

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА
АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»**

РУДЕНКО СТАНІСЛАВ СТАНІСЛАВОВИЧ

УДК 615.28:615.015.11

**ПРОТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНА ДІЯ
ГЕТЕРОЦИКЛІЧНИХ ПОХІДНИХ ХІНОЛІНІЮ, ЩО ВМІЩУЮТЬ
ФРАГМЕНТИ АМІНОЦУКРІВ**

03.00.07 - мікробіологія



**АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового
ступеня кандидата медичних наук**

Харків - 2009

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України».

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор,
заслужений діяч науки і техніки України,
Волянський Юрій Леонідович,
ДУ «Інститут мікробіології та імунології
ім. І.І. Мечникова АМН України»,
директор

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
Бірюкова Світлана Василівна,
Харківська медична академія післядипломної
освіти МОЗ України, професор кафедри клінічної
імунології та мікробіології;

доктор медичних наук, професор
Климнюк Сергій Іванович,
Тернопільській державний медичний університет
ім.І.Я.Горбачевського МОЗ України, завідувач
кафедри медичної біології, мікробіології,
вірусології та імунології

Захист дисертації відбудеться “___” _____ 2009 р. о _____
годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01 при ДУ «Інститут
мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України» (61057, м. Харків,
вул. Пушкінська, 14-16).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут
мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України» (61057, м.Харків,
вул. Пушкінська, 14-16).

Автореферат розісланий “___” _____ 2009 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 64.618.01
к.мед.н., с.н.с.

Бруснік С.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Проблема інфекційних та гнійно-запальних захворювань завжди була показником цивілізованості країни, соціально та економічно значущою. Усугублення її в останнє десятиріччя в Україні пов'язано з негараздами економіки, впритул до кризи, яка вже проявилась вочевидь.

З біологічної та медичної точок зору проблема обумовлена поліетиологічністю хвороб мікробного генезу, формуванням і широким розповсюдженням стійких до протимікробних засобів збудників, низькою ефективністю лікувальних та профілактичних препаратів, важким перебігом патологічних процесів, високими рівнями летальності та інвалідизації. В Україні щорічно реєструється більше 60 нозологічних форм інфекційних захворювань, інтенсивні показники за період з 1997 по 2007 роки склали 20,4 – 23,7 тисяч (в розрахунку на 100 000 населення) відповідно, що на 34 % більше від загальної захворюваності (Пономаренко О.М., 2008). І це далеко не повні дані статистики, внутрілікарняні інфекції реєструються лише у випадках наявності спалахів захворювання, що складає до 1,3 % випадків.

Серед цілого ряду причин інтенсифікації госпітальних інфекцій слід акцентувати увагу на безперервності процесу формування та розповсюдження умовно патогенних мікроорганізмів, що володіють вираженою здатністю до адаптації існування в умовах медичних закладів, високою адгезивністю, підвищеною вірулентністю, проявом антагоністичних властивостей, конкурентністю в межах екологічних ніш, полірезистентністю щодо антибіотиків, сульфамідів, антисептиків і дезінфектантів (Палій І.Г., 2006; Климнюк С.І., 2008; Waeil, 2007).

Суттєвим наслідком нераціональної хіміотерапії є відзначене вченими різних країн різке прискорення темпів еволюції патогенних для людей і тварин мікробів, а також відчутна зміна етіологічної структури збудників нагнійних процесів, насамперед, в бік пониження долі облігатно патогенних мікроорганізмів і неухильного розширення спектру та збільшення питомої ваги умовно патогенних (Бірюкова С.В., 2006; Shicanawa, 2004).

На цьому фоні відбувається переоцінка місця антибіотиків в хіміотерапії, відроджується зацікавленість до антисептиків. Ряд дослідників вважають, що в лікуванні та профілактиці місцевих інфекцій пріоритет потрібно віддавати саме антисептикам (Дикий І.Л., 2005; Циганенко А.Я., 2008; Zeller, 2007).

Слід відмітити, що в розробці проблеми отримання нових антисептиків мають місце значні досягнення. Одержано декілька класів ефективних препаратів, досліджуються механізми їх дії на мікроорганізми.

Викладене диктує необхідність цілеспрямованого пошуку і розробки нових протимікробних засобів з високою активністю щодо грампозитивних і грамнегативних збудників, малою або помірною токсичністю, прийнятними фізико-хімічними властивостями, з порівняно повільним формуванням до них стійкості у мікробів.

Нашу увагу привернули синтетичні гетероциклічні похідні хінолінію, що включають фрагменти аміноцукрів, синтезовані науковцями кафедри органічної хімії (С.В. Шинкаренко) Чернівецького національного університету ім. Ю. Федьковича. Цілком прийнятні фізико-хімічні властивості, малостадійність синтезу і наявність в Україні всіх структурних компонентів, висока реакційна здатність, різнопланова біологічна дія та помірна токсичність підтверджують можливість конструювання на їх основі ефективних протимікробних препаратів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами.

Дисертаційну роботу виконано в рамках планової наукової тематики ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України»: „Вивчення молекулярних сполук, що мають антимікробну дію: скринінг і прогнозування” (шифр ЦФ.508, № 0194U20642); „Вивчення чутливості до сучасних антибіотиків та інших біологічних властивостей госпітальних штамів збудників гнійно-запальних захворювань” (шифр ЦФ.4.28.29, № 0199U003170). Дисертантом охарактеризовано чутливість клінічно значущих патогенів щодо антибіотиків та гетероциклічних сполук хінолінію і четвертинного амонію. Тема дисертаційної роботи була затверджена на засіданні вченої ради ІМІ ім.І.І.Мечникова АМН України 19.02.2004 р., протокол № 2.

Мета і завдання дослідження. *Мета роботи* - пошук нових протимікробних сполук серед гетероциклічних похідних хінолінію, що вміщують фрагменти аміноцукрів, та обґрунтування можливостей конструювання на їх основі ефективних профілактичних і лікувальних засобів.

Для досягнення поставленої мети сформульовано і розв'язано наступні *основні задачі*:

1. Проаналізувати стан синтезу гетероциклічних похідних хінолінію, модифікованих різними структурними вуглеводневими радикалами, оцінити їх протимікробну активність та фармакологічну дію.

2. Охарактеризувати мікробіоценоз біотопу дихальних шляхів у хворих на обструктивний бронхіт, означити чутливість збудників патологічного процесу щодо антибіотиків і антисептиків.

3. З використанням стандартного набору референтних тест-мікробів провести первинний мікробіологічний скринінг масиву гетероциклічних сполук, що містять залишки аміноцукрів.

4. Визначити спектр та рівні активності відібраних в процесі первинного скринінгу похідних хінолінію щодо музейних штамів і клінічних ізолятів мікроорганізмів – збудників інфекційних та гнійно-запальних захворювань.

5. Вивчити ступінь впливу гетероциклічних похідних аміноцукрохінолінію в суббактеріостатичних дозах на деякі базисні фактори хвороботворності мікробів (адгезія, протилізоцимна, протиімуноглобулінова активність, передача та елімінація R- та Ent-плазмід).

6. У гострому та хронічному досліджах означити параметри токсичності, ефекти кумуляції та подразнюючу дію аміноцукрохінолінієвих сполук.

Об'єкт дослідження – інфекційні та гнійно-запальні захворювання.

Предмет дослідження – гетероциклічні похідні хінолінію, що вміщують фрагменти аміноцукрів; патогенні та умовно патогенні мікроорганізми.

Методи дослідження – мікробіологічні, біохімічні, токсикологічні, математико-статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Охарактеризовано мікроценози біотопу дихальних шляхів у хворих на обструктивний бронхіт в різних стадіях хронізації процесу. Доведено наявність патогенних властивостей у клінічно значущих ізолятів патогенів, означено їх чутливість щодо антибіотиків різних груп та поколінь, а також деяких широко застосовуваних антисептиків. Відмічено поступове превалювання в перебігу обструктивного бронхіту потенційних та явних збудників в асоціаціях; доведено, що в подовженні терміну перебігу хвороби формуються мікробіоценози з кількісною перевагою анаеробів та мікроаерофілів. Серед масиву гетероциклічних хінолінієвих сполук, що вміщують аміноцукрові замісники біля гетероатома азоту (всього досліджено 39 речовини), виявлено сполуки з достатньо високим рівнем та широким спектром активності щодо грампозитивних і грамнегативних клінічно значущих бактерій і грибів. Логіко-структурним аналізом залежності ступеню протимікробної дії від будови похідних хінолінію визначено деякі достатньо чіткі диференційні ознаки біологічної активності речовин цього ряду (більш активними виявились сполуки, що вміщували в положенні R₃ ацетати глюкози або лактози; значно меншою протимікробною активністю володіли хімічні речовини з арилзамісником в положенні R₂, а також перхлорати з групою ОН в положенні R₁ ядра хіноліну).

Доведено, що в суббактеріостатичних дозах аміноглікозидні похідні хіноліну суттєво інгібують адгезивну, протилізоцимну, протиімуноглобулінову дію збудників гнійно-запальних процесів, сприяють елімінації плазмід ентеротоксичності та антибіотикорезистентності.

Окремі гетероциклічні сполуки проявили порівняно низьку токсичність (IV – V класи небезпечності за класифікацією Д.Л.Заугольникова), володіли невираженими та зворотно відновлюючими ефектами кумуляції, в орієнтовній

терапевтичній дозі (1/5 LD₅₀) не подразнювали слизові оболонки та шкіру, не виявляли алергізуючої дії. По рівням гострої токсичності для білих мишей досліджені гетероциклічні сполуки в залежності від наявності замісника в положенні R₃ ядра хіноліну розміщено в слідуючій послідовності – ацетат глюкози > ацетат лактози > ацетат мальтози > ацетат галактози.

Високу токсичність, подразнюючу та алергізуючу дію проявила сполука 10 (6-Naphthyl-2-(3,4,5,6,7-pentahydroxyhept-1-enil)-quinolinium; perchlorate), що надає перспективу її використання в якості облігатного алергену в токсикології та фармакології.

Практичне значення одержаних результатів. Накопичено банк даних щодо структурних особливостей, фізико-хімічних властивостей, біологічної дії, токсичності, впливу на процеси адгезії та інвазії збудників в організмі експериментальних тварин нових оригінальних гетероциклічних аміноцукрохінолінієвих сполук.

Розроблено та затверджено МОЗ України методичні рекомендації „Лабораторна діагностика та діагностичні критерії змішаних гострих кишкових інфекцій (Харків, 2000) та схвалені на засіданні науково-дослідної ради ДФЦ МОЗ України (пр. № 9 від 30.10.2003 р.) методичні рекомендації «Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів» (Київ, 2004). Матеріали дисертації використовуються в учбових програмах з мікробіології та органічної хімії в Харківському національному медичному університеті, Харківській медичній академії післядипломної освіти, в Вінницькому національному медичному університеті ім.М.І.Пирогова, Тернопільському державному медичному університеті ім.І.Я.Горбачевського та Буковинському державному медичному університеті. Методи дослідження аспорогенних анаеробних мікробів застосовуються в мікробіологічних лабораторіях Полтавської, Житомирської, Дніпропетровської обласних санітарно-епідеміологічних станцій, Південної та Придніпровської залізниць. Оригінальні штами збудників гнійно-запальних захворювань, вилучених від хворих в процесі виконання роботи, задепоновано в Філіалі музею мікроорганізмів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім.І.І.Мечникова АМН України».

Особистий внесок здобувача. Дисертантом особисто охарактеризовано мікроценози біотопу дихальних шляхів у хворих на обструктивний бронхіт, досліджено патогенні властивості ізолятів збудників, їх чутливість до хіміотерапевтичних засобів і антисептиків, проведено первинний мікробіологічний скринінг похідних хіноліну, що вміщують фрагменти аміноцукрів, та визначено спектр їх дії щодо музейних і клінічно значущих збудників гнійно-запальних захворювань. Самостійно в дослідгах *in vivo* означено параметри гострої та хронічної токсичності аміноцукрохінолінієвих похідних, ефекти кумуляції, подразнюючу та алергізуючу дії. Особисто

виконано дослідження ступеню впливу речовин нового синтезу на базисні фактори хвороботворності патогенів, процес елімінації та міжмікробної передачі плазмід резистентності. При консультативному нагляді провідного інженера В.В.Чурсіна (лабораторія молекулярного моделювання ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім.І.І.Мечникова АМН України») за допомогою комп'ютерних програм Excel та Biostat статистично оброблені результати експериментів.

Апробація роботи. Основні положення дисертації оприлюднено і обговорено на Міжнародних наукових конференціях „Актуальні питання боротьби з інфекційними захворюваннями” (Харків, 2003, 2005); «Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України» (Харків, 2005); «Актуальні питання стратегії, тактики застосування та дослідження антибіотиків, антисептиків, дезінфектантів» (Вінниця, 2004, 2006); «Поиск и разработка новых иммунобиологических препаратов, профилактических и лечебных противомикробных средств, антисептиков, дезинфектантов и пробиотиков» (Харьков, 2006); «Шпитальні інфекції: сучасний стан проблеми» (Харків, 2008); Науково-практичних конференціях санепідслужби (Полтава, 2004 – 2008); XII Міжнародного конгресу студентів та молодих вчених (Тернопіль, 2009).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 11 наукових праць (4 одноосібно), з них 6 статей в наукових фахових виданнях, рекомендованих ВАК України, 1 методичні рекомендації, 4 тезисів у матеріалах науково-практичних конференцій.

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 177 сторінках машинопису, містить вступ, огляд літератури (30 стор.), шість розділів власних досліджень, аналіз і узагальнення одержаних результатів, висновки. Список літератури нараховує 278 першоджерел, з них 124 вітчизняних і 154 зарубіжних. Робота ілюстрована 31 таблицею (33 стор.) і 5 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У *вступі* в стислій формі означено актуальність проблеми боротьби з інфекційними та гнійно-запальними хворобами в сучасних умовах, її медична і соціальна значущість. Наведено основні причини госпіталізму, підкреслено інтенсивне формування та широке розповсюдження умовно патогенних збудників, стійких до хіміотерапевтичних засобів, антисептиків і дезінфектантів. Доведено необхідність пошуку нових більш ефективних і менш токсичних препаратів протимікробної направленості. Обґрунтовано сутність мети та завдань досліджень, визначено зв'язок роботи з державними науковими програмами, розкрито наукову новизну і практичне значення здобутих

результатів, наведено дані щодо апробації отриманих результатів та впровадження їх в медичну практику, вказано структуру дисертації і її обсяг.

У першому розділі (огляд літератури) окреслено основні етапи створення протимікробних препаратів на основі синтетичних органічних речовин. Проаналізовано і викладено досягнення сучасної світової науки в розробці та всебічному вивченні хімічної структури, фізико-хімічних властивостей, біологічної та фармакологічної дії, протимікробної активності і токсичності похідних хінолінію. Акцентовано увагу на гетероциклічних хінолінієвих сполуках, модифікованих різноманітними вуглеводневими радикалами. На основі численних даних літератури доведено доцільність і перспективу пошуку високоефективних протимікробних препаратів в рядах гетероциклічних хінолінієвих сполук, що вміщують фрагменти аміноцукрів.

Матеріали, методи і обсяг досліджень наведено у другому розділі. Основний обсяг робіт виконано в лабораторії протимікробних засобів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім.І.І.Мечникова АМН України» на протязі 2003 – 2008 рр. В результаті реалізації нашої сумісної ідеї щодо конденсації ядра хіноліну з фармакологічно активними фрагментами аміноцукрів хіміком-синтетиком С.В.Шинкаренко (кафедра органічної хімії Буковинського національного університету ім.Ю.Федьковича) синтезовано оригінальні похідні хінолінію. Сполуки являють собою дрібнокристалічні порошки різного кольору з температурою плавлення 176 – 238 °С, будову їх підтверджено даними елементного аналізу, мас-спектрометрії, ультрафіолетового, інфрачервоного та видимих спектрів. В якості препаратів для порівняння обрано добре відомі та близькі структурно до похідних хіноліну четвертинні амонієві сполуки – декаметоксин (декаметоксин-1-10-біс/N-диметилкарбментоксіметиламоній/дихлорид) і етоній (діхлорид – етилен 1,2-біс/N-диметилкарбодецоксіметил/амоній), а також широко використовуємі в медичній практиці антибіотики, дезінфектанти та антигістамінний засіб – дипразин.

Протимікробна активність нових хімічних сполук щодо референтних штамів мікроорганізмів та патогенів 2, 4, 5, 17 - 20 груп (за Означником Берджі, 1994), двох родин і 27 родів (всього 232 ізолята) досліджена згідно розроблених за нашої участі методичних рекомендацій „Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів”, Київ, 2004, схвалених на засіданні науково-дослідної ради Державного фармакологічного центру МОЗ України 30.10.2003 р., протокол № 9. В якості тест-культур використано музейні штами мікроорганізмів, депоновані в Харківській філії Національного музею патогенних мікроорганізмів (ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім.І.І.Мечникова АМН України»). Штами мікробів з означеними детермінантами резистентності до антибіотиків отримано з Інституту

антибіотиків АМН Росії (м. Москва). Всі використані референтні штами мікроорганізмів характеризувались генетичною стабільністю за основними ознаками, в тому числі і за рівнями чутливості до протимікробних засобів. Оригінальні штами бактерій, вилучені в процесі виконання дисертації, автором охарактеризовані, паспортизовані і частково депоновані в Харківській філії Національного музею мікроорганізмів (всього депоновано 12 штамів).

Живильні середовища для вилучення та ідентифікації мікробів застосовували відповідно до особливостей культивування бактерій різних груп, а також грибів роду *Candida*. Дослідження аспорогенних анаеробних мікроорганізмів та ентеробактерій виконано у відповідності методичним рекомендаціям „Лабораторна діагностика гнійно-запальних захворювань, обумовлених аспорогенними анаеробними мікроорганізмами” (Харків, 2002) та „Лабораторна діагностика та діагностичні критерії змішаних гострих кишкових інфекцій” (Харків, 2000), розроблених за нашої участі. Ступінь впливу гетероциклічних хінолінієвих сполук на базисні фактори хвороботворності мікробів визначено за методиками О.В.Бухаріна, 1993; В.І.Білозерського, 2000; М.Ф.Доценко і співав., 2001. Гостру токсичність деяких з досліджуваних речовин при різних шляхах введення в організм тварин оцінювали за визначеними показниками максимально переносимих (МПД) та летальних (LD_{10} , LD_{50} , LD_{90}) доз методом пробіт-аналізу за Litchfeld і Wilcoxon, викладеним М.Л.Біленьким, 1963. Хронічну токсичність та ефекти кумуляції вивчено згідно методик В.В.Гацури, 1984; С.Д.Заугольникова та співав., 1996. Подразнююча дія, алергизуючі та десенсибілізуючі властивості деяких сполук вивчено у відповідності уніфікованому методу Є.С.Ієвлевої, 1986, з використанням облігатного алергену 2,4-динітрохлорбензолу. Експерименти на тваринах виконано згідно Міжнародним рекомендаціям щодо проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин (Хроніка ВООЗ, 1985) та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою (Страсбург, 1980).

Для об'єктивного судження про ступінь вірогідності отриманих результатів дослідження використано варіаційно-статистичний метод аналізу за допомогою прикладних комп'ютерних програм з електронними таблицями Microsoft Excel та Biostat.

У *третьому розділі* наведено мікробіологічні варіації біотопу бронхолегеневої системи у хворих на обструктивний бронхіт, що перебували на стаціонарному лікуванні в медичних закладах м.Полтави та області (всього 134 пацієнти) (табл.1). Встановлено, що з подовженням терміну хвороби інтенсивно зростає питома вага полімікробних асоціацій в біотопі дихальної системи (рис.1).

Таблиця 1

Розподіл видового складу вилучених мікроорганізмів за клінічними групами пацієнтів з обструктивним бронхітом

Мікрофлора	Кількість штамів за клінічними групами пацієнтів			Загальна кількість штамів у обстежених хворих (n=134)
	A (n=52)	Б (n=45)	В (n=37)	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>Група 4. Грамнегативні аеробні (мікроаерофільні палички і коки)</i>				
Moraxella	2 (3,85)	1 (2,22)	-	3 (2,24)
<i>Група 5. Факультативно анаеробні грамнегативні палички</i>				
Escherichia	5 (9,61)	3 (6,67)	3 (8,11)	11 (8,21)
Haemophilus	3 (5,77)	3 (6,67)	1 (2,70)	6 (4,48)
Citrobacter	-	1 (2,22)	1 (2,70)	2 (1,49)
Proteus	2 (3,85)	3 (6,67)	1 (2,70)	6 (4,48)
Serratia	1 (1,92)	-		2 (1,49)
<i>Група 6. Грамнегативні аеробні, прямі, вигнуті та спіральні бактерії</i>				
Bacteroides	11 (21,16)	7 (15,56)	6 (16,22)	24(17,91)
<i>Група 17. Грампозитивні коки</i>				
Staphylococcus	25 (48,08)	20 (44,44)	13 (35,14)	58 (43,28)
Streptococcus	17 (32,69)	12 (26,67)	10 (27,03)	39(29,10)
Peptococcus	11 (21,15)	10 (22,22)	6 (16,22)	27(20,15)
Peptostreptococcus	14 (26,92)	8 (17,78)	7 (18,92)	29(21,64)
<i>Група 20. Грампозитивні неспорутворюючі палички неправильної форми</i>				
Corynebacterium	1 (1,92)	-	1 (2,70)	2 (1,49)
<i>Дріжджеподібні гриби</i>				
Род Candida	5 (9,61)	4 (8,89)	3(8,11)	12 (8,95)
<i>Кількість штамів на 1 пацієнта</i>	<i>1,86</i>	<i>1,60</i>	<i>1,41</i>	<i>1,65</i>

Також означено чітку тенденцію (за прямо пропорційним позитивним вектором) підвищення частоти вияву факультативно і облигатних анаеробів в процесі хронізації обструктивного бронхіту (табл.2). Вилучені та охарактеризовані ізоляти бактерій і грибів в більшості випадків виявились патогенними та володіючими (в різній мірі) стійкістю до хіміотерапевтичних засобів і антисептиків, які широко використовуються в медичній та ветеринарній практиці.

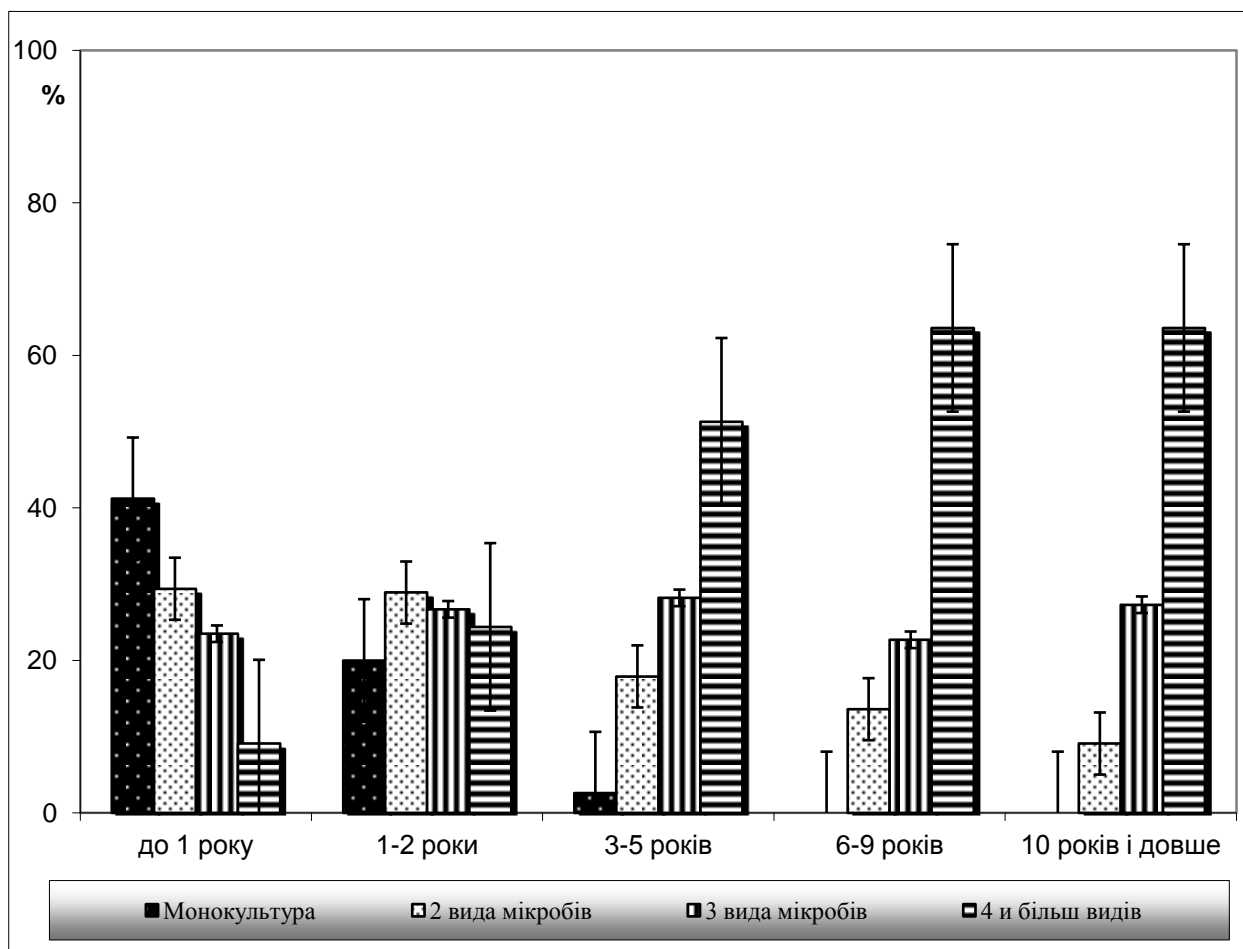


Рис.1. Динаміка частоти вилучення асоціацій мікроорганізмів в дихальній системі у хворих на обструктивний бронхіт в залежності від давності захворювання

У четвертому розділі наведено дані щодо ступеню протимікробної активності всього масиву гетероциклічних хінолінієвих сполук по відношенню до референтних та клінічних штамів збудників інфекційних і гнійно-запальних захворювань. При первинному скринінгу на обмеженій кількості тест-мікробів (*S.aureus*, *E.coli*, *P.vulgaris*, *P.aeruginosa*, *C.albicans*) означено хімічні речовини з найбільш вираженою протимікробною дією, прийнятні за фізико-хімічними властивостями. Для подальшого більш поглибленого дослідження відібрано сполуки під шифрами 5, 10, 16, 20, 30 і 38. Слідуючим етапом було вивчення ступеню та спектру протимікробної дії відібраних похідних хінолінію щодо мікроорганізмів самих різних груп, родин і родів. Грампозитивні коки 17 групи бактерій проявили досить високу чутливість до всіх досліджуваних речовин.

Таблиця 2

Залежність частоти вилучення у хворих на обструктивний бронхіт мікроорганізмів з різним типом дихання від давності захворювання

Давність захворювання, роки	Аероби	Факультативні і облигатні анаероби	Розподіл пацієнтів
	кількість штамів (%)	кількість штамів (%)	n [%]
до 1 року	15(11,6)	3(5,1)	17 [12,7]
1-2	44 (40,9)	9(19,9)	45 [33,6]
3-5	30 (28,8)	33(36,1)	39 [29,1]
6-9	18(14,2)	39(23,1)	22 [16,4]
10 і більш	5 (4,5)	25(15,7)	11 [8,2]
Всього	112(100,0)	109(100,0)	134 [100,0]

Мінімальна бактеріостатична концентрація (МБстК) їх по відношенню до стрептококів, стафілококів, ентерококів, аерококів і сарцин коливалась в межах від 0,5 до 7,8 мкг/мл, анаеробних коків (пептококи і пептострептококи) – від 1,0 до 15,6 мкг/мл. Грампозитивні палички, здатні утворювати ендоспори, і коки (група 18) виявились дещо менш чутливими до похідних хіноліну (МБстК від 3,9 до 31,2 мкг/мл). Грампозитивні неспороутворюючі палички правильної форми – лактобацили і лістерії (група 19) проявили різну чутливість до хінолінієвих сполук. Так, МБстК похідних хінолінію щодо *L.delbrueckii*, вилучених з кишечника хворих з проявом дисбактеріозу, коливалась в межах 62,5 – 500,0 мкг/мл, щодо вилучених з навколишнього середовища – в межах 31,2 – 125,0 мкг/мл. Лістерії різних видів (*L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, *L.innocua*) проявили чутливість до взятих в дослід хімічних речовин в дозах 3,9 – 15,6 мкг/мл. Грампозитивні неспороутворюючі палички неправильної форми – ацетобактерії та коринебактерії (група 20) також проявили різну чутливість до хінолінієвих похідних. Каталазонегативні хемолітотрофи з виключно анаеробним типом дихання - *A.woodii* і *A.carbolicum* - не проявили чутливості щодо досліджуємих сполук навіть в концентрації 500,0 мкг/мл, в той час, як ріст *A.wieringae*, що не ферментує глюкозу та гліцерат, інгібувався похідними хіноліну в дозах 15,6 – 62,4 мкг/мл. Музейні та клінічні штами типового виду коринебактерій (*C.diphtheriae*) виявились вельми чутливими до хінолінієвих сполук (МБстК 2,0 – 7,8 мкг/мл), дещо меншу чутливість до них (МБстК 15,6 – 62,5 мкг/мл) проявили *C.bovis*, *C.amycolatum* і *C.cystidis*, які значно менш активні біохімічно та при цьому здатні розщеплювати піразинамідазу і фосфатазу. Різна чутливість до похідних хіноліну бактерій 19 і 20 груп дозволяє дійти висновку, що протимікробна дія досліджуємих речовин проявляється в більшій мірі щодо мікробів з достатньо вираженою біохімічною активністю.

Аеробно/мікроаерофільні рухомі (спіральнозігнуті) грамнегативні бактерії 2 групи – кампілобактери і хелікобактери – достатньо чутливі до похідних хіноліну (МБстК – від 3,9 до 31,2 мкг/мл). Грамнегативні аеробно/мікроаерофільні палички і коки 4 групи – ацетобактери, флавобактерії, ацінетобактерії і бактероїди 6 групи порівняно малочутливі до хінолінієвих сполук (МБстК – від 62,5 до 250,0 мкг/мл). Низька чутливість щодо речовин нового синтезу відмічена і у типового виду псевдомонад *P.aeruginosa* (МБстК – від 31,2 до 125,0 мкг/мл), при цьому інгібування росту клінічних штамів *P.seracisa* і *P.alcaligenes* спостерігалось в концентрації 7,8 – 31,2 мкг/мл. Аналогічні дані отримані і відносно ще одного представника 4 групи – бактерій роду *Neisseria*. Так, музейні і клінічні штами *N.meningitis* і *N.gonorrholae* проявляли достатньо високу чутливість до похідних хіноліну (МБстК – 2,0 – 15,6 мкг/мл), а каталазонегативні нейсерії (*N.elangata*, *N.denitreficans* і *N.canis*) – малочутливі до досліджуваних речовин (МБстК – 62,5 – 250,0 мкг/мл). Не було можливим однозначно оцінити ступінь впливу похідних хіноліну на факультативні анаеробні грамнегативні палички 5 групи. Так, бактерії першої підгрупи (роди *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Echerihia*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Providencia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*) проявили до них низьку чутливість (МБстК – 62,5 – 250,0 мкг/мл), бактерії третьої підгрупи (рід *Haemophilus*) – достатньо високу (МБстК від 3,7 до 31,2 мкг/мл). Також порівняно високу чутливість до хінолінієвих речовин виявили з першої підгрупи бактерії родів *Klebsiella*, *Proteus* і *Yersinia* (МБстК – від 7,8 до 31,2 мкг/мл). Виражена дія досліджених сполук означена і щодо дріжджеподібних грибів роду *Candida* (МФстК – від 2,0 до 15,6 мкг/мл).

У *п'ятому розділі* означено ступінь впливу гетероциклічних аміноцукрохінолінієвих сполук на деякі базисні фактори патогенності мікроорганізмів. В суббактеріостатичних дозах (на порядок нижчої МБстК) похідні хінолінію вірогідно знижували рівень адгезії референтного штаму *E.coli* R-124-ROW-BE-φ та клінічного ентеропатогенного ізоляту *E.coli* № 114-М на еритроцитах O(I) Rh(+) здорової людини; фактично нейтралізували протилізоцимну активність *E.coli* ATCC (№ 25922); вірогідно знижували протиімуноглобулінову дію мікробів на стадії інвазії і колонізації; сприяли елімінації Hly-плазмід, детермінуючих продукцію α-гемолізіну *E.coli* KS 112 Hly (Km), Ent-плазмід *E.coli* γ Ф3 10-2 ::Tng, а також вірогідно попереджували їх міжмікробну передачу в процесі кон'югації. Доведено вплив деяких аміноцукрохінолініїв (сполуки 5, 10, 16, 20) на елімінацію R-плазмід *E.coli* 5-3Rdrd (з плазмідами Str, Chi, Amp) та *E.coli* 1-5-3-R₁₋₁₆ (з плазмідною Km), а також інгібування взаємообміну R-плазмідами *E.coli* 1-5-3-R₁₋₁₆ та *E.coli* C-600 (Str) в процесі кон'югації.

У шостому розділі наведено результати вивчення токсичності гетероциклічних похідних хінолінію, що вміщують фрагменти аміноцукрохінолінію при одноразовому та місячному режимах їх введення в організм тварин різними шляхами. Гостра токсичність досліджених сполук коливається в досить широких межах. Дещо менша токсичність означена у сполук 38, 20, 16, що містять цукрові замісники в різних положеннях ядра хінолінію та у сполуки 5 з карбоксильним радикалом біля гетероатому азоту. Означено токсичність похідних аміноцукрохінолінію в подовженому (14 діб) експерименті. При порівнянні максимально переносимих та половинних летальних доз хіноаміноглікозидів при різних шляхах та режимах введення тваринам, ступінь небезпечності хронічного отруєння цими сполуками помірна та малонебезпечна (коефіцієнти кумуляції вище 5). Значно більш токсичним виявилась сполука 10, яка в положеннях R₁ ядра хінолінію вміщує C₁₀H₇, R₂ – водень, R₃ – ацетат глюкози. Похідним хінолінію не притаманна кумулятивність. За класифікацією С.Д.Заугольникова досліджені сполуки віднесено до V – VI класів шкідливих речовин (мало та помірно токсичні). Вивчення подразнюючої дії похідних хінолінію в експерименті показало, що інстиляція протягом тижня їх 0,5 % розчину в кон'юнктивальній лантух кролів та мурчаків не зумовлювала візуально констатованих ознак подразнення слизових оболонок. Аплікація 1 % мазі сполуки 39 на поліетиленоксидній основі на депільовану ділянку шкіри кролів щоденно на протязі місяця не призводила до видимого подразнення. Вказане не торкається сполуки 10, яка в аналогічних умовах досліду на 5-у добу призводила до почервоніння шкіри, на 7-у – 8-у добу відмічено набряк і перифокальну реакцію. Наявність первинно-токсичної та алергизуючої дії підтверджено в реакції „спалаху” ділянки шкіри на облігатний алерген 2,4-динітрохлорбензол після сенсibiliзації тварин цією речовиною.

Доведено наявність десенсибілізуючих властивостей у сполук 5, 7 і 14 на рівні дипразину, що в подальшому знайшло підтвердження на класичній моделі анафілактичного шоку (по Безредко) у мурчаків.

У розділі аналізу і узагальнення результатів дослідження в стислій формі наведено підсумки проведених дослідів, означено результати реалізації поставлених мети і задач дисертаційної роботи.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі на підставі теоретичного аналізу та експериментального дослідження обгрунтовано перспективу конструювання протимікробних препаратів на основі гетероциклічних хінолінієвих сполук, що вміщують залишки цукрів. Означено ступінь і спектр впливу похідних хінолінію

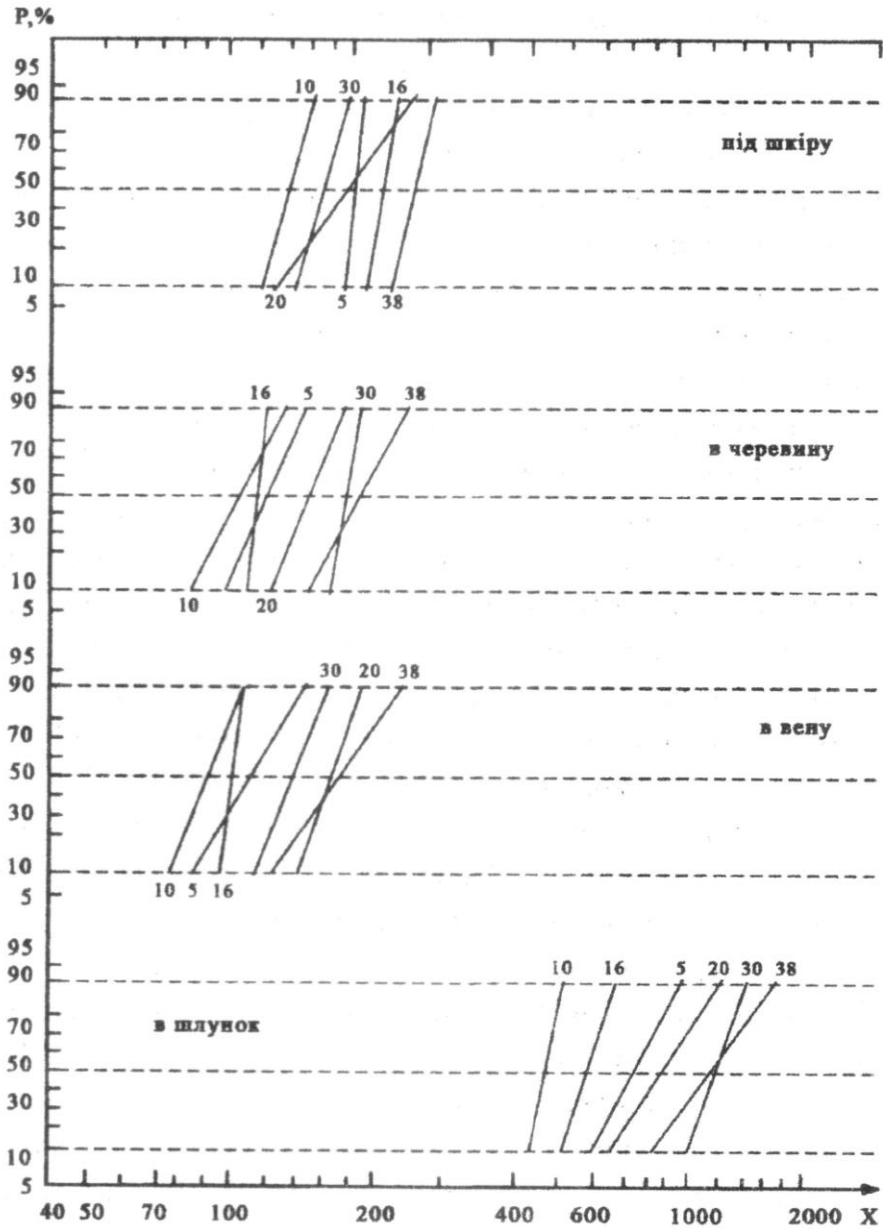


Рис. 2. Розподіл доз, характеризуючих хронічну токсичність похідних аміноцукрохінолінію для білих мишей при введенні різними шляхами. По осі абсцис (в логарифмічному масштабі) – доза, мг/кг; по осі ординат – летальний ефект, %

щодо грампозитивних і грамнегативних бактерій і грибів – клінічно значущих збудників гнійно-запальних захворювань.

На основі аналізу отриманих результатів сформульовано наступні наукові висновки:

В процесі хронізації обструктивного бронхіту в біотопі дихальної системи формуються відносно стабільні мікробіоценози, які характеризуються полімікробністю та прогресуючим превалюванням факультативних і облигатних анаеробів. Клінічно значущі ізоляти бактерій та дріжджеподібних грибів роду *Candida* в більшості випадків володіли патогенними властивостями та стійкістю щодо антибіотиків і антисептиків.

2. Визначено спектр протимікробної дії 39 нових оригінальних гетероциклічних похідних хіноліну, що вміщують фрагменти аміноцукрів. Встановлено їх виражений вплив на гноєтворні коки (МБстК – від 0,12 до 31,2 мкг/мл), нейсерії (МБстК – від 0,5 до 15,6 мкг/мл), корінебактерії, лістерії (МБстК – від 0,5 до 31,2 мкг/мл), вегетативні форми бацил (МБстК – від 0,24 до 62,5 мкг/мл), пептококи, пептострептококи, бактероїди і спіріли (МБстК – від 0,5 до 62,5 мкг/мл), кандіди (МБстК – від 0,5 – до 62,5 мкг/мл). Дещо менший вплив аміноцукрохінолінів на ентеробактерії і псевдомонади (МБстК – від 15,6 до 500,0 мкг/мл), спорову форму СТІ-325 (від 15,6 до 62,5 мкг/мл). Мікобактерії туберкульозу проявляли чутливість до гетероциклічних похідних аміноцукрів лише в дозі вище 1000 мкг/мл.

3. Ступінь протимікробної активності гетероциклічних сполук з аміноцукровими фрагментами залежить від характеру замісника в положенні R3 ядра хіноліну. Більш вираженою активністю володіли речовини, вміщуючі ацетат глюкози. В порядку зниження протимікробної дії вплив замісників в положенні R3 наступний: ацетат галактози > ацетат мальтози > ацетат лактози. Вельми активними виявились аміноцукрохіноліни з NH-іміно та C₂H₅ групами в положенні R1 ядра хіноліну. Не встановлено вірогідної залежності рівня протимікробної дії аміноцукрохінолінів від характеру галогену (X⁻).

4. Похідні аміноцукрохінолінію в суббактеріостатичних дозах (на порядок нижчої МБстК) проявляють достатньо виражену та вірогідну протиадгезивну дію, понижують лізоцимну активність клінічно значущих патогенів, їх протиімуноглобулінову активність, сприяють елімінації плазмід ентеротоксичності (Ent - плазмід *E.coli* pA_P 10-2 : Tng) та антибіотикорезистентності (R-плазмід), інгібують передачу Hly – плазмід при кон'югації (селективний маркер Km).

5. Визначенням токсичності в гострому та хронічному досліді доведено помірну та низьку токсичність гетероциклічних похідних хіноліну, вміщуючих фрагменти аміноцукрів (V-VI класи шкідливих речовин). Сполуки 5, 16, 20, 30 і

38 не проявляють виражених ефектів кумуляції та подразнюючої дії в дозі 0,5 мг/кг щодо слизових оболонок ока та шкіри тварин.

6. В реакції «спалаху» на аплікацію облігатного алергену 2,4-динітрохлорбензолу та на моделі анафілактичного шоку у мурчаків доведено протисенсибілізуючу дію сполук 20, 30 і 38 ($P > 0,5$ в порівнянні з Н1-блокатором діпразином – [10-(2-диметіламінопропіл)-фенотіазину гідрохлорид]).

7. Сполука 10 [6-Naphthyl-2-(3,4,5,6,7-pentahydroxyhept-1-enyl)] володіє вираженим анафілактогенним ефектом і якостями облігатного алергена, що дозволяє її застосування в практиці експериментального вивчення токсичності хіміопрепаратів і антисептиків.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Вивчення чутливості до антибіотиків мікроорганізмів, культивованих на поживному середовищі, отриманому із еритроцитарної маси крові / О. А. Батрак, Н. П. Завада, І. С. Рябова, Л. Г. Штикер, С. С. Руденко, А. О. Волков // *Biomedical and Biosocial Anthropology*. – 2006. - № 6. – Р. 41 – 44. (Дисертантом визначена чутливість до антибіотиків 5 штамів стафілококів, 3 штамів ентеробактерій).

2. Асоційована з цитопатогенним вірусом діареї імуносупресія / А. Ю. Волянський, Л. Л. Смирненко, В. І. Стеценко, М. Г. Божко, С. В. Новіков, С. С. Руденко, Е. Н. Григорчук, І. Ю. Кучма // *Вісник Вінницького державного медичного університету*. – 2003. – № 2/2. – С. 767 – 768. (Дисертантом охарактеризовано ступінь імуносупресії збудників діареї).

3. Корекція мікрофлори кишечника дітей після захворювань, асоційованих з порушенням його біоценозу / С. А. Деркач, А. І. Носатенко, І. А. Воронкіна, С. С. Руденко, Ю. В. Шатіло, С. В. Коцар, І. А. Крилова // *Інфекційні хвороби*. – 2009. – № 1. – С. 34 – 40. (Дисертантом визначена та охарактеризована мікрофлора кишечника дітей після перенесення захворювань інфекційного та неінфекційного генезу).

4. Руденко С. С. Ступінь впливу гетероциклічних похідних аміноцукрохінолінію на елімінацію плазмід антибіотикорезистентності мікроорганізмів [Електронний ресурс] / С. С. Руденко // *Анали Мечниківського Інституту*. – 2009. - № 1. – С. 53 – 59. Режим доступу до журн.: <http://www.imiamn.org/journal.htm>.

5. Деякі характеристики фізіологічного стану *E.coli*, культивованої на середовищах із відходів виробництв [Електронний ресурс] / В. М. Щетініна, В. М. Ніколаєнко, С. С. Руденко, М. Г. Божко, Н. Б. Пугач // *Анали Мечниківського Інституту*. – 2003. - № 4 - 5. – С. 73 – 75. Режим доступу до

журн.: <http://www.imiamn.org/journal.htm>. (Дисертантом мікробіологічно охарактеризовано 11 штамів кишкових паличок)

6. Биологические свойства шигелл, изолированных в Северо-восточном регионе Украины в 1996 – 2003 гг. [Электронный ресурс] / А. Л. Дьяченко, С. С. Руденко, Н. А. Галушко, М. Г. Божко, П. А. Дьяченко, Т. О. Пасечник // *Анали Мечниковського Інституту*. – 2005. - № 1. – С. 84 – 91. Режим доступу до журн.: <http://www.imiamn.org/journal.htm>. (Дисертантом охарактеризовано біохімічні властивості 12 ізолятів шигел).

7. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів : методичні рекомендації / Ю. Л. Волянський, І. С. Гриценко, В. П. Ширококов, **В. В. Смірнов**, С. В. Бірюкова, І. Л. Дикий, І. Ю. Кучма, В. Г. Палій, А. Ю. Волянський, А. М. Марющенко, К. І. Ліпатникова, Н. П. Волянська, Муамар Ківан Ахмед, Т. О. Пасічник, М. Г. Божко, О. І. Клімов, А. О. Волков, Т. О. Волков, Н. В. Дубініна, Т. Л. Кліса, Л. М. Руденко, С. С. Руденко, М. І. Драч, В. І. Лучків. – Київ, 2009. – 38 с. (Дисертантом означено критерії оцінки протимікробної дії ліків, підготовлено до друку п.3.7).

8. Руденко С. С. Нове покоління похідних хінолінію як ефективний засіб в лікуванні та профілактиці захворювань мікробного генезу / С. С. Руденко // *Актуальні питання гігієни, екології, епідеміології та держсанепіднагляду на сучасному етапі : матеріали VI науково-практичної конференції Державної санітарно-епідеміологічної служби Полтавської області*. – Полтава, 2004. – С. 71.

9. Волянська Н. П. Ступінь нейтралізації протиімуноглобулінової дії мікроорганізмів антисептиками групи четвертинного амонію / Н. П. Волянська, С. С. Руденко, О. А. Волков // *Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України : матеріали VI Національного з'їзду фармацевтів України, 28 – 30 вересня 2005 р.* – Харків, 2005. – С. 493 – 494. (Дисертантом досліджено протиімуноглобулінову активність ЧАС щодо 7 референтних штамів бактерій).

10. Руденко С. С. Обґрунтування щодо використання похідних хінолінію, включаючих фрагменти аміноцукрів, в антибактеріальній терапії гастродуоденальних захворювань з виразкою 12-палої кишки / С. С. Руденко // *Актуальні питання гігієни, екології, епідеміології та держсанепіднагляду на сучасному етапі : матеріали X науково-практичної конференції Державної санітарно-епідеміологічної служби Полтавської області*. – Полтава, 2004. – С. 71.

11. Руденко С. С. Протимікробна активність гетероциклічних похідних аміноцукрохінолінію / С. С. Руденко // *Матеріали XII міжнародного конгресу молодих вчених і студентів*. – Тернопіль, 2009. – С. 276.

АНОТАЦІЯ

Руденко С.С. Протимікробна активність та фармакологічна дія гетероциклічних похідних хінолінію, що вміщують фрагменти аміноцукрів. – Рукопис. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07-мікробіологія. – ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України». Харків, 2009.

Дисертацію присв'ячено скринінгу та дослідженню перспективних протимікробних гетероциклічних похідних хінолінію, вміщуючих активні фрагменти аміноцукрів.

Означено і всебічно охарактеризовано патогени біотопу бронхолегеневої системи у хворих на обструктивний бронхіт. Досліджено рівні протимікробної активності та спектр впливу щодо музейних і клінічних штамів мікроорганізмів 4, 5, 17 – 20 груп похідних аміноцукрохінолінію. Доведено наявність впливу деяких досліджених сполук на базові фактори хвороботворності клінічно значущих патогенів, вегетуючих в біотопі дихальних шляхів. Означено їх протиадгезивну, антилізоцимну та протиімуноглобулінову активність, здатність елімінувати плазмідні ентеропатогенності та антибіотикорезистентності, а також попереджувати міжмікробну передачу R-плазмід в процесі кон'югації. Вивчено гостру і хронічну токсичність, кумулятивні ефекти і алергізуючі/десенсибілізуючі властивості хінолінієвих сполук.

Ключові слова: гетероциклічні похідні аміноцукрохінолінію, обструктивний бронхіт, мікроорганізми, антибіотики, антисептики, ідентифікація, адгезія, імуноглобуліни, лізоцим.

АННОТАЦИЯ

Руденко С.С. Противомикробная активность и фармакологическое действие гетероциклических производных хинолиния, содержащих фрагменты аминсахаров. – Рукопись. Диссертация на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 03.00.07-микробиология. – ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова АМН Украины». Харьков, 2009.

Микробиологически охарактеризован биотоп бронхо-легочной системы, выделены, идентифицированы и всесторонне изучены бактерии, клинически значимые при обструктивном бронхите в стадии хронизации процесса.

Определены уровни противомикробной активности 39 производных сахароаминохинолиния в отношении референтных штаммов и клинических изолятов, выделенных у больных обструктивным бронхитом. Доказано их более выраженное влияние на грамположительные бактерии. В

суббактериостатических концентрациях производные аminosахарохинолиния и четвертичного аммония статистически достоверно препятствовали адгезии патогенов, ограничивали их противолизоцимную и противои иммуноглобулиновую активность, способствовали элиминации плазмид энтеропатогенности и антибиотикорезистентности, предупреждали активную передачу Ent-, Hly- и R-плазмид между клинически значимыми возбудителями гнойно-воспалительных заболеваний в процессе конъюгации. Изучено острую и хроническую токсичность аminosахарохинолинов, проявляющих высокую противомикробную активность, а также их кумулятивные свойства, раздражающее действие на слизистые, алергизирующие / десенсибилизирующие свойства. Весьма перспективным для токсикологов определен облигатный алерген – 6 – нафтилпентагидроксихинолиния.

Обоснована возможность и перспективность создания на основе гетероциклических производных хинолина, включающих фрагменты аminosахаров, эффективных противомикробных средств.

Ключевые слова: гетероциклические производные аminosахарохинолиния, обструктивный бронхит, микроорганизмы, антибиотики, антисептики, идентификация, адгезия, иммуноглобулины, лизоцим, плазмиды, конъюгация.

ABSTRACT

Rudenko S.S. Antimicrobial and pharmacological activity of quinoline heterocyclic salts, which contains amino sugar fragments. Manuscript. The thesis for the PhD degree (candidate of medical sciences) in speciality 03.00.07-microbiology. – SE “I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the Academy of Medical Sciences of Ukraine”. - Kharkiv, 2009.

The thesis deals screening and study of a perspective antimicrobial quinoline heterocyclic salts with amino sugar fragments. A biotop pathogenes of the bronchopneumonic system was determined and char in patients with an obstructive bronchitis.

The levels of antimicrobial activity and influence spectrum of museum and clinical microorganisms cultures of 4, 5, 17, 20 groups derived from aminosaccharoquinoline were analyzed. The presence of some analyzed compounds influence to the basic factors of disease-productivity of the pathogenes that have clinical significance and vegetate in the respiratory tract biotope was proved. Their anti-adhesive, anti-lysozyme and anti-immunoglobulin activity was defined. As well as their ability to eliminate plasmids of enteropathogenicity and antibiotic resistance and also to prevent intermicrobe transmission of R-plasmids in the conjugation

process was denoted. Acute and chronic toxicity, coagulate effects and allergenic/desensitizing states of quinoline compounds were explored.

Keywords: quinoline heterocyclic salts, obstructive bronchitis, microorganisms, antibiotics, antiseptic, authentication, immunoglobulin, lysozyme.