов и Резистентных (R) по 60 представителей в каждой. Базы данных включали в себя следующие характеристики: номер штамма в рабочей коллекции; пол, возраст человека, от которого был выделен; исследованный биологический материал; дата выделения; питательная среда, на которой выращивали бактерии; вид микроорганизма после масс-спектрометрического исследования; результаты определения чувствительности к антибиотикам диско-диффузионным методом и МИК.

Обе Базы данных зарегистрированы в Федеральной службе по интеллектуальной собственности: RU № 2021621695 и RU № 2021621613.

Индекс множественной лекарственной устойчивости (multi-antibiotic resistance, MAR) рассчитывали, используя формулу $MAR = a/b$, где a – количество антибиотиков, к которым штамм проявляет устойчивость, b – общее количество использованных антибиотиков [Furtula et al., 2013].

В результате полногеномного секвенирования ДНК 52 штаммов представителей бактерий группы ESKAPE было установлено:

–Геном штаммов *S. aureus* (27) из группы резистентных включал в себя 10 генов резистентности: *blaZ*, *erm(C)*, *cat(pC221)*, *aac(6')-aph(2'')*, *mecA*, *tet(K)*, *erm(T)*, *vga(C)*, *vga(E)*, *amp(A)*.

–Геном штаммов *K. pneumoniae* (25) из группы резистентных включал в себя следующие гены (37) резистентности: *armA*, *aadA1*, *aac(6')-lb3*, *aph(3')-VI*, *blaSHV-182*, *blaNDM-1*, *blaOXA-9*, *blaCTX-M-15*, *blaOXA-1*, *blaTEM-1A*, *fosA*, *msr(E)*, *mph(E)*, *mph(A)*, *catA1*, *catB3*, *OqxB*, *OqxA*, *qnrS1*, *sul2*, *sul1*, *tet(A)*, *dfrA1*, *dfrA5*, *rmtF*, *aac(6')-Ib-Hangzhou*, *blaSHV-89*, *blaSHV-85*, *blaSHV-79*, *blaSHV-56*, *blaSHV-40*, *blaSHV-182*, *blaDHA-24*, *blaDHA-7*, *catA2*, *qnrB9*, *dfrA14*.

Исследование антибактериального действия различных групп химических соединений в отношении штаммов бактерий группы ESKAPE

Вещества растительного происхождения.

Нановолокна на основе куркумина и гиалуроновой кислоты

Исследование волокон проводили на основе нативной гиалуроновой кислоты, куркумина и усниновой кислоты со средним диаметром 298 нм. Нановолокна проявили антибактериальную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий группы ESKAPE, преимущественно подавив рост 4 из 6 видов микроорганизмов (таб. 3).

Таблица 3

МИК нановолокон куркумина по отношению к штаммам группы ESKAPE

Образец

Изоляты

	<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
HA_15п	360 (3×)	90 (2×), 180	180, (2×)	360 180, (2×)	360 90, (2×)	180 90 (3×)
HA_15	90 (3×)	90 (3×)	180, (2×)	360 180, (2×)	360 180, (2×)	360 90 (3×)
HA_5п	90 (3×)	90 (3×)	180, (2×)	360 180, (2×)	360 180, (2×)	360 90 (3×)
HA_5	90 (3×)	90 (2×), 180	180, (2×)	360 180, (2×)	360 90, (2×)	180 90 (3×)
К- 20% ДМСО	-	-	-	-	-	-
Медиана	360	90	360	360	180	90

Примечание: приписка “п” означает наличие подложки “Spunlace”

По результатам исследований было выявлено, что присутствие небольших количеств диметилсульфоксида в волокнистых материалах придало им антисептическое действие. Исследование волокон на основе чистой гиалуроновой кислоты без дополнительных полимеров и с активными фармацевтическими ингредиентами послужило основой для разработки высокоэффективных повязок на раны и новых каркасов для доставки лекарств.

Соединения на основе минералов Соединения кремния (Si) и селена (Se)

Соединения, содержащие наночастицы кремния и селена, были синтезированы в Национальном университете ИТМО (Санкт-Петербург). Препараты представляют собой коллоидные растворы, содержащие различные концентрации наночастиц кремния, и растворы, содержащие различные концентрации наночастиц селена (рис. 2).

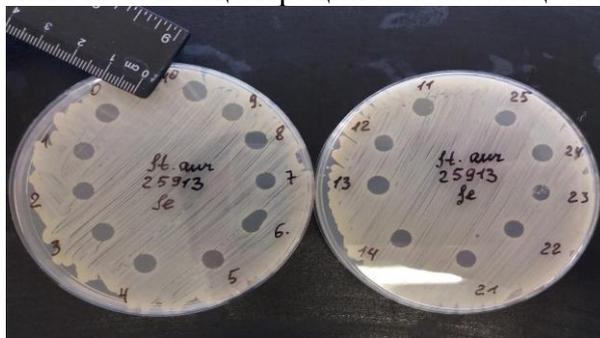


Рисунок 2 – Результаты скрининга антибактериальной активности селена в отношении референтного штамма *S. aureus* ATCC 29213

По результатам наших исследований мы выявили, что присутствие небольших количеств минералов в растворах показало антибактериальный эффект в отношении бактерий группы ESKAPE. Исследование наночастиц с содержанием металлов в разных временных интервалах заложило для нас основу по исследованию лучшего времени активации препаратов. Так, с увеличением времени контакта бактерий и частиц растворов улучшался антибактериальный эффект. Поэтому коллоидные растворы на основе наночастиц селена и кремния могут в перспективе быть использованы для наружного применения или в качестве ополаскивателей.

Соединения титана (Ti) и серебра (Ag)

Для изучения антибактериальных свойств *in vitro* были подготовлены следующие четыре типа образцов:

- полированный титан (Ti);
- титан с ALD серебряными NPs (Ti-Ag);
- титан с ALD нанопокрывтием из оксида титана (Ti-TiO₂);
- титан с ALD нанопокрывтиями оксида титана и серебряных НП (Ti-TiO₂-Ag).

Оценка антибактериальных свойств проводилась в соответствии со стандартом ISO 22196:2011 (измерение антибактериальной активности на пластмассах и других непористых поверхностях). Анализ проводился согласно схеме 3.

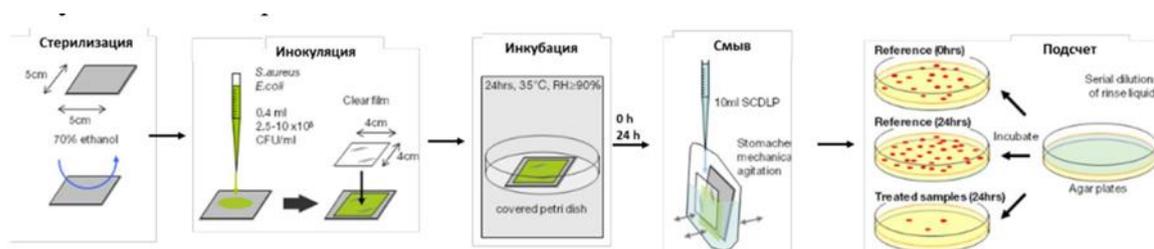


Рисунок 3 – Схема постановки эксперимента с титановыми пластинами

Значительная бактерицидная способность была обнаружена для образцов со слоем TiO₂, который снижал исходное количество КОЕ на 4-5 порядков. Образцы Ti-Ag с серебряными наночастицами показали более высокую антибактериальную активность. В то же время образцы серии Ti-TiO₂-Ag продемонстрировали наилучшую антибактериальную активность против *S. aureus* ATCC 29213, который является одной из основных причин отторжения ортопедических имплантатов. Поэтому материал с комбинацией покрытий TiO₂ и Ag имеет большие перспективы для предотвращения бактериальной адгезии и образования биопленки, которая может стать причиной инфекции, связанной с ортопедическими имплантатами после операции.

Биоцидная латунь (Cu-Zn)

Сплав Cu-Zn был разработан и изготовлен на базе Национального университета ИТМО. Для этого 5 г сплава Cu-Zn были рассеяны в 100 мл 0,5 М NaOH. Раствор был сонирован с использованием ультразвуковой системы UIP1000hd (Hielscher Ultrasonics, Германия) в течение 30 минут и различной амплитудой 30%, 70%, 90% А. Образцы сонировали с амплитудой 30 ÷ 90%, что соответствует интенсивности 52 ÷ 200 Вт см⁻². После этого порошок Cu-Zn был разделен на две фракции (серую и желтую). Все образцы трижды промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе при температуре 120 °С в течение 24 часов. Морфология образцов изучалась с помощью полевого сканирующего электронного микроскопа.

Биоцидная активность модифицированных частиц изучалась с использованием культуры бактерий *Escherichia coli* ATCC 25922 (рис. 4).

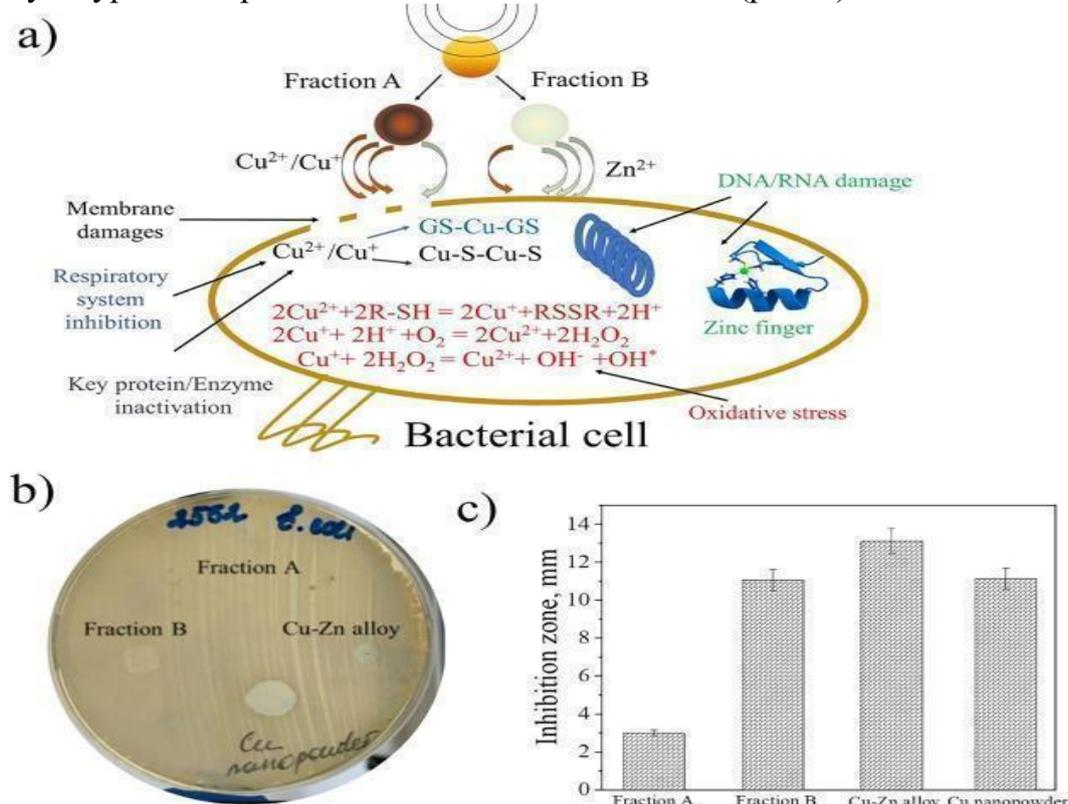


Рисунок 4 – Результаты антибактериальной активности биоцидной латуни.

а) Предполагаемые механизмы, участвующие в уничтожении бактерий: прямое разрушение мембраны $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$; взаимодействие между ионами меди и глутатионом в анаэробных условиях и смещение железа из железо-серных кластеров, генерация реактивных видов кислорода путем формирования перекиси водорода в присутствии $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$, инактивация ключевых белков/ферментов, среди которых участвуют в дыхательной системе, а также повреждения РНК и ДНК. б) Биоцидная активность наноструктурированного сплава Cu-Zn (образец 2) была оценена с использованием *E. coli* ATCC 25922. в) Диаметр зоны ингибирования частиц Cu-Zn.

Таким образом, в настоящем исследовании мы продемонстрировали концепцию изготовления материалов с градиентной биоцидной активностью. Антибактериальный механизм сплава Cu-Zn может быть легко изменен путем сонохимической обработки с образованием фракций. В свою очередь, такой сплав может быть использован при изготовлении имплантантов и частей медицинского оборудования.

Вещества полусинтетического и синтетического происхождения

Нитрофураны

Спироциклические аналоги нитрофуранов (12 соединений) были синтезированы в Санкт-Петербургском государственном университете. Пять соединений (9a-b, 9d, 10d и 10e), показавших самые низкие значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК), были проанализированы на предмет критических характеристик, определяющих лекарственную привлекательность и перспективы достаточно высокой пероральной биодоступности. Наибольшая антибактериальная активность была отмечена против трех патогенов ESKAPE (*S. aureus* ATCC 29213, *A. baumannii* ATCC 19606 и *E. cloacae* ATCC

13047), хотя она была ниже, чем активность ципрофлоксацина (использованного в качестве положительного контроля) (таб. 4).

Таблица 4

Результаты первичного скрининга соединения-лидера из кандидатов среди спироциклических аналогов нитрофуранов.

Вещество	<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 29212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13047
9d	0	15	0	25	0	19
Ципрофлоксацин	25	27	26	31	25	26

Учитывая низкую площадь полярной поверхности у изученных соединений, можно сказать, что они являются перспективными соединениями в плане их высокой способности к проникновению внутрь бактериальной клетки.

Азирины

Соединения из группы азиринов были синтезированы в Санкт-Петербургском государственном университете на кафедре органической химии. Антимикробная активность соединений 3a, b, d-g, i, k-n, p в отношении возбудителей группы ESKAPE, оцененная путем определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК).

Таблица 5

Антимикробная активность соединений азиринов по отношению к возбудителям группы ESKAPE (МИК).

Соединение	<i>E. faecium</i> ATCC 29212	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13047
3a	9	9	37	75	9	9
3b	9	9	37	150	150	150
3d	75	4,5	18	150	150	75
3e	37	9	18	150	150	150
3f	75	18	37	150	75	150
3g	150	75	37	37	37	150
3i	18	18	37	75	75	150
3k	>150	150	150	75	150	150
3l	18	75	37	150	75	75
3m	>150	150	150	37	9	>150
3n	150	150	150	37	150	150
3p	75	150	75	150	>150	75
Сульфаметоксазол	4	16	16	32	8	8

^a Значения МИК указаны в мкг/мл

Таким образом, некоторые соединения из группы азиринов проявляют высокую антибактериальную активность в отношении патогенов группы ESKAPE, сравнимую с таковой для применяющегося препарата сульфаметоксазола. Некоторые полученные

соединения ингибируют рост *S. aureus* в концентрациях даже более низких, чем сульфаметоксазол.

Аминоиндолы

Антибактериальные соединения из группы аминоиндолов в количестве 12 штук синтезированы в Санкт-Петербургском государственном университете.

Таблица 6

Минимальные ингибирующие концентрации лидирующих соединений из группы аминоиндолов против бактерий группы ESKAPE (мкг/мл)

Соединение	<i>E. faecium</i> ATCC 29212	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13047
2a	150	75	150	75	75	32
2b	75	16	75	150	150	>150
2d	150	150	>150	8	8	>150
2e	16	16	150	75	150	150
Ципрофлоксацин	250	5	6.3	62.5	3.1	0.04

Проведенные эксперименты показали, что выбранные нитрофураны (2a-b и 2d-e) обладают селективной антибактериальной активностью против отдельных микроорганизмов, принадлежащих к панели патогенов ESKAPE, т.е. двух грамположительных и четырех грамотрицательных бактерий, наиболее склонных к развитию лекарственной устойчивости.

Пиримидины

Азотные гетероароматические соединения, содержащие биовоспроизводимую нитрогруппу, были синтезированы в Санкт-Петербургском государственном университете. Антибактериальная активность биоредукционных нитрогетероароматических соединений по отношению к конкретному бактериальному виду, среди прочих факторов, будет зависеть от их способности метаболически активироваться мембранным ферментом нитратредуктазы этого вида, а также от способности результирующего реактивного химического вещества пересекать бактериальную мембрану и повреждать ДНК патогена. Данные соединения продемонстрировали биоактивность, подавляя рост всех возбудителей ESKAPE (с разной интенсивностью), за исключением грамотрицательной *P. aeruginosa*.

Амидины. Производные 5-амино-1,2,4-тиадиазола

Соединения в количестве 28 образцов амидинов были синтезированы в отделе химической разработки ЦТФТ им. М.В. Дорогова. Наибольшая антибактериальная активность (МИК 0,09 мкг/мл) была обнаружена в отношении *E. faecium* ATCC 29212 (соединения 6a, 6c), *S. aureus* ATCC 29213 (соединение 6c) и *A. baumannii* ATCC 19606 (соединение 5ba). Эти соединения подавляли рост патогенов в концентрации значительно меньшей, чем контрольные антибиотики (стрептомицин и пefлоксацин). Анализ полученного набора данных показал, что антибактериальная активность в большей степени зависит от заместителей в арильном кольце в 3-положении 1,2,4-тиадиазола, чем

от заместителей в аминогруппе. Несмотря на необходимость дальнейшей оптимизации структуры, эти соединения являются перспективной отправной точкой для разработки новых антимикробных агентов.

Производные ципрофлоксацина

Соединения на основе ципрофлоксацина были синтезированы в Московском государственном университете. Антибактериальная активность соединений была чувствительна к структуре спироцикальной периферии. Соединения с их спироциклическим компонентом, превышающим пятичленный, не проявляли ингибирования роста бактерий в первоначальном тесте. Более компактная спироцикальная периферия привела к мощным антибактериальным препаратам с активностью против некоторых патогенов ESKAPE, которые были сопоставимы с ципрофлоксацином. Судя по широте спектра антибактериальной активности и его уровню, сопоставимому с уровнем ципрофлоксацина, соединение ба, которое несет азаспироктановую периферию, однозначно проявилось как активное соединение против пяти из шести патогенов (т.е. всех, кроме *P. aeruginosa*) панели ESKAPE.

В целом, новые производные ципрофлоксацина проявили выраженную активность в отношении двух из пяти штаммов: *Acinetobacter baumannii* и *Enterobacter cloacae*. В отношении этих двух штаммов большая группа соединений проявила равную или более высокую эффективность, чем ципрофлоксацин. Полученные результаты существенно расширяют возможности использования спироциклических веществ в дизайне лекарственных препаратов и подтверждают привилегированный характер спироциклов.

Нитрофураны

Соединения на основе нитрофуранов в количестве 13 образцов синтезированы в Санкт-Петербургском государственном университете. В результате проведенной работы был выделен новый антибактериальный агент N-циклогексил-2-(5-нитрофуран-2-ил)имидазо[1,2-а]пиридин-3-амин (соединение 4а), который показал активность против *E. cloacae* ATCC 13047, *S. aureus* ATCC 29213, *K. pneumoniae* ATCC 13883 и *E. faecalis* ATCC 29212 (МИК 0,25, 0,06, 0,25 и 0,25 мкг/мл, соответственно). Такая активность, а также практичность синтеза вещества из коммерчески доступных прекурсоров, безусловно, являются основанием для его дальнейшего доклинического изучения.

Пиперидины с уреанами

Соединения были синтезированы в Московском государственном университете. Восемь соединений (2а, 3а, в, 3g, 3i, 3l, 3о и 3q), которые ингибировали более одного штамма бактерий (табл. 7), были протестированы далее для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК, мг/мл). Активность восьми соединений была подтверждена значениями МИК в диапазоне от 19 до 150 мг/мл.

Хотя этот уровень антибактериальной активности ниже, чем у эталонного антибиотика широкого спектра действия ципрофлоксацина (МИК 0,3 мг/мл), специфическая антибактериальная активность, выявленная для до сих пор не описанного химического типа спироциклической мочевины, очевидна и будет предметом дальнейшей оптимизации у авторов соединений.

Синергизм препаратов с антибактериальными свойствами

Исследовано явление синергии между синтезированным соединением группы сульфонамидов и официальным антибиотиком из группы карбапенемов (меропенем). При совместном использовании синтезированных соединений удалось достигнуть снижения концентрации меропенема в 5-100 раз, а сульфонамидов в 2-4 раза в отношении всех референтных штаммов группы ESKAPE. Обнадеживающие результаты были получены в эксперименте со штаммами *K. pneumoniae* и *A. baumannii*, выделенными от

стационарных больных при нозокомиальных инфекциях, резистентными ко всем классам антибиотиков. В комбинации с соединениями сульфонамидов МИК меропенема снизилась до 0,3 мкг/мл, что соответствует критерию чувствительности к этому антибиотику. Подобная тенденция отмечена и для клинического штамма *A. baumannii*, который был резистентен к меропенему (МИК меропенема = 40 мкг/мл). В комбинации с соединениями МИК меропенема снизилась до 0,3 и 0,6 мкг/мл, что соответствует критерию чувствительности к этому антибиотику.

Таким образом, было установлено, что синтезированная группа соединений сульфонамидов проявляет синергизм с меропенемом. При этом удалось восстановить чувствительность штаммов, относящихся к наиболее актуальным видам возбудителей нозокомиальных инфекций: *K. pneumoniae* и *A. baumannii*.

Изучение антибактериального действия синтезированных соединений *in vivo* в модельных опытах на белых мышах

В качестве биологической модели использовали аутбредных белых мышей с острой формой экспериментального раневого клебсиеллёза, вызванного формированием раневой поверхности и заражением её сублетальными дозами возбудителя. Одновременно с заражением животным проводили курсы антибактериальной терапии антибактериальным веществом 3-фенил-2Н-азирин-2-карбоновой кислотой и антибиотиком сравнения.

На первом этапе исследований была изучена возможность воспроизведения на лабораторных животных острой формы локального инфекционного процесса при раневом заражении сублетальными дозами возбудителя клебсиеллёза. В этих условиях происходит быстрая и интенсивная диссеминация микробов, которые минуют естественные защитные барьеры и практически полностью попадают в органы, захватываясь тканевыми макрофагами. Кроме того, изучение активности химиопрепаратов в условиях быстро развивающейся остросептической формы экспериментального клебсиеллёза без формирования сенсбилизации организма позволяет осуществить количественную оценку непосредственно антимикробного действия антибиотиков без влияния на их активность других патогенетических механизмов заболевания.

Таблица 7

Результаты бактериологических посевов из раневой поверхности мышей (КОЕ *K. pneumoniae*/мл), \overline{XX}

День исследования	Контроль (без лечения)	Ко-тримоксазол	Соединение
1-й	1353	1426	1408
3-й	15650	1147	1225
5-й	23782	638	622
7-й	31180	305	327
9-й	20094	65	73
11-й	1218	0	0
13-й	325	0	0

Выводы

1. Изучены фенотипические и генотипические маркеры антибиотикорезистентности 120 штаммов бактерий группы ESKAPE, выделенных при различных инфекционных процессах. Наибольшим набором генов антибиотикорезистентности обладают штаммы *K. pneumoniae* (37 генов) и *S. aureus* (10 генов). Доля мультирезистентных штаммов среди бактерий *K. pneumoniae* составила 60%, среди бактерий *S. aureus* – 40%.
2. Наилучшие антибактериальные свойства в отношении бактерий группы ESKAPE выявлены среди веществ растительного происхождения у нановолокон на основе

куркумина и гиалуроновой кислоты (МИК 90 мг/мл), среди соединений на основе минералов – у комплекса «титан (Ti) и серебро (Ag)» (снижение количества бактерий *S. aureus* в $1 \cdot 10^5$ раз), среди веществ полусинтетического и синтетического происхождения – у азиринов (МИК для *S. aureus* 4,5 мкг/мл, МИК для *P. aeruginosa* и *E. aerogenes* – 9 мкг/мл).

3. Синтезированные соединения сульфонамидов потенцируют действие меропенема в отношении бактерий группы ESKAPE: в комбинации с соединениями сульфонамидов МИК меропенема для резистентного штамма *K. pneumoniae* снизилась с 20 мкг/мл до 0,3 мкг/мл, для резистентного штамма *A. baumannii* – с 40 мкг/мл до 0,3 мкг/мл, что соответствует критерию чувствительности к этому антибиотику.

4. В эксперименте на белых беспородных мышах доказана антибактериальная эффективность соединения 3-фенил-2Н-азиринов-2-карбоновой кислоты при лечении раневой инфекции, обусловленной штаммом *K. pneumoniae*: наблюдалось значительное снижение (в 40 раз) числа возбудителей в ране по сравнению с контролем, приводящее к полному заживлению ран на 4 дня раньше, чем в группе контроля.

Практические рекомендации

Полученная в ходе исследования информация позволяет на основе понимания изученных причинно-следственных связей предугадывать отношение выделенных бактерий к препаратам растительного, минерального или искусственного происхождения. Так, можно предположить, что при выделении резистентных к антибиотикам штаммов *S. aureus* с высокой долей вероятности будут эффективны препараты на основе серебра, экстракта пихты, депсипептидов. В отношении бактерий *K. pneumoniae* и *A. baumannii* можно ожидать антибактериальный эффект с использованием препаратов на основе куркумина и азиринов. Таким образом, полученные данные позволяют прогнозировать возможность применения альтернативных препаратов в случае выделения резистентных к антибиотикам штаммов бактерий.

Определение МИК у соединений-лидеров может быть использовано для назначения лечебной дозы соответствующих препаратов антимикробной направленности. Информация о спектре и уровне устойчивости бактерий группы ESKAPE должна служить основой для выбора рациональной схемы этиотропной терапии бактериальных инфекций, что позволит снизить риск развития устойчивости и возникновения новых механизмов резистентности.

Перспективы дальнейшей разработки темы

В связи с тем, что рассматриваемая тема исследования будет продолжать оставаться актуальной, следует пополнять имеющуюся коллекцию изолятов для дальнейшего мониторинга антибиотикорезистентности выделяемых штаммов с выявлением механизмов резистентности к антибактериальным препаратам. Также необходимо последующее изучение МИК в отношении конкретного препарата, исследование механизма действия вещества с целью его химической и медицинской оптимизации, а также отслеживания генотипической характеристики в отношении резистентности не только к известным антибиотикам, но и к новым препаратам. Полученная информация позволит конструировать антибактериальные препараты природного и/или синтетического происхождения с учетом их воздействия на локус, определяющий резистентность. Полученные оптимистичные результаты по использованию явления синергии между антибиотиком, утратившим свою эффективность в рекомендуемой дозировке, и синтезированным низкомолекулярным соединением нацеливают на продолжение исследований в этом направлении с другими препаратами. Все положительные результаты, полученные *in vitro* и подкрепленные на моделях

экспериментальных животных *in vivo*, после исследования на отсутствие цитотоксичности могут быть предложены для дальнейших клинических испытаний.

Аннотация диссертации
Рогачевой Елизаветы Владимировны
«Антибактериальные свойства новых химических соединений природного и синтетического происхождения в отношении бактерий группы ESKAPE»

Устойчивость бактерий к антибиотикам является одной из самых больших угроз здоровью человека и большой проблемой для медицинских работников. В 2017 г. всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) опубликовала список самых устойчивых к антибиотикам «приоритетных патогенов», представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека и для борьбы с которыми срочно требуется создание новых антибиотиков. Это группа ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* species. Большинство из них обладают множественной устойчивостью к антибиотикам. Причем, резистентность российских штаммов бактерий группы ESKAPE является одной из самых высоких в мире. Учитывая, что представители этой группы являются наиболее частыми возбудителями нозокомиальных инфекций, Международный Координационный Совет по антибиотикорезистентности в 2019 г. предложил несколько путей решения этой проблемы, одним из которых является разработка новых средств лечения, эффективных против инфекций с множественной лекарственной устойчивостью.

Цель исследования: изучить антибактериальные свойства новых синтезированных химических соединений природного и синтетического происхождения в отношении бактерий группы ESKAPE.

В результате изучения 120 клинических изолятов группы ESKAPE выявлено, что 66,5% из них имели выраженный гено-и фенотип резистентности к антибиотикам различных классов. Наибольшим набором генов антибиотикорезистентности обладают штаммы *K. pneumoniae* (37 генов) и *S. aureus* (10 генов). Доля мультирезистентных штаммов среди бактерий *K. pneumoniae* составила 60%, среди бактерий *S. aureus* – 40%. В то же время они поддаются антибактериальному воздействию впервые синтезированных соединений на основе растительных комплексов, минералов и синтезированных искусственным путем химических соединений.

Среди веществ растительного происхождения наилучшие антибактериальные свойства выявлены у нановолокон на основе куркумина и гиалуроновой кислоты (МИК 90 мг/мл); причем, подавление грамотрицательных бактерий под действием куркумина было продемонстрировано впервые. Среди соединений на основе минералов лидером определены пластины с наночастицами серебра – комплекс «титан (Ti) и серебро (Ag)», продемонстрировавший снижение количества бактерий *S. aureus* в $1 \cdot 10^5$ раз. Также в группе минеральных веществ удалось определить предполагаемый механизм действия на примере сплава Cu-Zn, полученного путем сонохимической обработки с образованием фракций: прямое разрушение мембраны, взаимодействие между ионами меди и глутатионом в анаэробных условиях и вытеснение железа из железосернистых кластеров, образование активных форм кислорода через образование перекиси водорода. В присутствии $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$ происходит инактивация ключевых белков и ферментов, которые участвуют в дыхательной системе, а также происходит повреждение РНК и ДНК. В результате исследования 250 впервые синтезированных соединений было определено соединение-лидер 3-фенил-2*H*-азиридин-2-карбоновая кислота (МИК для *S. aureus* 4,5 мкг/мл, МИК для *P. aeruginosa* и *E. cloacae* – 9 мкг/мл).

В эксперименте *in vivo* на белых беспородных мышях доказана антибактериальная эффективность соединения-лидера на основе азириновой кислоты при лечении раневой инфекции, обусловленной штаммом *K. pneumoniae*: наблюдалось значительное снижение (в 40 раз) числа возбудителей в ране по сравнению с контролем, приводящее к полному заживлению ран на 4 дня раньше, чем в группе контроля.

При исследовании синергии новых веществ с существующими антибиотиками установлено, что синтезированные соединения сульфонамидов потенцируют действие меропенема в отношении бактерий группы ESKAPE: в комбинации с соединениями сульфонамидов МИК меропенема для резистентного штамма *K. pneumoniae* снизилась с 20 мкг/мл до 0,3 мкг/мл, для резистентного штамма *A. baumannii* – с 40 мкг/мл до 0,3 мкг/мл.

Все положительные результаты, полученные *in vitro* и подкрепленные на моделях экспериментальных животных *in vivo*, после исследования на отсутствие цитотоксичности могут быть предложены для дальнейших клинических испытаний.

**Summary
of the dissertation "Antibacterial properties of new chemical compounds of natural and synthetic origin against ESKAPE group".**

Antibacterial resistance is one of the biggest threats to human health and a big problem for medical professionals. In 2017 the World Health Organization (WHO) published a list of the most antibiotic-resistant priority pathogens that pose the greatest threat to human health and for which new antibiotics are urgently needed. These are the ESKAPE group: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* Most of them have multi resistance to antimicrobials. Moreover, the resistance in the Russian Federation is one of highest in the world. Given that representatives of this group are the most frequent causative agents of nosocomial infections the International Coordinating Council on Antibiotic Resistance in 2019 proposed several ways to address this problem, one of which is the development of new treatments effective against multidrug-resistant infections.

Objective: to research the antibacterial properties of new synthesized chemical compounds natural and synthetic origin against ESKAPE group.

The study of 120 clinical isolates of the ESKAPE group revealed that 66.5% of them had genotype and phenotype of resistance to antibiotics of various classes. *K. pneumoniae* (37 genes) and *S. aureus* (10 genes) strains had the largest set of antibiotic resistance genes. The share of multidrug-resistant strains among *K. pneumoniae* was 60%, among *S. aureus* – 40%. At the same time, they are sensitive to first synthesized compounds based on plant complexes, minerals and artificially synthesized chemical compounds.

Among plant-derived substances the best antibacterial properties were found in curcumin-loaded nanofibers based on hyaluronic acid (MIC 90 mg/mL); moreover, the suppression of Gram-negative bacteria under the action of curcumin was demonstrated for the first time. Among the mineral-based compounds, the leader was identified plates with silver nanoparticles – the complex "titanium (Ti) and silver (Ag)", which demonstrated a $1 \cdot 10^5$ decrease of *S. aureus*. Also in the mineral group it was possible to determine the supposed mechanism of action on the example of Cu-Zn alloy obtained by sonochemical treatment with the formation of fractions: direct membrane destruction, interaction between copper ions and glutathione in anaerobic conditions and displacement of iron from iron-sulfur clusters, formation of reactive oxygen species through the formation of hydrogen peroxide. In the presence of $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$, key proteins and enzymes that are involved in the respiratory system are inactivated and RNA and DNA damage occurs.

The study of 250 first synthesized compounds showed lead compound 3-phenyl-2H-azirine-2-carboxylic acid (MIC for *S. aureus* 4.5 µg/ml, MIC for *P. aeruginosa* and *E. cloacae* – 9 µg/ml).

In vivo experiment on murine model proved antibacterial efficacy of lead compound in the treatment of wound infection caused by *K. pneumoniae*: a significant decrease (40 times) in the number of pathogens in the wound compared to the control was observed, leading to complete wound healing 4 days earlier than in the control group.

During research the synergy of new substances with existing antibiotics it was found that synthesized sulfonamide compounds potentiate the effect of meropenem against ESKAPE group: in combination with sulfonamide compounds MIC of meropenem for resistant *K. pneumoniae* decreased from 20 µg/mL to 0.3 µg/mL, for resistant *A. baumannii* – from 40 µg/mL to 0.3 µg/mL.

All positive results obtained *in vitro* and supported *in vivo* experimental animal models after research of cytotoxicity can be proposed for further clinical trials.

Список использованных сокращений

DMSO, ДМСО — Dimethylsulfoxid — диметилсульфоксид
 DMF, ДМФА — Dimethylformamide — диметилформамид
 АБП — антибактериальные препараты
 БЛ — бета-лактамазы
 БЛРС — бета-лактамазы расширенного спектра
 ВОЗ — всемирная организация здравоохранения
 ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
 КОЕ — колониеобразующая единица
 КЧ — коэффициент чувствительности
 МБЛ — металло-бета-лактамазы
 МГЭ — мобильные генетические элементы
 МИК — минимальная ингибирующая концентрация
 МЛУ — множественная лекарственная устойчивость
 НЧ — наночастицы
 ПЦР — полимеразная цепная реакция
 ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
 РНК — рибонуклеиновая кислота
 УК — усниновая кислота

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Фенотипическая и генотипическая оценка резистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих карбапенемазы. А.А. Самойлова, Л.А. Краева, Е.В. Рогачева, И.В. Лихачев, Н.В. Михайлов, С.А. Егорова, Е.А. Шилинг. Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2022. – № 2. – С. 25-31.
2. Conjugation of a 5-nitrofuranyl moiety to aminoalkylimidazoles produces non-toxic nitrofurans that are efficacious *in vitro* and *in vivo* against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. M. Krasavin, A. Lukin, T. Vedekhina, O. Manicheva, M. Dogonadze, T. Vinogradova, N. Zabolotnykh, E. Rogacheva, L. Kraeva, Piotr Yablonsky, Eur J Med Chem, 2018, 157, pp. 1115-1126. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.08.068.
3. Aminonitrones as Highly Reactive Bifunctional Synthons. Expedient One-pot Route to 5-Amino-1,2,4-triazoles and 5-Amino-1,2,4-oxadiazoles – Potential Antimicrobials Targeting Multi-drug Resistant Bacteria. M. Il'in, A. Sysoeva, D. Bolotin, A. Novikov, V. Suslonov, E. Rogacheva, L. Kraeva, V. Kukushkin. New Journal of Chemistry, 2019, 43(44). DOI: 10.1039/C9NJ04529E.
4. Attachment of a 5-nitrofuranyl moiety to spirocyclic piperidines produces non-toxic nitrofurans that are efficacious *in vitro* against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. M. Krasavin, A. Lukin, T. Vedekhina, O. Manicheva, M. Dogonadze, T. Vinogradova, N. Zabolotnykh, E. Rogacheva, L. Kraeva, V. Sharoyko, T. Tennikova, D. Dar'in, E. Sokolovich. Eur J Med Chem, 2019, 166, pp.125-135. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.01.050.
5. Non-natural 2*H*-azirine-2-carboxylic acids: an expedient synthesis and antimicrobial activity. P. Sakharov, A. Koronotov, A. Khlebnikov, M. Novikov, A. Glukharev, L. Kraeva, V. Sharoyko, T. Tennikova, N. Rostovskii. RSC Adv., 2019, 9(65), pp.37901-37905. DOI: 10.1039/c9ra09345a.
6. Разработка отечественных наборов для определения чувствительности клинически значимых микроорганизмов к антибактериальным препаратам. А. А. Самойлова, И. В. Лихачев, Рогачева Е.В.
7. Azirine-containing dipeptides and depsipeptides: synthesis, transformations and antibacterial activity. N. Rostovskii, A. Koronotov, P. Sakharov, A. Agafonova, M. Novikov, A. Khlebnikov, E. Rogacheva, L. Kraeva. Org Biomol Chem., 2020, 18(46), pp. 9448-9460. DOI: 10.1039/d0ob02023k.

8. Approbation of russian test strips for antimicrobial susceptibility testing of microorganisms by gradient diffusion method (E-test). I. Likhachev, E. Rogacheva, L. Kraeva, A. Samoilo, L. Kaftyreva, S. Egorova, N. Mikhailov. *Klin Lab Diagn.*, 2020, 65(9), pp. 557-561. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-9-557-56.
9. Mutually Isomeric 2- and 4-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl)pyrimidines Inspired by an Antimycobacterial Screening Hit: Synthesis and Biological Activity against the ESKAPE Panel of Pathogens. S. Chuprun, D. Dar'in, E. Rogacheva, L. Kraeva, O. Levin, O. Manicheva, M. Dogonadze, T. Vinogradova, O. Bakulina, M. Krasavin. *Antibiotics*, 2020, 9(10), 666. DOI: 10.3390/antibiotics9100666.
10. Zn(OTf)₂-catalyzed arenehydrazination of protected propargylamines leading to 3-amidoindoles. T. Vedekhina, A. Lukin, E. Rogacheva, L. Kraeva, M. Krasavin. *Tetrahedron Letters*, 2020, 61(5), 151430. DOI: 10.1016/j.tetlet.2019.151430.
11. Separation of motions and vibrational separation of fractions for biocide brass. M. Sabbouh, A. Nikitina, E. Rogacheva, L. Kraeva, S. Ulasevich, E. Skorb, M. Nosonovsky. *Ultrasonics Sonochemistry*, 80, 2021, 105817. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2021.105817.
12. Antibacterial and Osteogenic Properties of Ag Nanoparticles and Ag/TiO₂ Nanostructures Prepared by Atomic Layer Deposition. D. Nazarov, I. Ezhov, N. Yudintceva, M. Shevtsov, A. Rudakova, V. Kalganov, V. Tolmachev, Y. Zharova, O. Lutakov, E. Rogacheva, L. Kraeva, M. Maximov. *J. Funct. Biomater.* 2022, 13, 62. DOI: 10.3390/jfb13020062.
13. Exploration of Spirocyclic Derivatives of Ciprofloxacin as Antibacterial Agents. A. Lukin, M. Chudinov, T. Vedekhina, E. Rogacheva, L. Kraeva, O. Bakulina, M. Krasavin. *Molecules*, 2022, 27, 4864. DOI: 10.3390/molecules27154864.
14. *In-Vitro* Antibacterial Activity of Curcumin-Loaded Nanofibers Based on Hyaluronic Acid against Multidrug-Resistant ESKAPE Pathogens. P. Snetkov, A. Kremleva, S. Morozkina, M. Uspenskaya, E. Rogacheva, L. Kraeva. *Pharmaceutics* 2022, 14(6), 1186. DOI: 10.3390/pharmaceutics14061186.
15. Novel 5-Nitrofurantagged Imidazo-Fused Azines and Azoles Amenable by the Groebke–Blackburn–Bienaymé Multicomponent Reaction: Activity Profile against ESKAPE Pathogens and Mycobacteria. A. Sapegin, E. Rogacheva, L. Kraeva, M. Gureev, M. Dogonadze, T. Vinogradova, P. Yablonsky, S. Balalaie, S. Baykov, M. Krasavin. *Biomedicines*, 2022, 10(9), 2203. DOI: 10.3390/biomedicines10092203.
16. 5-Nitrofurantagged Oxazolyl Pyrazolopiperidines: Synthesis and Activity against ESKAPE Pathogens. E. Rogacheva, L. Kraeva, L. Lukin, L. Vinogradova, K. Komarova, M. Chudinov, M. Gureev, E. Chupakhin. *Molecules* 2023, 28 (18), 6491. DOI: 10.3390/molecules28186491.
17. Atomic Layer Deposition of Antibacterial Nanocoatings: A Review. D. Nazarov, L. Kozlova, E. Rogacheva, L. Kraeva, M. Maximov. 2023, 2023101274. DOI: 10.20944/202310.1274.v1.
18. Atomic Layer Deposition of Chlorine Containing Titanium–Zinc Oxide Nanofilms Using the Supercycle Approach. D. Nazarov, L. Kozlova, A. Rudakova, E. Zemtsova, N. Yudintceva, E. Ovcharenko, A. Koroleva, I. Kasatkin, E. Rogacheva, L. Kraeva, M. Maximov. *Coatings* 2023, 13 (5), 960. DOI: 10.3390/coatings13050960.
19. Creation of a Composite Bioactive Coating with Antibacterial Effect Promising for Bone Implantation. E. Zemtsova, L. Kozlova, N. Yudintceva, D. Sokolova, A. Arbenin, A. Ponomareva, P. Korusenko, E. Rogacheva, L. Kraeva, V. Smirnov. *Molecules*, 2023, 28(3), 1416. DOI: 10.3390/molecules28031416.
20. External oxidant-free and transition metal-free synthesis of 5-amino-1,2,4-thiadiazoles as promising antibacterials against ESKAPE pathogen strains. A. Shetnev, M. Tarasenko, V. Kotlyarova, S. Baykov, K. Geyl, S. Kasatkina, N. Sibinčić, V. Sharoyko, E. Rogacheva, L. Kraeva. *Molecular Diversity*, 2023, 27, pp. 651–666. DOI: 10.1007/s11030-022-10445-1.
21. Gold vs Light: Chemodivergent Reactivity of Diazoesters toward 2*H*-Azirine-2-carboxylic Acids. G. Titov, G. Antonychev, M. Novikov, A. Khlebnikov, E. Rogacheva, L. Kraeva, N. Rostovskii. *Organic Letters*, 2023, 25, 15, pp. 2707–2712. DOI: 10.1021/acs.orglett.3c00823.

22. Sonochemical fabrication of gradient antibacterial materials based on Cu-Zn alloy. M. Sabbouh, A. Nikitina, A. Nebalueva, V. Shilovskikh, R. Sadovnichii, A. Koroleva, K. Nikolaev, E. Rogacheva, L. Kraeva, S. Ulasevich, E. Skorb. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2023, 92, 106247. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2022.106247.
23. Synthesis and Antibacterial Evaluation of Ciprofloxacin Congeners with Spirocyclic Amine Periphery. A. Lukin, K. Komarova, L. Vinogradova, E. Rogacheva, L. Kraeva, M. Krasavin. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24 (2), 954. DOI: 10.3390/ijms24020954.
24. Urea derivatives of spirocyclic piperidines endowed with antibacterial activity. A. Lukin, K. Komarova, L. Vinogradova, E. Rogacheva, L. Kraeva, M. Dogonadge, T. Vinogradova, M. Krasavin. *Mendeleev Communications*, 2023, 33 (1), pp. 109-111. DOI: 10.1016/j.mencom.2023.01.034.